UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

LUCIMARA TEIXEIRA

EFEITOS DA ERVA MATE (*llex paraguariensis*) E GUARANÁ (*Paullinia cupana*) NA TERMOGÊNESE E BIOGÊNESE MITOCONDRIAL

> Bragança Paulista 2020

EFEITOS DA ERVA MATE (*llex paraguariensis*) E GUARANÁ (*Paullinia cupana*) NA TERMOGÊNESE E BIOGÊNESE MITOCONDRIAL

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro

Bragança Paulista 2020

WD 210 T267e	Teixeira, Lucimara Efeitos da erva mate (<i>llex paraguariensis</i>) e guaraná (<i>Paullinia cupana</i>) na termogênese e biogênese mitocondrial / Lucimara Teixeira Bragança Paulista 2020. 49 p.
	Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação <i>Stricto Sensu</i> em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco. Orientação de: Marcelo Lima Ribeiro.
	 Ilex paraguariensis . 2. Paullinia cupana Kunth. Biogênese mitocondrial. 4. Obesidade. 5. Termogênese. I. Ribeiro. Marcelo Lima. Título.

Sistema de Bibliotecas da Universidade São Francisco – USF Ficha catalográfica elaborada por: Denise Isabel Arten / CRB-8/5823





TEIXEIRA, Lucimara, "Efeitos da erva mate (*llex paraguariensis*) e guaraná (*Paullinia cupana*) na termogênese e biogênese mitocondrial". Tese defendida e aprovada no programa de Pós- Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 16 de dezembro de 2020 pela Banca examinadora constituída pelos membros:

Prof. Dr. Marcelo Lima Ribeiro - Orientador e Presidente Universidade São Francisco

Profa. Dra. Ana Cristina Prado Veiga Menoncello Universidade São Francisco

> Profa. Dra. Cintia Rabelo e Paiva Caria FEA-Unicamp

Profa. Dra. Daniela Soares Razolli Universidade São Francisco

Profa. Dra. Érica Martins Ferreira Gotardo Azevedo Universidade Estadual de Campinas

> Prof. Dr. Lúcio Fábio Caldas Ferraz Universidade São Francisco



usf.edu.br 0800 727 8855 DEDICATÓRIA

Aos meus amores da minha vida, meus alicerces, meus exemplos!

Ao meu pai José In memoriam

e minha mãe, Ana Virgínia

Gratidão eterna!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as coisas!

Agradeço aos meus pais, José (*In memoriam*) e Ana Virgínia pelo amor e apoio incondicional.

Ao meu marido Wladimir e minhas filhas Beatriz e Bárbara, pelo amor, companheirismo, paciência e incentivo.

À minha família em especial aos meus irmãos, sobrinhos, cunhados e tia Dete pelo carinho, apoio e compreensão.

À profa Dra. Alessandra Gambero pelo incentivo , pelos ensinamentos e pela troca de experiências !

Agradeço imensamente ao meu orientador, prof. Dr. Marcelo Ribeiro Lima pelo acolhimento no laboratório, pelo exemplo, pelo apoio e por não permitir que eu desistisse.

A todos os meus companheiros de laboratório em especial as Dras. Natália da Silva Lima e Tanila Wood dos Santos pelos ensinamentos e paciência.

Aos professores do Curso de Pós -Graduação em Ciências da Saúde pelo aprendizado e ao Núcleo de Pós Graduação *Stricto Sensu* pelo apoio.

Aos professores da graduação e amigos de jornada Dra. Ana Cristina P. V. Menoncello, Ms. Ana Paula M. Iacopucci, Dra. Bianca Barassa, Dra.Celena M. Z. de Souza, Dra. Cíntia B. Binotti, Ms. Cristiano da Rosa, Dra. Gannabathula Sree Vani, Ms. Marcelo C. Zanesco, Dra. Maria Betânia de O. Garcia e Dra. Thalita Rocha pelo apoio e amizade.

À Banca Examinadora pelas sugestões que contribuíram para o enriquecimento do meu trabalho.

Gratidão por todos os profissionais que trabalham comigo!

À Universidade São Francisco pela oportunidade de aprimoramento profissional e pessoal.

Ao financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo nº2014/11862-6.

RESUMO

A obesidade é um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas e morte prematura, afeta mais de 400 milhões de pessoas no mundo. Estudos moleculares demonstram que a obesidade está associada a uma desregulação da biogênese mitocondrial, aumento na produção de EROs (Espécies Reativas de Oxigênio), diminuição da sinalização da mitofagia e aumento da apoptose. Por isso estratégias terapêuticas com o objetivo de restaurar a função mitocondrial é uma alternativa promissora. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial da erva-mate (llex paraguarienses) e do guaraná (Paullinia cupana) sobre a biogênese mitocondrial e termogênese. Para avaliação dos efeitos da ervamate foram realizados estudos in vitro e in vivo. In vitro foram utilizadas células murinas C2C12 para avaliação da respiração mitocondrial. A expressão de genes relacionados à biogênese mitocondrial e termogênese foram analisadas por PCR em Tempo Real (qPCR). Os experimentos in vivo foram realizados em camundongos Swiss alimentados com uma dieta rica em gordura (HFD) e tratados com extrato de erva-mate. A calorimetria indireta foi realizada, e a expressão de genes e proteínas relacionados à biogênese mitocondrial, termogênese e lipogênese in vivo foram determinadas por gPCR e western blotting. Resultados in vitro indicam que a erva-mate aumentou o número de cópias do DNA mt (DNA mitocondrial), a capacidade respiratória de reserva mitocondrial e a eficiência de acoplamento. O perfil de expressão gênica reforça essa evidência, indicando uma modulação de genes downstream a Ampk (5' Proteína quinase ativada por AMP). In vivo, a erva-mate preveniu parcialmente a obesidade induzida por dieta, aumentando o gasto de energia e aumentando a biogênese mitocondrial através da via Ampk / Sirt1 / Pgc1α. Portanto a erva-mate estimula a mitocondriogênese e a expressão de UCPs (Proteínas desacopladoras), levando a um aumento da capacidade respiratória sobressalente e dissipação de energia. Para a avaliação os efeitos do guaraná (GUA) na biogênese mitocondrial, os camundongos foram alimentados com dieta hiperlipídica (HFD). Camundongos C57BL6J foram divididos em dois grupos: dieta rica em gordura HFD e dieta rica em gordura + guaraná (HFD-GUA). O grupo HFD-GUA recebeu gavagem diária de guaraná (1 g / kg de peso). O peso corporal e a ingestão alimentar foram medidos semanalmente. Os níveis glicêmico, triglicerídeo e colesterol foram determinados. Volume de oxigênio (VO2) e gasto energético (GE) foram determinados por calorimetria indireta. A expressão do gene foi avaliada por qPCR e o conteúdo de proteína por western blotting. O grupo HFD-GUA apresentou menor peso corporal, depósitos de tecido adiposo subcutâneo, retroperitoneal, visceral e epididimal e níveis glicêmicos e de triglicerídeos, sem alteração na ingestão alimentar e nos níveis de colesterol. Além disso, o grupo HFD-GUA apresentou aumento no VO2 e no gasto energético basal (GE), bem como na expressão de Pgc1a, Creb1, Ampka1, Nrf1, Nrf2 e Sirt1 no músculo e tecido adiposo marrom. O grupo HFD-GUA apresentou aumento no conteúdo de DNA mt no músculo quando comparado ao grupo HFD. Dessa forma, os resultados mostraram que o guaraná leva ao aumento do metabolismo energético e estimula a biogênese mitocondrial.

Descritores: *llex paraguariensis*; guarana (*Paullinia cupana* Kunth); biogênese mitocondrial; obesidade; termogênese ABSTRACT

ABSTRACT

Obesity is one of the main risk factors for the development of chronic diseases and premature death, affects more than 400 million people worldwide. Molecular studies demonstrate obesity associated with decreased mitochondrial breathing, increased mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production, deregulation of mitochondrial biogenesis, decreased mitophagia signaling and increased apoptosis. That is why therapeutic strategies aimed at restoring mitochondrial function may be a promising alternative. The present work aimed to evaluate the potential effects of the polyphenols yerba mate (*llex paraguarienses*) and guarana (*Paullinia* cupana) on mitochondrial biogenesis and thermogenesis. To evaluate the effects of yerba mate, in vitro and in vivo studies were performed. In vitro C2C12 cells were used to assess mitochondrial respiration. The expression of genes related to biogenesis and mitochondrial thermogenesis were analyzed by Real Time PCR (qPCR). The in vivo experiments were carried out on mice Swiss fed a high-fat diet (HFD) and treated with verba mate extract. Indirect calorimetry was performed, and the expression of genes and proteins related to mitochondrial biogenesis, thermogenesis and lipogenesis again were determined by gPCR and western *blotting*. The *in vitro* results indicate that yerba mate increased the mtDNA (Mitochondrial DNA) copy number, as well as the mitochondrial reserve capacity and coupling efficiency. The gene expression profile reinforces this evidence, indicating a modulation of genes downstream from Ampk (AMP- activated protein kinase). In vivo, a verba mate partially prevented diet-induced obesity, increasing energy expenditure and increasing mitochondrial biogenesis via the AMPK / SIRT1 / PGC1a pathway. Therefore, verba mate stimulates mitochondriogenesis and UCPs(uncoupling proteins) expression, leading to increased spare breathing capacity and energy dissipation. To evaluate the effects of guarana (GUA) on mitochondrial biogenesis, the mice were fed a high-fat diet (HFD). C57BL6J mice were divided into two groups: high-fat diet HFD and high-fat diet + guarana (HFD-GUA). The HFD-GUA group received daily guarana gavage (1 g / kg of weight). Body weight and food intake were measured weekly. Glycemic, triglyceride and cholesterol levels were determined. Volume of oxygen (VO2) and energy expenditure (EE) were determined by indirect calorimetry. The gene expression was evaluated by real-time PCR and the protein content by *western blotting*. The HFD-GUA group had lower body weight, deposits of subcutaneous, retroperitoneal, visceral and epididymal tissue and glycemic and triglyceride levels, with no change in food intake and cholesterol levels. In addition, the HFD-GUA group showed an increase in VO2 and basal energy expenditure (EE), as well as in the expression of Pgc1 α , Creb1, Ampka1, Nrf1, Nrf2 and Sirt1 in muscle and brown adipose tissue. The HFD-GUA group showed an increase in the mtDNA content in the muscle when compared to the HFD group. Thus, the results showed that guarana leads to increased energy metabolism and stimulates mitochondrial biogenesis.

Descriptors: *llex paraguariensis*; guarana (*Paullinia cupana* Kunth); mitochondrial biogenesis; obesity; thermogenesis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ADIG: Gene codificador da adipogenina
- AKT: Serina/treonina quinase
- AMPK: Proteína quinase
- APO 3: Apoenzima 3
- ATP: Trifosfato de Adenosina
- cAMP: Adenosina 3'-5'-monofosfato cíclico
- CHDH: Colina desidrogenase
- COMT: Catecol-O-metil transferase
- CREB: Proteína ligante ao elemento responsivo de AMPc
- DLK-1: Delta-like protein 1 (Pref1).
- DM2: Diabetes mellitus do tipo 2
- DNA: Ácido Desoxiribonucléico
- DRP1: Proteína tipo Dinamina 1
- EGCG: Epigalocatequina 3 galato
- EROs: Espécies reativas de oxigênio
- ERR: Receptor relacionado ao estrogênio
- FAO: Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
- FDA: Administração de Alimentos e Medicamentos
- FIS: Proteína 1 de fissão mitocondrial
- GATA3: Fator de transcrição de células T codificado pelo gene GATA3
- GE: Gasto energético
- **GTPases:** Guanosina Fosfatases
- HL-1: Células da linhagem do músculo cardíaco
- hTOM 70: Receptor da subunidade 70 do importador mitocondrial
- IGF-1: Fator de crescimento insulínico tipo 1
- IL-6: Interleucina 6

- IMC: Índice de Massa Corporal
- IRS: Substrato receptor de insulina
- IP3R3: Receptor para o inositol 1,4,5 trifosfato
- Klf2: Fator 2 do tipo Krüppel
- LC3: Cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos
- LKB1: Fígado quinase B1
- MFF: Fator de fissão mitocondrial
- MFN1 e 2: Mitofusinas 1 e 2
- MID 49 e 51: Proteína da dinâmica mitocondrial de 49 e 51 KDa
- DNA mt: DNA mitocondrial
- NA: Noradrenalina
- NAD: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
- NAD +: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo forma reduzida
- NF-KB: Fator Nuclear KB
- NRF-1 e 2: Fator respiratório 1 e 2
- **OPA1: Optical atrophy 1**
- OXPHO: Sistema de fosforilação
- OMS: Organização Mundial da Saúde
- PAI-1: Inibidor 1 de ativador de plasminogênio
- PARL: Proteína romboide da membrana interna da mitocôndria
- PCR-RT: Reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
- PDE: Fosfodiesterase
- PGC1a: Co-ativador do Receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo
- PGC1β: Co-ativador do Receptor beta ativado por proliferador de peroxissomo
- PINK 1: Quinase 1 induzida por PTEN
- PKA: Proteina quinase
- PMM: Potencial da membrana mitocondrial
- PNS: Pesquisa Nacional de Saúde

PPARy: Receptor do ativador por proliferadores de peroxissomo gama PRC: Co-ativador relacionada ao PGC-1 PTEN: Fosfatase homóloga a Tensina qRT-PCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real RE: Retículo Endoplasmático RMDN3: Regulador da proteína 3 da dinâmica dos microtúbulos RNA: Ácido Ribonucleico SAM: Máquinas de classificação e montagem SAMP 8: Acelerador da senescência em camundongos 8 SIRT 1: Sirtuína 1 SIRT 3: Sirtuína 3 SNS: Sistema Nervoso Simpático SOD: Superóxido Dismutase Mitocondrial TAB/WAT: Tecido Adiposo Branco/ White adipose tissue TAM/BAT: Tecido Adiposo Marrom/ Brown adipose tissue TFAM: Fator de transcrição mitocondrial A TGFβ: Fator transformador de crescimento β TIM: Translocador da membrana mitocondrial interna TNFα: Fator de necrose tumoral-α TOM: Translocador da membrana mitocondrial externa UCP: Proteína Desacopladora VAPB: Vesícula associada a membrana da proteína B VDAC 1: Canal aniônico dependente de tensão 1 WNT1: Wingless-type 1 WNT3a: Wingless-type 3a WNT10b: Wingless-type 10b

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Localização do tecido adiposo branco (WAT) e tecido adiposo marrom (BAT) em humanos adultos. Fonte: Adaptado PARK; KIM; BAE, 2014.....**15**

Figura 2. Localização do tecido adiposo branco (WAT) e tecido adiposo marrom (BAT) em ratos. Fonte: Adaptado PARK; KIM; BAE, 2014......15

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO13	
Obesidade: um problema de saúde pública13	
Mitocôndria e biogênese mitocondrial16	
Termogênese	
Efeitos dos polifenóis na modulação de biogênese mitocondrial25	
Efeitos dos polifénois na termogenêse28	
Efeitos da erva-mate e guaraná na modulação de biogênese mitocondrial32	
OBJETIVOS	
Objetivo Geral	
Objetivos Específicos	
CAPÍTULO I ARTIGO PUBLICADO	
Santos T.W., Miranda J., Teixeira L., Aiastui A., Matheu .A, Gambero A., Portillo M.P., Ribeiro M.L. Yerba Mate Stimulates Mitochondrial Biogenesis and Thermogenesis in High Fat Diet- Induced Obese Mice. Molecular Nutrition & Food Research , 2018;62(15) https:// doi: 10.1002/mnfr.201800142	
CAPÍTULO II ARTIGO PUBLICADO	
Lima N.D.S., Teixeira L., Gambero A., Ribeiro M.L. Guarana (<i>Paullinia cupana</i>) Stimulates Mitochondrial Biogenesis in Mice Fed High-Fat Diet. Nutrients , 2018; 10(2):165. https://doi.org/10.3390/nu10020165	
CONCLUSÃO	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

INTRODUÇÃO

Obesidade: um problema de saúde pública

A obesidade é considerada uma doença crônica associada ao excesso de gordura corporal (acúmulo de tecido adiposo) com etiologia complexa e multifatorial (WANDERLEY; FERREIRA, 2010) e possui uma forte associação com o desenvolvimento de várias doenças como a hipertensão, diabetes, doenças cardiovasculares e câncer (endométrio, cólon e mama) (MANCINI, 2015; WANNMACHER, 2016) Em particular, o acúmulo excessivo de gordura na região abdominal é reconhecido como um dos principais fatores que desencadeiam desordens metabólicas (ITEM;KONRAD, 2012 HARBRON et al., 2014; ANTONI et al., 2016), além do aumento de mortalidade em 2,5 vezes quando associada às doenças cardiovasculares de acordo com dados do Ministério da Saúde (2020).

Em 2008 eram mais de 35% de indivíduos com sobrepeso e 10% de indivíduos adultos obesos, dados de 2014 revelam que 39% estavam com sobrepeso e 13% com obesidade e a projeção para 2025 é que mais de 60% da população mundial estejam com sobrepeso e 30% estejam obesos. (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2020). Dados da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) mostram que metade da população da América Latina e Caribe com exceção ao Haiti estão com sobrepeso (FAO, 2017).

No Brasil, dados da Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel), de 2019 revelam que 55,4% da população adulta está com sobrepeso, sendo 57,1% entre os homens e 53,9% entre as mulheres. Em relação à frequência de adultos obesos é de 20,3 % sendo semelhante entre homens e mulheres. Além do sobrepeso e obesidade a pesquisa revela que 7,4% da população adulta apresenta diabetes e 24,5%, hipertensão, doenças que podem estar relacionadas à obesidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Quando mesuramos a obesidade estamos verificando o estoque de calorias consumidas e não requisitadas para suprir as necessidades metabólicas. Os lipídeos, por serem hidrofóbicos podem ser armazenados em grande quantidade e contém por unidade de massa, mais que o dobro de energia armazenada do que carboidratos e proteínas, fornecendo mais energia metabólica quando oxidados, por esta razão o tecido adiposo é o principal reservatório energético do organismo (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Nos mamíferos encontramos dois tipos de tecido adiposo com características morfofuncionais bem distintas, o tecido adiposo branco (TAB) e o tecido adiposo marrom (TAM) (PARK; KIM; BAE, 2014) e o tecido adiposo bege recentemente descoberto com

características intermediárias (MONTANARI; POŠĆIĆ; COLITTI, 2017).

O tecido adiposo branco é constituído por adipócitos uniloculares por apresentarem no seu citoplasma uma única e grande inclusão de triacilglicerol, que ocupa aproximadamente 85% do volume celular, por este armazenamento o TAB é um tecido de reserva energética à longo prazo. Além desta função apresenta atividade secretora de adipocinas com funções de mediadoras pró-inflamatórias e anti-inflamatórias como leucotrienos, interleucina-6 (II-6), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), fatores de crescimento como fator transformador de crescimento β (TGF- β) e prostaglandinas, além de outras que atuam na homeostase glicêmica como a adiponectina e como função hormonal a leptina (FONSECA- ALANIZ et al., 2006; MONTANARI; POŠĆIĆ; COLITTI, 2017).

O tecido adiposo branco apresenta uma distribuição corporal ao redor das vísceras, protegendo-as sendo classificado como tecido adiposo visceral e abaixo da pele promovendo isolamento térmico sendo classificado como tecido adiposo subcutâneo (PARK; KIM; BAE, 2014). A figura 1 ilustra a localização do tecido adiposo branco em humanos adultos e a Figura 2 ilustra a localização do tecido adiposo branco em ratos (WAT – White Adipose Tissue).

O tecido adiposo marrom é constituído por adipócitos multiloculares pois possui no seu citoplasma várias gotículas lipídicas, citoplasma abundante e muitas mitocôndrias (PARK; KIM; BAE, 2014). As mitocôndrias do TAM apresentam a proteína desacopladora 1 (UCP-1-termogenina). Essa proteína da membrana mitocondrial interna que atua como um canal de próton que descarrega a energia gerada pelo acúmulo de prótons no espaço intermembranoso durante as reações oxidativas do ciclo de Krebs, desviando esses prótons do complexo F1F0 (ATP sintase) e impedindo a síntese de ATP, permitindo que se dissipe em calor a energia estocada na mitocôndria, portanto um tecido especializado na termogênese presente ricamente em recém-nascidos e que ao longo da vida do indivíduo vai reduzindo, ficando restrito à algumas áreas como no tecido perirenal, para- aórtico (FONSECA- ALANIZ et al, 2006) como ilustra a figura 1. A Figura 2 ilustra a localização do tecido adiposo marrom em ratos (BAT- Brown Adipose Tíssue).



Figura 1: Localização do tecido adiposo branco (WAT) e tecido adiposo marrom (BAT) em humanos adultos. Fonte: Adaptado PARK; KIM; BAE, 2014



Figura 2: Localização do tecido adiposo branco (WAT) e tecido adiposo marrom (BAT) em ratos. Fonte: Adaptado PARK; KIM; BAE, 2014

Já o Tecido Adiposo Bege contém características intermediárias, como por exemplo, os adipócitos possuem uma única vesícula de gordura como nos adipócitos uniloculares, mas quando estimulados há um aumento do número de mitocôndrias que expressam a UCP1, aumentam a taxa de respiração celular e transcrição de genes relacionados à termogênese, por esta razão apresentam funcionalmente a atividade de termogênese adaptativa (PARK; KIM; BAE, 2014). Por conta da presença do ferro no oxigênio utilizado na formação do ATP passam a ter uma coloração mais escurecida (SPIELGEMAN, 2013). O tecido adiposo apresenta em sua constituição uma matriz de tecido conjuntivo com presença de fibras colágenas e reticulares, fibras nervosas, células do estroma vascular, nódulos linfáticos, células imunes (leucócitos, macrófagos), fibroblastos e pré-adipócitos (células adiposas indiferenciadas) (FONSECA-ALANIZ et al., 2006).

Como a obesidade é dada pelo aumento da massa adiposa e determinada pelo aumento do tamanho do adipócito (hipertrofia) e/ou do seu número (hiperplasia) são os préadipócitos nos indivíduos adultos que apresentam uma atividade intensa de renovação permitindo a hiperplasia do tecido e uma remodelagem tecidual. Este processo é possível pois os pré-adipócitos transformam-se em adipócitos através da adipogênese (PALMA, 2014).

A adipogenêse é o processo de diferenciação de células tronco mesenquimais em adipócitos. Este processo inicia-se entre a 14^ª e 16^ª semana de vida intrauterina a partir de células tronco mesenquimais que se diferenciam em pré-adipócitos. Após o nascimento, durante o primeiro ano de vida os pré-adipócitos começam a armazenar gordura, mediante sinalização celular (HAUNER et al., 2009).

Muitos estudos estão demonstrando a relação da obesidade com a diminuição da atividade mitocondrial, pois são as mitocôndrias as organelas citoplasmáticas responsáveis pelo metabolismo energético (PICARD et al., 2011).

Mitocôndria e biogênese mitocondrial

As mitocôndrias são organelas dinâmicas presentes em células eucarióticas e responsáveis pela oxidação de moléculas orgânicas como carboidratos, gorduras e aminoácidos acompanhado da liberação de energia que é utilizada na síntese de ATP (Trifosfato de Adenosina) através da fosforilação oxidativa (ALBERTS et al., 2017), sendo a principal fonte de energia para o metabolismo celular (POPOV, 2020). As mitocôndrias sofrem uma rotatividade constante e sua meia vida varia de tecido para tecido (GOTTLIEB; STOTLAND, 2015) assim como a sua morfologia varia enormemente entre os tipos de células e tecidos, mudando rapidamente em resposta a danos externos e sinais metabólicos, como estado de nutrientes (WAI; LANGER, 2016).

As mitocôndrias possuem duas membranas que definem quatro compartimentos: membrana mitocondrial externa, o espaço intermembrana, a membrana mitocondrial interna e a matriz, onde se encontra o DNA mitocondrial (DNA mt) e as várias enzimas (ANDERSON et al., 2019).

A membrana mitocondrial externa apresenta proteínas que convertem substratos lipídicos para serem metabolizados na matriz além de possuirem complexos protéicos que

permitem a entrada de proteínas, o complexo TOM (translocador da membrana externa) e o complexo SAM (translocador que auxilia no dobramento da membrana externa) e enzimas que permitem os processos de fissão e fusão mitocondrial (ALBERTS et.al., 2017).

No espaço intermembrana há importantes proteínas relacionadas à morte celular por apoptose como citocromo c, pro-caspases 9 e fator indutor de apoptose e enzimas que participam da fosforilação de nucleotídeos como creatina quinase e adenilato quinase (KOWALTOWSKI, 2004).

A membrana mitocondrial interna contém proteínas com importantes funções de conduzirem as oxidações na cadeia respiratória, como a citocromo c oxidase (cuja função é transferir elétrons para o oxigênio molecular, formando 2 moléculas de água) e proteínas do complexo F0 da ATP sintase responsáveis pela produção de ATP na matriz, além de proteínas transportadoras específicas que regulam a passagem de metabólitos por essa membrana, complexo TIM (translocador de membrana interna), para dentro e para fora da matriz (ALBERTS et al., 2017).

A arquitetura da membrana mitocondrial interna é maleável e normalmente com invaginações denominadas cristas, que ditam o arranjo espacial das proteínas. A remodelação da estrutura das cristas também pode alterar o fluxo enzimático entre os compartimentos, consistente com as diversas estruturas de cristas observadas em todos os tipos de células com diferentes demandas metabólicas (ANDERSON et al., 2019). Na matriz mitocondrial estão presentes várias enzimas necessárias para a oxidação do piruvato e dos ácidos graxos e do ciclo do ácido cítrico (ALBERTS et al., 2017) além de seu próprio DNA mt que é replicado independentemente do genoma nuclear. O DNA mt em humanos, é circular e possui 37 genes que codificam 13 proteínas principalmente relacionadas à fosforilação oxidativa (OXPHOS), 22 RNAt (Ácido Ribonucleico- transportador) e 2 RNAr (Ácido Ribonucleíco – ribossômico) (ANDERSON et al., 2019). O restante das proteínas mitocondriais, entre 1000 e 1500 proteínas são codificadas pelo genoma nuclear (ANDERSON et al., 2019) e são importadas para a mitocôndria de forma que os dois genomas trabalham juntos (ANNESLEY; FISHER, 2019).

Na última década evidencias demonstram que as mitocôndrias possuem um alto dinamismo intracelular, de forma que executa um controle de qualidade sobre a própria população da organela (POPOV, 2020). Por exemplo, os cardiomiócitos de rato têm aproximadamente 10.000 mitocôndrias por célula, isso sugere que em condições de repouso, uma mitocôndria é substituída a cada 4 minutos. Em condições normais as mitocôndrias dos cardiomiócitos são responsáveis por 93% da produção de ATP (a glicólise é responsável por 3-7%). Contudo, mitocôndrias não estão produzindo ATP em taxas máximas o tempo todo,

ao contrário, elas são heterogêneas: algumas mitocôndrias podem estar produzindo ATP em altas taxas, enquanto outras podem ser relativamente ineficiente ou quiescente ou produzindo quantidades significativas de espécies reativas de oxigênio (EROs) (GOTTLIEB; STOTLAND, 2015). As EROs são produzidas durante a oxidação dos compostos orgânicos quando uma pequena quantidade do oxigênio consumido (2 a 5%) é reduzido, produzindo uma variedade de substâncias químicas, instáveis e altamente reativas, capazes de transformar outras moléculas com as quais colidem. As EROs podem provocar injúria tecidual e, em altas concentrações, podem danificar organelas celulares, ácidos nucleicos, lipídios e proteínas (SILVA; GONÇALVES, 2010).

A homeostase de qualquer célula saudável implica em controlar a regulação da massa mitocondrial e a função, assim como uma resposta adaptativa para proteger o DNA mt e a manutenção da demanda energética vital para a função celular. A homeostase mitocondrial é preservada por uma delicada coordenação que compreende a identificação das mitocôndrias danificadas, a mitofagia (que é a degradação autofágica) e a substituição através da biogênese (ANNESLEY; FISHER, 2019).

A biogênese mitocôndrial implica em uma via molecular específica que consiste no recrutamento das novas proteínas pelas mitocôndrias pré-existentes, seguido por sua fragmentação, via fissão. Associado ao rápido crescimento e proliferação celular, esses eventos garantem a renovação constante da população mitocondrial (POPOV, 2020). Este processo complexo exige coordenação do DNA mt e DNA nuclear (VAN DER BLIEK; SEDENSKY; MORGAN, 2017). Existem muitos mecanismos homeostáticos para manter um equilíbrio entre a biogênese mitocondrial (e a geração de ATP) e a produção excessiva de EROs (ANNESLEY; FISHER, 2019).

Embora a biogênese mitocondrial seja regulada por um grande número de coativadores e fatores de transcrição, entre as moléculas envolvidas neste processo, destacase o coativador gama 1 do receptor ativado por proliferador de peroxissomo (PGC-1 α), o principal regulador da biogênese mitocondrial, o gene PTEN que induz a produção da 3-5 quinase 1-Pakin (PINK1), que ativa a síntese de proteínas em mitocôndrias danificadas e o receptor de hidrocarboneto de aril do fator de transcrição ativado por ligante, que também funciona como protetor do estresse oxidativo (POPOV, 2020). A família do co-ativador gama 1 do receptor ativado por proliferador de peroxissomo (PGC-1 é composta por três membros, PGC-1 α , PGC-1 β e PRC (co-ativador relacionado ao PGC-1), que compartilham características estruturais e modos de ação, bem como a capacidade de regular a biogênese mitocondrial em uma ampla variedade de tecidos (VILLENA, 2015). Eles estimulam a atividade dos fatores respiratórios nucleares 1 e 2 (NRF1 / 2) e receptores relacionados ao estrogênio (ERRs) dos receptores nucleares, as duas famílias fundamentais de fatores envolvidos no controle da biogênese mitocondrial. Além disso, os co-ativadores de PGC-1 regulam a expressão do fator de transcrição mitocondrial A (TFAM), um fator chave que regula a replicação e transcrição do DNA mitocondrial (DNA mt). A atividade da PGC-1α é regulada no nível pós-traducional por fosforilação, metilação e acetilação. A acetilação reversível do PGC-1α modifica significativamente a atividade transcricional, e é controlada principalmente, ambos *in vitro* e *in vivo*, pela Sirtuina 1 (SIRT1) (FERNANDEZ-MARCOS; AUWERX, 2011).

A fissão causa fragmentação mitocondrial, que geralmente está associada a disfunção metabólica e doenças (WAI; LANGER, 2016). A fissão assimétrica permite a segregação de componentes não funcionais em uma mitocôndria filha que pode ser removida por autofagia. Uma série de enzimas envolvidas em fosforilação oxidativa (OXPHOS) são expressos com variação diurna sugerindo que a regeneração mitocondrial é regulado pelo ciclo circadiano, e ainda implica que a eliminação mitocondrial pode ser regulada de forma semelhante. Pois durante o sono, o organismo está em um período de jejum portanto, ondas de eliminação mitocondrial podem alternar com regeneração com 3-4% da massa mitocondrial (ou população) sendo substituída a cada dia. No entanto, isso pode ser muito maior: em células HL-1 (células da linhagem cardíaca) submetidas a soro com glicose e com ausência de aminoácidos por 3,5 horas, o número de mitocôndrias é reduzido em 70% (GOTTLIEB; STOTLAND, 2015).

A fissão é concomitante com a dependência de glicólise e precede a renovação mitocondrial. Fissão é amplamente dependente da relação com a dinamina e proteína citosólica Drp1 (proteína tipo dinamina1), que oligomeriza ao redor e contrai túbulos mitocondriais (figura 3). O recrutamento de Drp1 do citosol requer proteínas adaptadoras na membrana mitocondrial externa, incluindo Mff, Mid49 e Mid51, embora Fis1 humano possa promover Drp1 independente fragmentação mitocondrial através da inibição da fusão proteínas (VAN DER BLIEK; SEDENSKY; MORGAN, 2017). (figura 3)

Embora modelos conflitantes de recrutamento de Drp1 foram propostos, sua localização e atividade são conhecidas por serem reguladas por numerosas modificações pós-traducionais. A capacidade de cisão dos oligômeros Drp1 é limitado a túbulos de até 250 nm de diâmetro, indicando que a pré-constrição é necessária para mitocôndrias maiores para que esta seja alcançada pelo retículo endoplasmático (RE), que envolve ao redor e constringir túbulos para marcar locais de fissão futuros e ajuda a partição correta do conteúdo mitocondrial (GOTTLIEB; STOTLAND, 2015).

As mitocôndrias se envolvem em extensos contatos interorganizados dinâmicos que coordenam trocas funcionais com outros componentes celulares em particular, com o RE. Esse contato facilita em inúmeras funções, incluindo fissão mitocondrial, biossíntese de

coenzima Q, transferência de lipídios, transferência de Ca²⁺, replicação e transcrição do DNA mt. Estudos revelam que o contato RE- mitocôndrias em células humanas deve-se a interações entre hTOM 70 e IP3R3, VDAC1 e IP3R3, RMDN3 e VAPB, Mfn2 homodímeros e a acetilação de microtúbulos tem sido aceito para manter o contato apesar dos movimentos e remodelagem das duas organelas (ANDERSON et al.,2019).

Já a fusão mitocondrial resulta numa união e serve para neutralizar os danos metabólicos do estresse oxidativo e proteostático, preservar a integridade celular e proteger contra autofagia (WAI; LANGER, 2016), além do aumento da produção de ATP por fosforilação (ANDERSON et al., 2019). A fusão de membranas externas mitocondriais é mediada por interações homotípicas entre as GTPases (Enzima conversora do Trifosfato de Guanosina), Mfn1 e Mfn2 (figura 3), mas os domínios envolvidos e o mecanismo gradual de fusão ainda são debatidos. Fusão da membrana interna é controlada por Opa1, que existe como cinco isoformas geradas por splicing de RNAm (Ácido Ribonucleico mensageiro) e clivagem proteolíticas (figura 3). Acredita-se que a estequiometria dessas isoformas governa as interações Opa1 com a cardiolipina lipídica específica mitocondrial e, subsequentemente, eventos de fusão (ANDERSON et al., 2019).



Figura 3: Maquinarias celulares que medeiam a fissão mitocondrial, fusão e formação de locais de contato com o retículo endoplasmático. Mitocôndria continuamente sofrem fissão e fusão. A fissão é mediada pela GTPase Drp1, que pode ser recrutada para a membrana mitocondrial externa por uma variedade de receptores, incluindo Mff, Fis1, Mid49 e Mid51. O Drp1 na membrana externa pode oligomerizar em fibrilas que contraem as mitocôndrias para iniciar a fissão. A fusão mitocondrial é iniciada por amarração de mitocôndrias por meio de interações homotípicas entre Mfn1 e Mfn2 em mitocôndrias opostas. A fusão da membrana interna é mediada por OPA1, que existe como formas longas e curtas geradas por proteólise. Locais de contato entre a mitocôndria e o retículo endoplasmático (RE) são estabelecidos e mantida por meio de interações proteína-proteína. As

interações ocorrem entre as moléculas Mfn2 na membrana RE e a membrana mitocondrial externa, eentre VAPB na membrana RE e RMDN3 na membrana mitocondrial externa. As interações também ocorrem entre IP3R3, um canal de cálcio na membrana do RE, e VDAC1 e hTom70 na membrana mitocondrial externa. Fonte: Adaptado de Anderson et al., 2019.

A fissão e a fusão mitocondrial também são importantes eventos para a ocorrência da mitofagia. A mitofagia é uma remoção seletiva de mitocôndrias danificadas através de autofagia. O reconhecimento da mitocôndria alvo pelo autofagossomo ocorre por meio de adaptadores LC3 (cadeia leve 3 da *proteína* 1 associada a microtúbulos). Pode ocorrer em uma via dependente de ubiquitina, por uma via independente e através da interação direta de LC3 com seus receptores (YOO; JUNG, 2018).

Na via dependente de ubiquitina, a mitofagia é controlada pela proteína quinase serina/treonina de mitocôndria (PINK1) e a PARKIN que é a enzima citosólica ubiquitina E3 ligase (YOO; JUNG, 2018). A PINK1 é importado através do complexo TOM e liberado lateralmente na membrana interna pelo complexo TIM23 antes da clivagem pela protease PARL (proteína romboide da membrana interna da mitocôndria). A despolarização da membrana interna em mitocôndrias defeituosas impede a importação de PINK1, fazendo com que oligomerize na membrana externa no Complexo TOM onde se torna auto-fosforilado. Isso desencadeia a fosforilação fosfo-PINK1 de monoubiquitina da membrana externa e recruta PARKIN para que rapidamente as proteínas da membrana externa sejam poli-ubiquitinadas. Essa poliubiquitinação leva a degradação dos substratos da PARKIN, como por exemplo a MFN1 e MFN2 que promovem a fissão mitocondrial e a mitofagia (PARK et al., 2015; YOO; JUNG, 2018; ANDERSON et al., 2019). Os adaptadores LC3 (p62, OPTIN, NDP52, TAX1BP1e NBR1) são recrutados e ligam-se aos substratos poliubiquitinizados. Os adaptadores LC3 possuem um domínio que são reconhecidos pelo autofagossomo (YOO; JUNG, 2018).

A via independente de ubiquitina envolve a colina desidrogenase (CHDH). A CHDH em condições normais está presente tanto na membrana externa como na interna. Quando ocorre uma falha no potencial de membrana, a CHDH se acumula na membrana externa se liga a p62, formando um complexo CHDH-p62-LC3. Esse complexo é reconhecido por TBC1, membro da família do domímio 15 (TBC1D15), a RAB-GTPase é ativada formando um complexo com a TBC1D17. Esse complexo é reconhecido pelos adaptadores LC3 (YOO; JUNG, 2018).

A interação da LC3 com seus receptores pode ocorrer de forma direta. Anteriormente descrevemos os mecanismos em que a LC3 precisava de outras proteínas para a interação. Existem vários receptores para a LC3 na membrana externa sinalizando que são mitocôndrias danificadas para serem recrutadas por autofagossomos. Por exemplo, a NIX 1, que participa da mitofagia em condições de hipoxia (YUAN et al., 2017 *apud* YOO; JUNG, 2018).

O metabolismo energético que as mitocôndrias desempenham tem o papel principal na atividade celular, além de regular várias funções como apoptose, homeostase de Cálcio, e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (PICARD et al., 2011), regulam cascatas de sinalização intracelular, β oxidação de ácidos graxos, metabolismo dos aminoácidos, síntese de piridina, modificações de fosfolipídios, sobrevivência , senescência, entre outras (POPOV, 2020).

O excesso da ingestão calórica e o baixo consumo energético levam à uma menor demanda de ATP, fazendo que haja um aumento do gradiente de prótons. Este aumento resulta no aumento das EROs que promovem danos em proteínas, no DNA, em componentes lipídicos de membrana, aumentando a frequência de mutações e estimulando os processos inflamatórios, danos estes, devido a disfunção mitocondrial (COSTA, 2015). E é neste sentido, devido ao papel crítico e de múltiplas funções, a disfunção mitocondrial é diretamente e indiretamente implicada com a origem de diversas doenças, como a obesidade e diabetes melitus do tipo 2 (DM2) (BRAND; NICHOLLS, 2011). A obesidade tem sido associada com a diminuição da respiração mitocondrial, aumento de produção de EROs, desregulação da biogênese mitocondrial, diminuição da sinalização da mitofagia e aumento de apoptose (DE MELLO et al., 2018).

A desregulação da biogênese mitocondrias em especial em situações em que a biogênese não seja eficiente para manter o metabolismo energético a longo prazo, vias termogênicas são ativadas (DOS SANTOS, 2018).

Termogênese

A termogênese é definida como o processo de produção de calor em repouso e geralmente é o resultado do metabolismo basal. A termogênese constitutiva é suficiente para manter a temperatura corporal dos animais na termoneutralidade. No entanto, a maioria dos mamíferos possui um tipo especializado de tecido adiposo, denominado tecido adiposo marrom (TAM), cuja função é manter a temperatura em resposta às baixas temperaturas ambientais através de um processo denominado termogênese adaptativa sem tremores. O TAM é rico em mitocôndrias e a produção de calor é mediada por ativação e expressão da proteína 1 desacoplada (UCP-1), uma proteína específica na membrana interna das mitocôndrias que atua como um canal de prótons e desacopla a oxidação do substrato da síntese do ATP, levando à dissipação de energia como calor (CHERNOGUBOVA et al., 2005). Em resposta a baixas temperaturas, as vias simpáticas ativam o TAM através dos β3-

adrenorreceptores (LOWELL; SPIEGELMAN, 2000). Além disso, o sistema nervoso simpático também pode ser estimulado por dieta, estresse e inflamação, os quais levam a um aumento na termogênese (DE JONGE; BRAY, 1997; LOWELL; SPIEGELMAN, 2000; VAN MARKEN LICHTENBELT; SCHRAUWEN, 2011). Curiosamente, juntamente com a taxa metabólica basal e a termogênese induzida pelo exercício, a termogênese induzida pela dieta é um componente importante do gasto energético (GE) diário (YONESHIRO et al., 2011). Nesse sentido, evidências convincentes apontam para o tecido adiposo marrom (TAM) como um elemento regulador chave não apenas da temperatura corporal central, mas também do GE de corpo inteiro.

Em roedores, acredita-se que a termogênese contribua para aproximadamente 15% a 20% do GE diário total. Portanto, distúrbios nesse mecanismo podem ter um impacto considerável no balanço energético e na regulação do peso corporal (VAN MARKEN; LICHTENBELT; SCHRAUWEN, 2011). Apoiando essa noção, numerosos relatos em modelos de roedores e alguns estudos em humanos mostram que a ativação do TAM possui um papel protetor contra a obesidade e o diabetes (NEEDGAARD; BENGTSSON; CANNON, 2007; CHONDRONIKOLA et al.,2014). Como TAM também está presente em humanos adultos, o controle da termogênese adaptativa sem tremores recebeu recentemente grande atenção (VAN MARKEN et al., 2009; CYPESS et al., 2009; VIRTANEN et al., 2009). Nos seres humanos, adipócitos marrons estão localizados nas regiões cervical, supraclavicular, para-aórtica, paravertebral e adrenal (HUTTUNEN; HIRVONEN; KINNULA, 1981; VAN MARKEN et al., 2009). O aumento da produção de calor nessas regiões foi observado em trabalhadores escandinavos, indicando um aumento na função TAM em resposta ao frio (WIJERS; SARIS; VAN MARKEN; LICHTENBELT, 2009).

Em situações em que a biogênese mitocondrial não seja eficiente para manter o metabolismo energético a longo prazo, vias termogênicas são ativadas (DOS SANTOS, 2018).

A incapacidade das mitocôndrias em produzir ATP suficiente para a manutenção do metabolismo é definido como disfunção mitocondrial. Vários fatores influenciam nesta disfunção, entre eles, o aumento de EROs causado pelo excesso de nutrientes, o estresse do RE, idade, processos pró inflamatórios que de forma isolada ou em conjunto contribuem para a resistência à insulina (DOS SANTOS, 2016).

Alguns artigos discutem a relação entre ativação da termogênese do TAM e obesidade em roedores e humanos apoiando a relevância da termogênese adaptativa na regulação do balanço energético, tornando esse mecanismo um alvo interessante para o

desenvolvimento de estratégias terapêuticas que visam controlar o peso corporal e combater a obesidade (DULLOO et al., 1999; CARDEAL, 2015; MILESKI, 2018).

Estratégias terapêuticas com o objetivo de restaurar a função mitocondrial são uma promissora alternativa para indivíduos obesos, por esta razão tem sido extensamente explorado. A Food and Drug Administration (FDA) aprovou drogas que incluem: orlistat (reduz a absorção de gordura por inibição da lipase pancreática); locarsserina (receptor da serotonina agonista que atua no cérebro para reduzir a ingesta de alimento); liraglutida (receptor agonista glucagon ligado 1 que reduz a ingesta de alimento); dietilpropinol, fentermina, fendimetrazina e benzefetamina (drogas noradrenérgicas que funcionam como inibidores de apetite); fentermina- topiramate (supressor de apetite que libera serotonina, noradrenalina e dopamina); naltrexona- bupropiona (aumenta saciedade e diminui o apetite, inibindo a recaptura de dopamina e noradrenalina, bloqueando µ-receptor opioide e ativando a pro-opiomelanocorticóide) (GONZALEZ-MUNIESA et al., 2017). No Brasil os medicamentos aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) são: orlistat, a sibutramina (atua especialmente sobre a serotonina e a noradrenalina, promovendo a sensação de saciedade e o controle do apetite), o cloridrato de locarsserina, e a liraglutida. Entretanto, muitos tem a sua eficácia limitada em tratamento longo prazo, assim como apresenta sérios efeitos colaterais (YANOVSKI; YANOVSKI, 2014; KIM et al., 2014; KUMAR; BHANDARI, 2015).

Sintomas como insônia, irritabilidade, ansiedade, variação na pressão arterial, diarreia e xerostomia são alguns efeitos colaterais (YANOVSKI; YANOVSKI, 2014). Portanto, estratégias terapêuticas preventivas providenciam importantes alternativas no uso de drogas convencionais.

Neste contexto, identificar componentes naturais originados de alimentos, assim como o uso de plantas tem despertado um grande interesse nas últimas décadas. Isto principalmente pois eles apresentam redução nos efeitos colaterais e podem atuar em múltiplas vias de sinalização para controlar a obesidade (LAI; WU; PAN, 2017).

Polifenóis são compostos químicos que possuem uma ou duas hidroxilas ligadas a um ou mais anéis aromáticos, são os mais abundantes compostos bioativos presentes nos vegetais. São classificados de acordo com a sua estrutura em: ácidos fenólicos como por exemplo a ácido clorogênico presente no café; os estibilenos como o resveratrol presente nas uvas; as lignanas da linhaça, os flavonóides como as antocianinas presente em amoras e outros polifenóis como por exemplo as cumarinas presentes no aipo (LACROIX et al., 2018).

Eles são encontrados em abundância no reino vegetal e são classicamente estabelecidos como moléculas antioxidantes. Os efeitos antioxidantes observados são

atribuídos por suas características químicas e na capacidade de eliminar moléculas de carbono, radicais lipídicos e EROs (LAI et al., 2017).

Neste contexto, polifenóis são uma classe de componentes que são intensamente explorados por seus potenciais antiobesidade. Os mecanismos dos quais os produtos naturais protegem contra obesidade incluem a modulação da adipogênese, metabolismo de lipídeos, secreção de adipocinas, assim como a melhoria na sensibilidade a insulina e protetores da função mitocondrial (LAI; WU; PAN, 2017).

Efeitos dos polifenóis na modulação de biogênese mitocondrial

Considerando a relevância da mitocôndria na síntese de ATP e na alta demanda energética da maioria das células, é evidente que a biogênese mitocondrial é um processo particularmente importante.

Vários polifenóis demonstraram a capacidade de ativar SIRT1 *in vitro* e, portanto, estão sendo investigados como potenciais indutores de biogênese mitocondrial, através da ativação de desacetilação mediada por PGC-1α (LI et al., 2011).

Demonstrou-se que o resveratrol é eficaz na indução da atividade de PGC-1α no fígado e músculo de camundongos, facilitando a desacetilação mediada por SIRT1, que por sua vez ativa sua atividade transcricional (BAUR et al., 2006; LAGOUGE et al., 2006). Curiosamente, além do aumento da massa mitocondrial, o resveratrol melhora a taxa de sobrevivência (BAUR et al., 2006) e a função motora (LAGOUGE et al., 2006) de camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura. Embora os efeitos do SIRT1 / PGC-1α estejam bem documentados, há controvérsia quanto ao modo de ação do resveratrol. Vários autores propuseram que os efeitos do resveratrol na biogênese mitocondrial são mediados pela ativação da AMPK (proteina quinase) (STEINBERG; KEMP, 2009). De fato, há evidências de que os extratos se proliferam principalmente pela ativação da AMPK (CANTO et al., 2009), através da inibição de fosfodiesterases (PDE), ATP sintase ou complexo III de OXPHOS (GLENDHILL et al., 2007; HAWLEY et al., 2010; PARK et al., 2012). Além disso, foi proposto que o efeito do resveratrol na AMPK ativa indiretamente o SIRT1, aumentando os níveis intracelulares de NAD + (FULCO; SARTORELLI, 2008; CANTO et al., 2009).

Outros autores, no entanto, mostraram que o resveratrol ativa a SIRT1, o que leva à desacetilação da fígado quinase B1 (LKB1) e ativação da AMPK e melhoram a função mitocondrial *in vitro* e *in vivo* (HOU et al., 2008; LAN et al.; 2008; PRICE et.al., 2012).

Quercetina é outro polifenol encontrado na cebola por exemplo, tem sido extensivamente explorado e mostrou ser muito eficaz na indução de biogênese mitocondrial.

Estudo realizado por Nieman et al. (2010) demostrou que a quercetina foi responsável por ativar SIRT1 e PGC-1 α e aumentar o DNA mt e o conteúdo do citocromo C no músculo esquelético e no cérebro de camundongos. Também foi observado um aumento concomitante na resistência física dos animais tratados com quercetina, e esse efeito funcional foi relacionado ao aumento da expressão de SIRT1 e PGC-1 α .

O efeito da quercetina na biogênese mitocondrial e no exercício de resistência também foi estudado em indivíduos adultos jovens não treinados. Os autores observaram que a quercetina não apenas aumentou o número de cópias do DNA mt, mas também induziu um aumento significativo no desempenho físico (RAYAMAJHI et al., 2013). Resultados semelhantes também foram observados in vitro, nos quais o tratamento com quercetina aumentou o conteúdo de DNA mt (SCARPULLA, 2011) e os níveis de expressão de PGC-1a, NRF-1 e TFAM de maneira dependente da dose. Além disso, a quercetina aumentou a atividade do complexo IV de OXPHOS. Assim, os dados in vivo e in vitro apóiam a hipótese de que a quercetina induz a biogênese mitocondrial através da sinalização PGC-1α / NRF-1 e TFAM (LI et al., 2016). Como alternativa, o efeito da quercetina na biogênese mitocondrial também foi associado à sua capacidade de regular a via NRF-2 / HO-1 / PGC-1 α , bem como aumentar a expressão do complexo IV no fígado de ratos obesos (SCARPULLA, 2011; LIU et al., 2015). Também demonstrou-se que a quercetina aumenta o conteúdo do DNA mt, os níveis de expressão de SIRT1, PGC-1α, NRF-1 e TFAM de maneira dependente da dose no hipocampo de camundongos expostos à hipobaricipoxia (SHARMA et al., 2015). Além disso, a pesquisa aumentou a atividade dos complexos II, IV e V, bem como os níveis de ATP, regulando a função OXPHOS. Resultados semelhantes foram observados no hipocampo e estriado de roedores expostos ao alumínio. Nesse modelo, a quercetina induziu a biogênese mitocondrial pela via PGC-1 α / NRF-1-NRF-2-TFAM e restaurou a forma e o número mitocondrial (ZHU et al., 2010).

Além desses, outros polifenóis têm demonstrado capacidade de induzir efeitos semelhantes nas mitocôndrias *in vitro*. A ativação da biogênese mitocondrial mediada pela via SIRT1 / PGC-1α foi observada com isoflavonas (como daidzeína, genisteína e formononetina) nas células tubulares renais proximais de coelho (IM et al., 2012), flavonas (como baicaleína e wogonina) nas células musculares esqueléticas L6 (VALENTI et al., 2013) e flavan-3-ol, epigalocatequina-3-galato em fibroblastos da pele de indivíduos com síndrome de Down (REHMAN et al., 2014). A eficácia do chá verde na biogênese mitocondrial foi testada *in vivo* usando ratos. Os autores observaram um aumento no conteúdo de DNA mt, bem como nos níveis de RNAm e proteína de PGC-1α, complexo IV e TFAM (TAUB et al., 2012). Em um estudo em humanos com pacientes com DM2 com insuficiência cardíaca, a administração de curcumina aumentou as expressões de SIRT1 ePGC-1α, que por sua vez estimularam a

biogênese mitocondrial no músculo esquelético. Além disso, aumentou os níveis de porina e complexos mitocondriais I e V (TAUB et al., 2012).

O efeito benéfico do tratamento crônico da curcumina, um polifenol derivado de açafrão, na modulação da biogênese mitocondrial também foi descrito.

A curcumina aumentou a expressão da proteína PGC-1α no cérebro de camundongos através do acelerador de senescência 8 (SAMP8), aumentou o potencial da membrana mitocondrial (PMM) e os níveis de ATP. Além disso, restaurou o processo de fusão mitocondrial, indicando seu efeito protetor em doenças causadas pela disfunção mitocondrial (CHIN et al., 2014). De acordo com esses achados, outro estudo demonstrou que a suplementação com curcumina aumentou os níveis de PGC-1α, TFAM e emitiu complexos respiratórios condicionais, especialmente do complexo IV, e elevou os níveis de ATP no cérebro de camundongos mutantes da APO3 (DOS SANTOS et al., 2018). A Figura 4 resume as vias metabólicas estimuladas pelos polifenóis para ativar os biogênese mitocondrial.



Figura 4. Representação esquemática das vias metabólicas estimuladas pelos polifenóis para ativar a biogênese mitocondrial. PKA - proteína cinase A; CREB - proteína de ligação ao elemento de resposta AMP cíclica; PGC1α - co-ativador gama 1α do receptor ativado por proliferador de peroxissomo; AMPK - proteína-quinase AMP; SIRT1 - Sirtuin 1; NRF1 / 2 - fatores respiratórios nucleares 1 e 2; mtDNA - DNA mitocondrial; OXPHOS I-V - Complexos de fosforilação oxidativa I a V; TFAM - fator de transcrição mitocondrial A; P - fosforilação; AC - acetilação; ↑ - Indução de polifenóis. Fonte: dos Santos et al., 2018.

Efeitos dos polifénois na termogenêse

Artigos discutindo a relação entre ativação da termogênese do TAM e obesidade em roedores e humanos apoiaram a relevância da termogênese adaptativa na regulação do balanço energético, tornando esse mecanismo um alvo interessante para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que visam controlar o peso corporal e combater a obesidade (HUTTUNEN; HIRVONEN; KINNULA, 1981; DULLOO et al., 1999; NEEDGAARD; BENGTSSON; CANNON, 2007; CHONDRONIKOLA et al., 2014). Nesta perspectiva, os polifenóis provaram ser excelentes reguladores termogênicos. Em uma revisão realizada por Prasanth et al. (2019) mostra a eficiência dos extratos de chá verde no efeito protetivo como antioxidante, anti-hipertensivo, anti-inflamatório, anti-proliferativo, anti-trombogênico, dimunuindo a absorção de lipídeos intestinal, atua diminuindo o fotoenvelhecimento e neuroprotetiva. Estudos realizados por Borchardt e Huber (1975) demonstraram o efeito termogênico do cha verde. Os autores observaram um aumento de 4% no GE, um aumento na oxidação de carboidratos e gorduras e na excreção urinária de noradrenalina (NA). Considerando que os flavonóides inibem a catecol-O-metil transferase (COMT), uma enzima que degrada a NA, sugeriu-se que o chá verde possa interagir sinergicamente com o Sistema Nervoso Simpático (SNS), culminando no aumento da termogênese induzida por NA e na oxidação da gordura (CHEN et al., 2005). De fato, esse mecanismo foi observado por meio de microcalorimetria, que demonstrou as interações termogênicas sinérgicas entre a liberação neural simpática de NA, cafeína e epigalocatequinoalato (EGCG) (BERUBE-PARENT et al., 2005). Mais evidências de que a cafeína e o EGCG podem interagir para aumentar o GE também foram observadas em um estudo humano. Observou-se um aumento na resposta ao consumo de diferentes doses de cafeína, em comparação com os produtos de chá verde ou chá de oolong (DULOO et al., 1999).

Além disso, a análise de regressão sugeriu que a ingestão de produtos contendo cafeína associados ao EGCG promove um aumento ainda maior no GE, quando comparado à cafeína sozinha (DULLOO et al., 1999; RUDELLE et al., 2007; VENABLES et al., 2008; THIELECKE et al., 2010). Um outro estudo demonstrou que a resposta em si é um efeito genético da mistura de EGCG e cafeína em 24 h GE (VENABLES et al., 2008). Também foi descrito que as catequinas do chá verde mantêm a capacidade de aumentar o GE e a oxidação de gordura quando administradas mesmo na ausência de cafeína. Assim, foi demonstrado que um extrato de chá verde sem cafeína aumenta a oxidação de gordura durante o estresse de exercícios de intensidade moderada em homens jovens saudáveis (LONAC et al., 2011).

Curiosamente, a ingestão de um suplemento de EGCG disponível comercialmente foi eficaz no aumento da oxidação de gordura pós-prandial (GREGERSEN et al., 2009), mas

nenhum aumento no GE em repouso foi observado (GREGERSEN et al., 2009; HURSEL et al., 2009). Tomados em conjunto, esses dados sugerem a possibilidade de que, em humanos, os efeitos termogênicos do chá verde residam nas interações sinérgicas entre catequinas, cafeína e liberação simpática de NA (BERUBE-PARENT et al., 2005). Além disso, foi observado que os produtos de chá verde contendo cafeína e catequinas reduziram o quociente respiratório (indicativo de aumento da oxidação da gordura) (DULLOO et al., 1999; RUDELLE et al., 2007; VENABLES et al., 2008; PHUNG et al., 2010).

Os efeitos genéticos de alguns fatores podem estar relacionados, pelo menos por parte, à oxidação de gordura aumentada, que contribuem para ambos, a efetividade na perda de peso abdominal observada em ensaios clínicos (GRUENDEL et al., 2006; HURSEL; WESTERTERP-PLATENGA, 2009) e manutenção da perda de peso (ALBERDI et al., 2013).

Nos últimos anos, uma grande variedade de polifenóis foi investigada e sua eficácia na indução de termogênese e oxidação de ácidos graxos também foi demonstrada. Em uma revisão realizada por Okla et al. (2017) demostram que alguns polifénois podem atuar na termogênese por três vias: por ativação dos receptores β adrenérgicos que estimulam o aumento do TAM; por modulação epigenética, possibilitando a transformação de TAB em Tecido adiposo bege presentes no tecido adiposo subcutâneo e por estimulação da biogênese mitocondrial e por fim através de surgimento de novos adipócitos beges provenientes de células progenitoras de adipócitos.

Foi demonstrado que uma preparação de fibra alimentar insolúvel, rica em polifenóis isolados da alfarroba, aumenta a GE pós-prandial e reduz o quociente respiratório (KU et al., 2016). O resveratrol e a quercetina também demonstraram ter um efeito termogênico. O tratamento com resveratrol resultou em um aumento no número de cópias do DNA mt junto com um aprimoramento no GE (BAUR et al., 2006). Além disso, foi demonstrado que a suplementação com resveratrol reduziu a gordura corporal, bem como aumentou a termogênese, aumentando a massa mitocondrial e as expressões de UCP1 e PGC-1α (LAGOUGE et al., 2006; DAVIS et al., 2010). Um efeito semelhante foi relatado em outro estudo, no qual os autores observaram um aumento na expressão da proteína UCP1 após o tratamento com resveratrol (DECORDE et al., 2009; PAN et al., 2019).

Nesses estudos, as alterações observadas na expressão de UCP1 nos tecidos adiposos enfatizam fortemente que os efeitos desses compostos na GE são resultados da ativação da termogênese, sem tremores, nos adipócitos marrons. A suplementação de quercetina levou a um aumento na densidade mitocondrial (RAYAMAJHI et al., 2013) e aumentou a resistência sem treinamento prévio (HOLLIS, 2009).

Relatórios sobre a eficácia desses polifenóis na taxa metabólica, oxidação do substrato e gasto de energia em humanos ainda são escassos, mas é um campo promissor de investigação, considerando os efeitos benéficos dos extratos de uva (ricos em resveratrol e quercetina) na prevenção da obesidade (OI-KANO et al., 2008) e na redução do ganho de peso (EJAZ et al., 2009). Estudos com oleuropeína, um composto fenólico encontrado em óleo de oliva extra virgem, foram mostrados para aumentar a secreção de pololaminas e aumentar a expressão de UCP1(EJAZ et al., 2009). Além disso, o polifenol de limão (hesperidina) suprimiu a obesidade induzida pela dieta associada à indução de genes relacionados à oxidação lipídica (CHO et al., 2010). A suplementação de polifenóis, como curcumina e ácido clorogênico, levou a uma redução no peso corporal e adiposidade, aparentemente sem diminuir a ingestão de alimentos, aumentando assim a possibilidade de que os compostos possam expressar seus efeitos anti-obesidade por meio de um estímulo de GE (ORGAARD; JENSEN, 2008; CRESPILLO et al., 2011).

Da mesma forma, a redução no acúmulo de gordura corporal pela suplementação alimentar de isoflavonas de soja foi descrita (CEDERROTH et al., 2007). Benefícios similares foram observados com a daidzeína também encontrada na soja e seus derivados, em que seu tratamento levou à redução de peso aumentando a expressão de UCP1 (DA -SILVA et al., 2007). Além disso, foi demonstrado que dieta com fitoestrogênios ajudam a manter um fenótipo magro, e essa atividade é atribuída a um GE aumentado associado a uma acentuada oxidação de ácidos graxos (HUGHES et al., 2008). Finalmente, o kaempferol, um flavonóide (encontrado em brócolis, espinafre, frutas vermelhas), demonstrou aumentar o GE celular, além de ativar o hormônio tireoidiano através da estimulação da atividade da desiodinase tipo 2 (DA -SILVA et al., 2007). Com base nesses achados, existe uma forte possibilidade de que o uso de polifenóis para aprimorar a termogênese independente e dependente de UCP1 sejam relevantes para combater a obesidade nos próximos anos. Isso é reforçado por um relatório de um estudo de coorte longitudinal realizado durante um período de 14 anos na Holanda, sugerindo que o aumento da ingestão de flavonóides na dieta está associado a um menor ganho de peso em mulheres (HUGHES et al., 2008). A Figura 5 resume as vias metabólicas estimuladas pelos polifenóis para as vias metabólicas estimuladas pelos polifenóis para ativar a termogênese.

Estudos realizados por Pang, Choi e Park (2008) com indução à obesidade com dieta hipercalórica em camundongos e suplementados com o extrato de erva-mate (*llex paraguariensis*) demonstraram uma atenuação na adiposidade com o aumento da expressão da UCP2 e UCP3 no tecido adiposo branco dos ratos obesos, além do aumento na expressão de e AMPK em gordura visceral de animais obesos.

Estudos realizados por Arçari et al. (2011) mostraram camundongos que receberam dieta hipercalórica e depois tratados com o extrato da erva-mate apresentaram perda de peso sem a redução da ingesta de alimento. Apresentaram também uma melhora expressão na PDG-1 e UCP do tecido adiposo marrom, além de melhora na sinalização da via IRS/AKT que é uma via envolvida com o metabolismo da glicose. Outro importante resultado obtido foi que a erva mate tem um potencial anti-inflamatório, pela redução do fator de transcrição NF-KB, inibindo TNF- α hepático e restaurando no fígado e no músculo a sinalização da insulina em camundongos obesos.

Bérebé-Parent et al. (2005) testaram a mistura dos extratos do chá verde com concentrações diferentes com o extrato do guaraná que apresenta cafeína em uma dose fixa durante 24 horas. O chá verde é rico catequinas, epicatequinas, epicatequina 3- galato, epigalocatequina e epigalocatequina 3- galato (EGCG) e o guaraná é rico em cafeína. O estudo realizado em homens com IMC entre 20 e 27 kg/m², observaram um aumento da pressão arterial e no GE indicando essa mistura como complementação nos programas de emagrecimento.

Estudo realizado com chá preto (*Camellia sinensis*), cafeína e guaraná com homens com IMC entre 20 e 30 kg/m² observou-se um aumento no metabolismo independente do substrato e elevação da pressão arterial para os indivíduos que receberam cafeína (ROBERTS et al., 2005).

Ray et al., (2005) testaram por 12 meses um Sistema Nutricional associado com extratos das ervas *Citrus*, *Ephedra*, *Ginko*, Guaraná, chá verde e *Ocimum* para verificar a ação sobre o coração de fêmeas B6C3F1. Foram verificados parâmetros bioquímicos e histológicos, e observou -se que não ocorreram alterações ao longo dos 12 meses com consumo de efedra e cafeína.



Figura 5. Representação esquemática das vias metabólicas estimuladas pelos polifenóis para ativar a termogênese. NA - noradrenalina; AMPc - adenosina monofosfato cíclico; PGC1 α - co-ativador gama 1 α do receptor ativado por proliferador de peroxissomo; FA - oxidação de ácidos graxos; oxidação β - oxidação beta; UCP-1 - desacoplando a proteína 1; \uparrow - Indução de polifenóis. Fonte: dos Santos et al., 2018.

Efeitos da erva-mate e guaraná na modulação de biogênese mitocondrial

Dentre os vegetais que possuem vários principios bioativos é a *llex paraguariensis* conhecida como erva-mate que pertence a famíllia Aquifoliaceae, é uma espécie nativa das regiões subtropicais e temperadas da América do Sul, muito consumida no sul do Brasil em bebidas como chá através de infusão, chimarrão e tererê (PRZYGODDA et al., 2010).

Estudos sobre composição química da erva-mate não tostada apontam para a presença de alcalóides (metil xantinas como cafeína e teobromina), flavonóides (quercetina e rutina), vitaminas como A, complexo B, vitaminas C e E, bem como taninos, ácidos fenólicos (ácidos clorogênicos) e seus derivados, além de numerosas saponinas triterpênicas derivadas do acido ursólico, conhecidas como matesaponinas (BRACESCO, 2011). A metil xantina presente na erva-mate apresenta função estimulante, lipolítica e termogênica (ARÇARI et al., 2009, 2011). As saponinas têm potencial hipocolesterolêmica (BASTOS et al., 2007). Os compostos fenólicos apresentam função antioxidante (MIRANDA et al., 2008) antimicrobiana (MARTIN et al., 2013). Na revisão realizada por Bracesco et al.(2011) mostra que os extratos de erva-mate tostada mantém essencialmente os mesmos componentes, com adição de melanoidinas, o qual apresenta algumas propriedades bioativas próprias.

Estudos realizados por Arçari et al. (2009) observaram os efeitos benéficos do uso de erva-mate no combate a obesidade induzida por dieta em camundongos, indicando que o uso de erva mate por 60 dias melhorou a dislipidemia, redução de peso, resistência a insulina e a expressão de vários genes ligados à obesidade como: TNF-α, IL-6, PAI-1, leptina, angiotensina, adiponectina e PPAR-γ no tecido adiposo.

O guaraná (*Paullinia cupana*) é uma planta originária do Brasil, rica em metilxantinas como cafeína, teobromina e teofilina e em flavonóides como taninos, saponinas, catequinas, epicatequinas, proantocianinas e traços de outros compostos (CARVALHO et al., 2016). Alguns trabalhos sugerem que o guaraná exibe efeitos similares aos observados no chá verde e chá preto, e devido suas propriedades benéficas, o interesse pelo seu estudo vem ganhando destaque.

Na literatura, é escasso o número de trabalhos que avaliam os efeitos do guaraná no tratamento da obesidade e/ou doenças associadas. Dados obtidos em experimentos *in vitro* mostram que o guaraná apresenta efeito anti-adipogênico em células 3T3L1. Diferentes concentrações de guaraná (100, 150, 200 e 300µg/mL) foram capazes de diminuir o acúmulo de triglicerídeos após 96 horas. Estas mesmas doses não interferiram na viabilidade celular.

Além disso, foi observado aumento da expressão dos genes Wnt10b, Wnt3a, Wnt1, Gata3 e Dlk1, e diminuição da expressão de Pparγ e Creb1, bem como maior translocação nuclear de β-catenina. Todos esses dados sugerem que este composto pode apresentar um efeito modulador na expressão de genes envolvidos com o processo de adipogênese e estas modificações em conjunto levariam a diminuição deste processo *in vitro* (LIMA et al., 2017).

In vivo, o guaraná já apresentou alguns resultados benéficos. Krewer et al. (2011) testou a influência do consumo de guaraná sobre parâmetros de saúde de 637 idosos (>60 anos). Os resultados demonstraram que a prevalência de hipertensão, obesidade e síndrome metabólica foi menor no grupo que consumia guaraná frequentemente quando comparado ao grupo que não fazia consumo de guaraná com frequência. Previamente, Santos et al. (2014) demonstraram em cultura de células 3T3L1 que a associação de erva-mate, guaraná e damiana ("YGD") foi capaz de reduzir a expressão de genes pró-adipogênicos como Cebpα, Adig, Pparγ e aumentar a expressão de genes anti-adipogênicos como KIf2 e Ucp1. Outro trabalho demonstrou que a administração de "YGD" antes de uma refeição em pacientes com sobrepeso esteve associada a um menor consumo de alimentos, tanto no que diz respeito à quantidade de gramas ingeridas, quanto ao consumo calórico destes indivíduos (HARROLD et al., 2013).

O guaraná tem sido associado com a perda de peso, mostrando vários efeitos protetores contra hipertensão, obesidade e síndrome metabólica (KREWER et al., 2011), com capacidae de reduzir a ingesta de alimento (HARROLD et al., 2013) e modulando os genes relacionados a adipogênese (LIMA et al., 2017). Além disso, já foi demonstrado que uma mistura de extrato de guaraná e chá verde contendo uma dose fixa de cafeína (200 mg) e doses variáveis de EGCG aumentou o GE (medido em uma câmara metabólica para mensuração gasto de energia de 24 h) em adultos saudáveis (BÉRUBÉ-PARENT et al., 2005).

A busca por compostos naturais que possam reduzir ou prevenir a adipogênese, diminuindo assim o peso corporal sem os efeitos colaterais vem crescendo mundialmente (COLLITTI; GRASSO, 2014).

E é neste sentido, que o presente trabalho vem colaborar com o desenvolvimento do conhecimento científico sobre a ação do guaraná que no Brasil tem sido comercializado como suplemento de redução de peso, mas existem poucos estudos sobre o papel do guaraná no metabolismo dos lipídios (LIMA, 2005) e da erva mate com poucos trabalhos sobre o efeito na biogênese mitocondrial e termogênese.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos da erva-mate e do extrato aquoso do guaraná sobre a biogênese mitocondrial e termogênese.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a ação da erva-mate *in vitro* e *in vivo* sobre a função mitocondrial, biogênese mitocondrial e termogênese. (Capítulo I) Yerba Mate Stimulates Mitochondrial Biogenesis and Thermogenesis in High Fat Diet-Induced Obese Mice.

 Avaliar o efeito do guaraná na biogênese mitocondrial e na termogênese em camundongos com dieta hiperlipídica. (Capítulo II) Guarana (*Paullinia cupana*) Stimulates Mitochondrial Biogenesis in Mice Fed High-Fat Diet

CAPÍTULO I: ARTIGO PUBLICADO

dos Santos, T. W., Miranda, J., Teixeira, L., Aiastui, A., Matheu, A., Gambero, A.,Portillo, M. P.,Ribeiro, M. L., *Mol. Nutr. Food Res.* 2018, 62, 1800142. https://doi.org/10.1002/mnfr.201800142

O Artigo apresenta os efeitos potenciais da erva-mate (YM) na biogênese e termogênese mitocondrial. Foram realizados experimentos *in vitro* e *in vivo*.

No experimento *in vitro* teve o objetivo de verificar os efeitos de YM na respiração mitocondrial em células C2C12, estas células são mioblastos C2, células derivadas das células satélites de camundongos adultos. A expressão de genes relacionados à biogênese e termogênese mitocondrial foram analisados e quantificados PCR.

Os experimentos *in vivo* foram realizados em camundongos Swiss alimentados com uma dieta rica em gordura (HFD) e tratados com extrato de YM. A calorimetria indireta, e a expressão de genes e proteínas relacionados à biogênese mitocondrial, termogênese e lipogênese de novo foram determinadas por PCR quantitativo e western blot.

Os resultados *in vitro* indicam que o YM aumentou o número de cópias do DNA mt, bem como a capacidade respiratória de reserva mitocondrial e a eficiência de acoplamento. O perfil de expressão gênica reforça essa evidência, indicando uma modulação de genes a jusante do Ampk. *In vivo*, verificamos que o YM preveniu parcialmente a obesidade induzida por dieta, aumentando o gasto de energia e aumentando a biogênese mitocondrial através da via AMPK / SIRT1 / PGC1α.

Portanto YM estimula a mitocondriogênese e a expressão de UCPs, levando a um aumento da capacidade respiratória de reserva e dissipação de energia. Esses efeitos podem ajudar a entender melhor o uso potencial de YM para o tratamento da obesidade.
Molecular Nutrition & Food Research

Tanila Wood dos Santos^{1,2*}, Jonatan Miranda^{3,4*}, Lucimara Teixeira¹, Ana Aiastui⁵, Ander Matheu⁵, Alessandra Gambero¹, María P. Portillo^{3, 4}, Marcelo Lima Ribeiro^{1*}.

¹Unidade Integrada de Farmacologia e Gastroenterologia, Universidade São Francisco, Bragança Paulista, São Paulo, Brazil. ²Programa de Pos Graduação em Genetica e Biologia Molecular, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil. ³Nutrition and Obesity Group, Department of Nutrition and Food Science, University of the Basque Country (UPV/EHU) and Lucio Lascaray Research Institute, Vitoria, Spain. ⁴CIBERobn Physiopathology of Obesity and Nutrition, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spain.⁵Neuroscience Area, Biodonostia Health Research Institute, San Sebastian, Spain.

^{*}Both authors contributed equally and should be considered first authors.

*Correspondence Marcelo L Ribeiro, Ph.D Avenida São Francisco de Assis, 218 Bragança Paulista-SP, Brazil. Zip Code 12916-900 Phone: +55 11 24548982 Email: <u>ribeiroml@hotmail.com</u>

List of Abreviations: Brown adipose tissue (BAT); cytochrome c oxidase I subunit (Cox1); extracellular acidification rates (ECAR); free fatty acids (FFA), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh); high-fat diet (HFD; insulin resistance (IR); mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS); peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (Pgc1 α); sirtuin-1 (Sirt1); type 2 diabetes (T2D); uncoupling proteins (UCPs); yerba mate (YM); World Health Organization (WHO).

Keywords: *de novo* lipogenesis; *Ilex paraguariensis*; Mitochondrial biogenesis; Obesity; Thermogenesis.

Received: MONTH DD, YYY; Revised: MONTH DD, YYY; Accepted: MONTH DD, YYY

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the <u>Version of Record</u>. Please cite this article as <u>doi:</u> 10.1002/mnfr.201800142.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

ABSTRACT

Accepted Article

Scope. The potential effects of yerba mate (YM) on mitochondrial biogenesis and thermogenesis was evaluated. **Methods and results**. The *in vitro* effects of YM on mitochondrial respiration were assessed in C2C12 cells. The expression of genes related with mitochondrial biogenesis and thermogenesis were analyzed by quantitative-PCR. The *in vivo* experiments were performed in mice fed a high-fat diet (HFD), and treated with YM extract. Indirect calorimetry was performed, and the expression of genes and proteins related to mitochondrial biogenesis, thermogenesis and *de novo* lipogenesis were determined by quantitative-PCR and western blot. Our *in vitro* data indicates that YM increased mtDNA copy number as well as mitochondrial spare respiratory capacity and coupling efficiency. The gene expression profile reinforces this evidence, indicating a modulation of genes downstream of Ampk. *In vivo*, we found that YM partially prevented diet-induced obesity by increasing energy expenditure and enhancing mitochondrial biogenesis and Ucps expression, leading to an increase in spare respiratory capacity and energy dissipation. These effects may help to better understand the potential use of YM for the obesity treatment.

www.mnf-journal.com

Mechanisms of YM extract on tissues after HF feeding. Mate extract redirects free fatty acids (FFA) from liver and brown adipose tissue towards skeletal muscle. In main oxidative tissues, brown adipose tissue and muscle, the extract increase mitochondria biogenesis and thermogenesis. In liver, YM reduces de novo lipogenesis and fatty acid transport to mitochondria



www.mnf-journal.com

1. INTRODUCTION

Obesity is a serious and growing worldwide health problem. It has been recognized as a major risk factor for the development of chronic diseases and premature death. Data from the World Health Organization (WHO) estimate that by 2025 the global prevalence of obesity will be 21% in women and 18% in men ^[1]. Obesity is believed to have a multifactorial etiology arising from a complex combination of factors such as environment, lifestyle, and interaction with genetic factors. The condition is strongly associated with increased risk of developing chronic diseases such as hypertension, type 2 diabetes (T2D), heart disease and cancer ^[2].

Skeletal muscle metabolic function is primordial in maintaining health and quality of life. The T2D development has been directly associated with insulin resistance (IR), and skeletal muscle plays an important role in whole-body IR ^[3]. In this line lipid deposition in muscle has been proposed as one of the causes of IR ^[4]. Considering that fatty acid oxidation, energy expenditure and redox balance take place in mitochondria, they have been studied in order to explain the onset of IR in skeletal muscle. The available data suggest that both a decrease in mitochondrial fatty acid oxidation due to mitochondrial dysfunction and/or an enhancement in mitochondrial oxidant production contribute to IR development in skeletal muscle ^[5].

Mitochondrial biogenesis results crucial for thermogenesis control in both skeletal muscle and brown adipose tissue (BAT), ^[6]. It is believed that thermogenesis is dependent on the activation of uncoupling proteins (UCPs), which converts of the driving force of adenosine triphosphate (ATP) synthesis into heat thought uncoupling oxidative phosphorylation in the mitochondrial inner membrane ^[7]. In fact, mitochondrial dysfunctions are identified as causing factor of thermogenesis failures in obesity ^[8].

Therapeutic strategies commonly used to control obesity and T2D include physical exercise, diet, pharmacological treatments, and changes in lifestyle. With regard to the diet, natural compounds acting on multiple mechanisms such as satiety modulators, lipid metabolism, anti-adipogenic, thermogenic and others, have been used in the prevention and treatment of obesity ^[9]. Recent studies have also shown the potential effects of some natural compounds on the improvement of thermogenesis and mitochondrial function. Stimulation of mitochondrial biogenesis in this context plays an important role for the success of weight loss by promoting an increase in energy expenditure ^[9-11].

Ilex paraguariensis, commonly known as yerba mate (YM), is popularly cultivated and consumed in countries of South America such as Paraguay, Uruguay and southern Brazil ^[12]. Several studies have demonstrated its therapeutic efficacy as antioxidant, antiinflammatory, immunomodulatory, anticancer, improvement of glycemic and lipid metabolism, reduction of cardiovascular risk and reversion of insulin resistance ^[12, 13, 14, 15]. In previous studies conducted by our group, we evaluated the anti-obesity potential of YM, which proved to be an effective adjuvant in weight loss, modulating the adipogenesis ^[14-18]. Furthermore, we showed that YM treatment improves obesity-induced IR in liver and muscle ^[14, 18], which could be attributed to YM effect on PI3K-AKT pathway ^[18]. Considering the role of mitochondria dysfunction in obesity and IR, in the present study we evaluated the potential *in vitro* and *in vivo* effects of YM on thermogenesis and mitochondrial biogenesis.

2.

3. MATERIAL AND METHODS

2.1 Yerba mate extract

Aqueous extract of YM used in this work contains 348.80 + 16.35 mg/g of total phenolic compounds ^[16]. Chemical characterization of the aqueous extract was previously determined by UPLC-MS / MS (ultra performance liquid chromatography-mass

spectrometry) and indicated the presence of dicafeoylquinic acid isomers (65.76%), caffeoylquinic acid isomers (cryptochlorogenic acid, neo-chlorogenic acid, 3,4-dicaffeoylquinic acid, and 3,5-dicaffeoylquinic acid) (16.15%), rutin (10.86%), caffeoyl shikimic acid isomers (2.70%), quinic acid (1.90%), feruloylquinic acid (1.62%), caffeic acid (0.38%), dicaffeoyl shikimic acid isomers (0.33%) and caffeoyl-glucose (0.30%)^[16].

2.2 Myoblast culture and experimental design

The C2C12 cell line was purchased from the Rio de Janeiro Cell Bank (Rio de Janeiro, Brazil) and it was cultured to confluence in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine (FBS) 1% serum and of penicillin/streptomycin/glutamin at 37°C and 5% CO₂. The cells were previously plated and incubated for 5 hours at 37°C. Subsequently, aqueous extracts of YM were added to cells at 0, 150 and 200 µg/mL for 24 h. The doses were chosen based on our previous studies demonstrating these are effective and non-cytotoxic in 3T3-L1 cells ^[16, 19, 20]. After incubation, the cells were collected from three independent experiments and stored at -80°C for gene and protein analysis.

2.3 Measurement of Oxygen Consumption Rates

Oxygen consumption rates (OCR) and extracellular acidification rates (ECAR) were measured with the XF Cell Mito Stress kit (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA) using XFe96 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience), and the analyzes were run according to the manufacturer's specifications. Briefly, the myoblasts were plated onto 96well XF microplates (Seahorse Bioscience), and after 6 h YM extract was added at 0, 100, 150 and 200 μ g/mL followed by a further incubation for 12 h. OCR was performed following the injection of oligomycin (1 μ M), FCCP (1 μ M p-trifluorethoxyphenylhydrazone carbonyl cyanide), rotenone and antimycin A (1 μ M and 2 μ M, respectively) (Sigma). The following parameters of mitochondrial function were calculated: basal OCR, ATP-inked OCR, proton leak OCR, maximal OCR, reserve capacity and non-mitochondrial OCR. Spare respiratory capacity was calculated by subtracting the basal rate from the maximal rate. Coupling efficiency was calculated by dividing the fraction of basal mitochondrial oxygen consumption used for ATP synthesis by the basal rate [²¹]. Data were collected from three independent experiments (each with eight replicates), and the data analysis were performed in the XFReader (Seahorse Bioscience) software.

2.4 Animals and experimental design

Experimental protocol was developed according to the principles determined by the Brazilian College of Animal Experimentation and was approved by the Ethics Committee of the São Francisco University, Bragança Paulista, São Paulo, Brazil (002.10.2014). Fifteen, 6-week-old, pathogen-free, male, Swiss mice (Sw/Uni) (22.5 \pm 2.5 g) were obtained from CEMIB (State University of Campinas, Campinas, SP, Brazil), and kept in a light / dark cycle of 12 hours, temperature 22°C \pm 3 and humidity 55% \pm 3, with free access to water and food. The YM powder (Leao Jr, Curitiba, Parana, Brazil) used to prepare the YM extract was stored in a ventilated environment that was protected from light at room temperature. All experiments were performed using the same batch. To avoid the compounds degradation, YM extract was prepared each day by dissolving YM powder in pure water and daily administered via gavage using an orogastric cannula.

After randomization, the mice were given either a standard (SD, n = 5) or a high-fat (HFD, n = 10) diet for 16 weeks (Diet composition is shown in Supplementary Table 1).

After the first 8 weeks, the animals fed with HFD were redistributed in two groups in accordance with the treatment: (1) a group received an aqueous extract of YM (1.0 g.kg⁻¹) (HFD+YM; n=5), and (2) a group who received the vehicle (HFD; n=5). Daily food consumption was recorded. The body weight was measured twice weekly.

Between the 5th and the 6th week of treatment, indirect calorimetry was performed using the Oxylet/Physiocage system (Panlab, Barcelona, Spain). Initially, the animals were individually placed in respiratory chambers for 24 h for acclimatization, followed by 24 h of analysis in which O_2 (%) and CO_2 (%) were measured every 9 min. The Software Metabolism (Panlab) calculated the O_2 consumption, CO_2 and energy expenditure (kCal/h/kg^{0.75}).

At the end of experiments, the animals were euthanized with a 1: 1 mixture of 100 mg/mL Ketamine and 2% Xylazine in the volume of 0.1 mL for each 100 g of body weight and had the tissues collected and stored at -80°C.

2.5 Biochemical analysis

The lipids were extracted from the fresh liver homogenate using Folch's method and the extracts evaporated in a vacuum and weighed. Total fat content was calculated as an absolute value and as a percentage of the final body weight.

2.6 RNA extraction and quantitative real-time PCR

Total RNA extraction, cDNA synthesis and quantitative PCR were performed as previously described ^[20], using specific primers (Supplementary Table 2). Real-time PCR was performed in a 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems). The expression of 18S rRNA was used as endogenous control for data normalization. The results were analyzed using the $2-\Delta\Delta Ct$ relative quantification method.

2.7 Mitochondrial DNA (DNAmt) content analysis

Mitochondrial DNA (mtDNA) quantification was performed by quantitive PCR as previously described ^[22]. Briefly, initially total DNA from C2C12 cells and mice muscle and BAT were extracted by phenol/chloroform protocol. Following, the mtDNA content was evaluated by means of quantitative PCR by measuring *Cox1* (cytochrome c oxidase I subunit) using *18S rRNA* gene was used as control (Supplementary Table 2).

2.8 Western blotting analysis

Western blots were performed following standard procedures. Total protein was extracted with lysis buffer, and 50 µg of the protein was separated in SDS-PAGE gel followed by transfer to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Total OXPHOS Rodent WB Antibody Cocktail at 1:500 was used to determine the expression levels of mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) complexes (I to V) (Abcam). Total and phosphorilated AMP-activated protein kinase, cluster of differentiation 36, uncoupling proteins 1 and 3, (AMPK, p-AMPK, CD36, UCP1 and UCP3) (Abcam, MA, USA), as well as peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1a) (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) and NAD-dependent deacetylase sirtuin-1 (SIRT1) (Cell Signaling Technology, MA, USA) were detected with specific antibodies (1:500 dilution). HRP-linked anti-rabbit or HRP-linked secondary antibodies (DAKO Corporation, Hamburg, Germany) were used at a 1:2000 dilution. Signal was detected by chemiluminescence using ECL substrate (Amersham Bioscience; Little Chalfont, England). All protein measurements were normalized by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and expressed as relative optical density.

2.9 Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). After confirming the normal distribution of variables, differences among groups were determined by Student's t-test for the comparison of two groups or one-way analysis of variance (ANOVA) following Tukey's multiple comparison using SPSS 12.0 software and statistical significance was defined as p < 0.05.

4. **RESULTS**

3.1 YM stimulates mitochondrial function in vitro

Our data indicate an increase in mitochondrial spare respiratory capacity and coupling efficiency in C2C12 cells after YM treatment (Figure 1A, B and C).

Further analysis revealed that YM treatment (150 and 200 µg/mL) increased mtDNA copy number (Figure 1D), which suggests that increased mitochondrial biogenesis may underlie the ability of YM to improve mitochondrial function. Gene expression profile reinforces this evidence, indicating a modulation of genes downstream of *Ampk*, including *Creb1*, *Tfam* and *Nrf1* after treatment with 150 µg/mL of YM. Similar results concerning *Creb1* and *Tfam* were observed after treatment with 200 µg/mL. However, the *in vitro* data showed no regulation of *Pcg1a* and *Sirt1*. Additionally, we also observed a significant increase in *Ucp3* gene expression (Figure 1E).

3.2 YM increase energetic expenditure and thermogenesis and decreases de hepatic novo lipogenesis

In view of the *in vitro* results, we decided to check whether YM was able to regulate energy expenditure and thermogenesis in a high-fat-induced obesity model. After eight weeks on a HFD, the animals exhibited a significant increase in body weight compared with those fed a standard diet (Figure 2A). At the end of the 16^{th} week, total body weight was lower in the SD group (43.60 ± 1.95), compared with HFD group (67.60 ± 6.27). The regular ingestion of YM for 8 weeks significantly reduced the final body weight (HFD-YM: 60.00 ± 3.16) (Figure 2A). This weight loss was not related to a reduction in food intake. The HFD–YM group exhibited significantly less epididymal, perirenal, subcutaneous and mesenteric fat than did the mice in from the HFD group (Table 1).

Indirect calorimetry data indicated a significant reduction in respiratory quotient, energy expenditure and estimated thermogenesis in HFD group compared to the SD group (Figure 2B). Interestingly, after treatment the HFD-YM group showed a significant improvement in the parameters evaluated in comparison with HFD group, indicating that the treatment was able to increase the metabolic rate in the proposed model. (Figure 2C, D and E).

With regard to skeletal muscle, the higher mitochondrial content (Figure 3A) as well as the increased gene expression of *Creb1*, *Tfam*, *Pgc1a*, *UCP3*, *Sirt* and *Nrf1* and protein expression of SIRT, p-AMPK/AMPK, UCP3 and OXPHOS demonstrated that YM promote the increase of mitochondrial number (Figure 3B, C and D) as well as fatty acid oxidation (Figure 5A). HF feeding raised the gene expression of *Cd36*, *Fatp1* and YM treatment maintain or even increased it (Figure 5A).

BAT oxidative pathway seems to be enhanced after YM treatment. HFD-YM group showed significantly increased mtDNA content, when compared to SD or HFD groups (Figure 4A). Although YM has no effect on *Cpt1b* mRNA levels (Figure 5B), thermogenesis was stimulated by YM, as demonstrates *Creb1*, *Tfam*, *Pgc1a*, *Ucp1*, *Ucp3*, *Sirt* and *Nrf1* gene expression, and SIRT, p-AMPK/AMPK, UCP1, UCP3 and OXPHOS protein expression levels (Figure 4B, C and D). In term of fatty acid up-taking, BAT has a different pattern of

response to YM comparing with skeletal muscle. After HF feeding, YM was able to decrease *Lpl*, *Cd36*, *Fatp1* gene expression (Figure 5B).

In addition, YM intake decreased fat accumulation in liver. A depth analysis of this organ revealed that the polyphenol-rich extract was able to reduce gene expression of transcriptional factors controlling *de novo lipogenesis* process (*Srebf1, Sp1, Chrebf*), as well as the limiting enzyme of the pathway, *Acaca* (Figure 5C). Moreover, according to *Cd36*, *Fatp5, Acls1* and *Acls5* mRNA levels, HF feeding promoted a fatty acid uptake increase. This effect was blocked by YM. Similarly, YM reverted *Cpt1a* induction of HF diet feeding. (Figure 5C).

5. DISCUSSION

Natural compounds have been widely used as adjuvants for weight loss, and several evidences have demonstrated their effectiveness in obesity management ^[10, 23]. In this sense, YM has been studied and the benefits reported so far include: inhibition of adipogenesis, weight loss, fat depot reduction and improvement of lipid profile ^[15-17, 23, 24].

In recent years, some studies have demonstrated that food bioactive compounds are able to enhance mitochondrial spare respiratory capacity ^[25]. Taking this in mind, we evaluated in C2C12 myoblasts the potential positive effect of YM on mitochondrial function, and we showed that YM was able to increase the mitochondrial spare respiratory capacity at doses of 150 and 200 μ g/mL in these cells. As in the case of other plant-rich polyphenols ^[26], it seems that YM induced this effect by increasing mitochondrial biogenesis and thermogenesis.

Although this information is relevant for the scientific community, due to high doses used in cell cultures, its applicability is limited. Considering that the same strategy has been also used before ^[27], it should be highlighted the relevance of the high doses used in cell

www.mnf-journal.com

Page 13

experiment to go through the mechanism of action of YM. Next, we tried to confirm the *in vitro* results in an *in vivo* experiment conducted in obese mice. Obesity is a good model to explore the potential effect oxidative effect of YM because this disease is characterized by imbalances in cellular metabolism, including a decrease in the oxidative capacity of energetic substrates to produce ATP, which directly interfere with the respiratory quotient, and leads to a decrease in basal energy expenditure ^[10, 28]. In good accordance with the results reported by other authors ^[29], our results indicates that mice fed with the HFD and treated with YM showed significantly higher energy expenditure than mice fed with the HFD alone. In order to explain the observed effects on energy expenditures and to confirm the mechanism proposed for myoblast cultures, skeletal muscle was analyzed.

At cellular level, mitochondria can regulate the whole-body energy metabolism by controlling energy expenditure in skeletal muscle, the main determinant of energy expenditure ^[30]. It has been demonstrated that mitochondrial biogenesis is mainly regulated by SIRT1, PGC1 α , NRF1 (nuclear respiratory factor 1), and TFAM (mitochondrial transcription factor) ^[31, 32]. SIRT1 activation is associated with an increase in PGC-1 α -mediated mitochondrial biogenesis ^[33]. PGC-1 α in turn activates NRF1 that has been linked to the expression of genes involved in mitochondrial function and biogenesis. The *Nrf1* gene induces *Tfam* expression, which regulates mtDNA copy number and transcriptional activity as well as Oxphos ^[31].

Although $Pgc1\alpha$ and Sirt1 were not changed after YM treatment *in vitro*, the increase on Ucp3 and Tfam mRNA levels indicate that PGC1 α and SIRT1 protein activation is taking place. Therefore, our *in vitro* and *in vivo* experiments show that YM activates the same pathway, although with differences. Even though, in *in vivo* experiments transcriptional and post-transcriptional regulation is affecting to PGC1 α and SIRT1, in *in vitro* only posttranscriptional is occurring. It is important to take into consideration the role of tissue www.mnf-journal.com

Page 14

Accepted Article

crosstalk, where adipokines, hormones or miRNAs released by many organs could exert a higher influence on the PGC1 axis. Additionally, *in vivo* YM is extensively metabolized, and as a result new bioactive compounds can reach different organs. Accordingly, recent data on YM bioavailability assessed in healthy humans indicated that the mainly sulfated conjugates of caffeic and ferulic/isoferulic acids were identified in biological fluids ^[34]. If sulfated conjugates of caffeic and ferulic/isoferulic acids promote more thermogenic effect than no metabolized phenolic compounds, it could also help us to understand the transcriptional and post-transcriptional differences observed *in vivo*.

Additionally, our data revealed that YM activated SIRT1 and NRF1 pathways leading to mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. Likewise demonstrated in this work, thermogenesis is induced by YM through an increased on UCPs expression levels ^[14, 35], which leads to the energy dissipation in heat without production of ATP ^[36]. In this regard, it is important to point out that whereas UCP1 is a well-recognized thermogenic, controversial results have been reported concerning UCP3 ^[37]. In addition, we prove that mitochondrial biogenesis and thermogenesis induction also took take place in other important thermogenic and oxidative tissue, such as the brown adipose tissue. In fact, as it was the case for skeletal muscle, YM treatment elevated p-AMPK/AMPK levels in BAT, leading to the activation of SIRT1 and PGC1α. Altogether our data show that YM partially prevented diet-induced obesity by increasing energy expenditure and enhancing mitochondrial biogenesis via the AMPK/SIRT1/PGC1α pathway in the main oxidative tissues.

As it has been indicated in the Introduction section, in previous studies from our group we observed that YM treatment reduced insulin resistance in liver ^[18]. Taking this into account and considering that insulin resistance is closely related to fatty liver ^[38], in the present study we measured the triacylglycerol content in this organ. YM treatment significantly reduced liver steatosis. Moreover, as it was reported by other authors ^[29], YM

reduced the expression of genes involved in the lipogenic pathway and those related to the entrance of fatty acids into the liver and then into the mitochondria. These results suggest the redirection of lipids away from liver towards skeletal muscle, tissue that can afford the lipid influx due to its increased fatty acid oxidation capacity.

In view of all these results, we can conclude that YM stimulates mitochondriogenesis and UCPs expression, leading to an increase in spare respiratory capacity and energy dissipation in the main oxidative tissues, brown adipose tissue and skeletal muscle. In addition, YM treatment protects liver mainly by reducing the synthesis and uptake of free fatty acids. These effects may help to better understand the potential use of YM for the obesity treatment.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

TWS. and JM. performed all the experiments; TWS. JM, LT, AA, MPP and M.L.R. contributed to the collection, interpretation and analysis of data throughout the experiment; all authors put forward relevant insights and contributed to the discussion, MLR. designed the research and directed the project; JM, MPP and MLR. wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that there are no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Coordination for the Enhancement of Higher Education Personnel (CAPES), by CiberObn (Instituto de Salud Carlos III, Spain) and by The Basque Government (IT-572-13).

6.

[1]

[3]

7. REFERENCES

N. C. D. R. F. Collaboration, Lancet 2016, 387, 1377.

[2] D. Heber, The American journal of clinical nutrition 2010, 91, 280s.

J. R. Zierath, A. Krook, H. Wallberg-Henriksson, Diabetologia 2000, 43, 821.

[4] M. W. Hulver, G. L. Dohm, The Proceedings of the Nutrition Society 2004, 63, 375.

[5] M. K. Montgomery, N. Turner, Endocrine connections 2015, 4, R1.

[6] L. A. Rowland, N. C. Bal, M. Periasamy, Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society 2015, 90, 1279.

[7] D. Ricquier, L. Casteilla, F. Bouillaud, FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 1991, 5, 2237.

[8] J. C. Bournat, C. W. Brown, Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity 2010, 17, 446.

[9] C. S. Lai, J. C. Wu, C. T. Ho, M. H. Pan, Molecular nutrition & food research 2017, 61.

[10] H. P. Rupasinghe, S. Sekhon-Loodu, T. Mantso, M. I. Panayiotidis, Pharmacology & therapeutics 2016, 165, 153.

[11] S. Seo, M. S. Lee, E. Chang, Y. Shin, S. Oh, I. H. Kim, Y. Kim, Nutrients 2015, 7, 8152.

[12] N. Bracesco, A. G. Sanchez, V. Contreras, T. Menini, A. Gugliucci, Journal of ethnopharmacology 2011, 136, 378.

[13] D. D. C. Miranda, D. P. Arcari, J. Pedrazzoli, P. D. Carvalho, S. M. Cerutti, D. H. M. Bastos, M. L. Ribeiro, Mutagenesis 2008, 23, 261; G. A. Klein, A. Stefanuto, B. C. Boaventura, E. C. de Morais, S. Cavalcante Lda, F. de Andrade, E. Wazlawik, P. F. Di Pietro, M. Maraschin, E. L. da Silva, J Am Coll Nutr 2011, 30, 320.

[14] D. P. Arcari, W. Bartchewsky, Jr., T. W. dos Santos, K. A. Oliveira, C. C. DeOliveira, E. M. Gotardo, J. Pedrazzoli, Jr., A. Gambero, L. F. Ferraz, O. Carvalho Pde, M. L. Ribeiro, Molecular and cellular endocrinology 2011, 335, 110.

[15] D. P. Arcari, W. Bartchewsky, T. W. dos Santos, K. A. Oliveira, A. Funck, J. Pedrazzoli, M. F. de Souza, M. J. Saad, D. H. Bastos, A. Gambero, O. Carvalho Pde, M. L. Ribeiro, Obesity 2009, 17, 2127.

[16] D. P. Arcari, J. C. Santos, A. Gambero, M. L. Ribeiro, Food chemistry 2013, 141, 809.

[17] D. P. Arcari, V. B. Porto, E. R. V. Rodrigues, F. Martins, R. J. de Lima, A. C. H. F. Sawaya, M. L. Ribeiro, P. D. Carvalho, Journal of Functional Foods 2011, 3, 190.

[18] D. P. Arcari, J. C. Santos, A. Gambero, L. F. Ferraz, M. L. Ribeiro, Molecular nutrition & food research 2013, 57, 1882.

[19] G. Gosmann, A. G. Barlette, T. Dhamer, D. P. Arcari, J. C. Santos, E. R. de Camargo, S. Acedo, A. Gambero, S. C. Gnoatto, M. L. Ribeiro, Plant Foods Hum Nutr 2012, 67, 156.

[20] J. C. Santos, E. M. Gotardo, M. T. Brianti, M. Piraee, A. Gambero, M. L. Ribeiro, Molecules 2014, 19, 16909.

[21] M. D. Brand, D. G. Nicholls, The Biochemical journal 2011, 435, 297.

[22] H. J. Choo, J. H. Kim, O. B. Kwon, C. S. Lee, J. Y. Mun, S. S. Han, Y. S. Yoon, G. Yoon, K. M. Choi, Y. G. Ko, Diabetologia 2006, 49, 784.

[23] A. Gambero, M. L. Ribeiro, Nutrients 2015, 7, 730.

[24] A. G. B. Grace Gosmann, Tabitha Dhamer, Demétrius P. Arçari, Juliana Carvalho Santos, Eloá
Ramalho de Camargo, Simone Acedo, Alessandra Gambero, Simone Cristina Baggio Gnoatto,
Marcelo Lima Ribeiro, Plant Foods Hum Nutr 2012, in Press; F. Martins, A. J. Suzan, S. M. Cerutti, D.
P. Arcari, M. L. Ribeiro, D. H. Bastos, O. Carvalho Pde, The British journal of nutrition 2009, 101, 527.
[25] J. C. E. Serrano, A. Cassanye, M. Martin-Gari, A. B. Granado-Serrano, M. Portero-Otin,
Diseases 2016, 4.

[26] M. Nichols, J. Zhang, B. M. Polster, P. A. Elustondo, A. Thirumaran, E. V. Pavlov, G. S. Robertson, Neuroscience 2015, 308, 75; H. Yamamoto, K. Morino, L. Mengistu, T. Ishibashi, K. Kiriyama, T. Ikami, H. Maegawa, Oxidative medicine and cellular longevity 2016, 2016, 1735841.

[27] A. E. Wagner, I. M. Ernst, M. Birringer, O. Sancak, L. Barella, G. Rimbach, Oxidative medicine and cellular longevity 2012, 2012, 835970.

[28] H. M. O'Neill, G. P. Holloway, G. R. Steinberg, Molecular and cellular endocrinology 2013, 366, 135.

[29] M. S. Choi, H. J. Park, S. R. Kim, D. Y. Kim, U. J. Jung, Journal of medicinal food 2017.

[30] F. Zurlo, K. Larson, C. Bogardus, E. Ravussin, The Journal of clinical investigation 1990, 86, 1423.

[31] J. V. Virbasius, R. C. Scarpulla, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1994, 91, 1309.

[32] J. J. Lehman, P. M. Barger, A. Kovacs, J. E. Saffitz, D. M. Medeiros, D. P. Kelly, The Journal of clinical investigation 2000, 106, 847.

[33] G. Alberdi, V. M. Rodriguez, J. Miranda, M. T. Macarulla, I. Churruca, M. P. Portillo, Food chemistry 2013, 141, 1530.

[34] M. Gomez-Juaristi, S. Martinez-Lopez, B. Sarria, L. Bravo, R. Mateos, Food chemistry 2018, 240, 1028.

[35] J. Pang, Y. Choi, T. Park, Archives of biochemistry and biophysics 2008, 476, 178.

[36] F. E. Sluse, Advances in experimental medicine and biology 2012, 942, 137; J. J. Jia, X. Zhang, C. R. Ge, M. Jois, Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity 2009, 10, 519; W. Jarmuszkiewicz, A. Woyda-Ploszczyca, Postepy biochemii 2008, 54, 179.

[37] P. Schrauwen, M. K. Hesselink, The Proceedings of the Nutrition Society 2004, 63, 287.

[38] C. Postic, J. Girard, The Journal of clinical investigation 2008, 118, 829.

Page 18

Legend to Figures

Figure 1. Yerba maye stimulates mitochondrial bioenergetics *in vitro*. (A) C2C12 cells were treated with YM (150 or 200 µg/mL) for 12-h and subjected to mitochondrial function analysis. The oxygen consumption rate (OCR) was determined using Seahorse XF-96 Metabolic Flux Analyzer. OCR was measured sequentially in basal conditions (time points 1-3), after injections of oligomycin (oligo; time points 4, 5 and 6), FCCP (time points 7, 8 and 9), rotenone/ antimycin A (Rot + AA, time points 10, 11 and 12) at the arrow indicated times. Data shown are mean \pm SEM from a representative experiment (eight replicates). Respiratory parameters were derived from OCR measured during each phase of the experiment. (B) Yerba mate effects on mitochondrial spare respiratory capacity [FCCP rate (time point 7) – basal rate (time point 3)] and (C) on coupling efficiency [basal rate (time point 3) – oligo rate (time point 6)] / basal rate (time point 3)]. (D) Mitochondrial DNA (mtDNA) content in C2C12 cells were treated with YM (150 or 200 μ g/mL) for 24- h Values for the YM groups are expressed as the fold change compared with those for the control (CT) group mean \pm SEM; (E) mRNA levels of genes related mitochondrial biogenesis and thermogenesis. Data are presented as fold change versus CT mean \pm SEM; Bars not sharing a common letter are significantly different (P<0.05).



Figure 2. *In vivo* effects of yerba mate in a high-fat diet mice model. (A) Body weight mass gain. Lean mice were fed with AIN-93 (SD, n=5), obese mice were fed with a HFD (HFD, n=5), obese mice treated with HFD and treated with YM at 1 g/Kg (HFD-YM, n=5) during the last 8 weeks; (B) Indirect respirometry data were measured during a 24-h period between the 5th and the 6th week of treatment; (C) VCO₂ data; (D) VO₂ data and (E) Energy expenditure (EE) data. Bars not sharing a common letter are significantly different (P<0.05).



Figure 3. Yerba mate effects on mitochondrial biogenesis and thermogenesis in skeletical muscle. (A) Mitochondrial DNA (mtDNA) content in muscle of mice fed with AIN-93 (SD, n=5), high-fat diet (HFD, n=5) and YM YM at 1 g/Kg (HFD-YM, n=5) Values for the HFD and HFD-YM groups are expressed as the fold change compared with those for the SD feeding mean \pm SEM; (B) mRNA levels of genes related mitochondrial biogenesis and thermogenesis. Data are presented as fold change versus SD feeding mean \pm SEM; (C) p-AMPK, AMPK, PGC1a, UCP3, SIRT1 and GAPDH protein level in muscle samples from HFD and HFD-YM groups. Data are presented as arbitrary units (AU) and results are expressed as mean \pm SEM (D) Skeletal muscle probed for representative subunits of the five OXPHOS complexes. Data are presented as arbitrary units (AU) and results are expressed as mean \pm SEM. Bars not sharing a common letter are significantly different (*P*<0.05).



t1C] A CCC

Figure 4. Yerba mate effects on mitochondrial biogenesis and thermogenesis in brown adipose tissue. (**A**) Mitochondrial DNA (mtDNA) content in BAT of mice fed with AIN-93 (SD, n=5), high-fat diet (HFD, n=5) and YM YM at 1 g/Kg (HFD-YM, n=5) Values for the HFD and HFD-YM groups are expressed as the fold change compared with those for the SD feeding mean \pm SEM; (**B**) mRNA levels of genes related mitochondrial biogenesis and thermogenesis. Data are presented as fold change versus SD feeding mean \pm SEM; (**C**) p-AMPK, AMPK, PGC1a, UCP1, UCP3, SIRT1 and GAPDH protein level in BAT samples from HFD and HFD-YM groups. Data are presented as arbitrary units (AU) and results are expressed as mean \pm SEM (**D**) BAT probed for representative subunits of the five OXPHOS complexes. Data are presented as arbitrary units (AU) and results are expressed as mean \pm SEM. Bars not sharing a common letter are significantly different (*P*<0.05).



Figure 5. mRNA levels of genes related to *de novo lipogenesis*, lipid uptake and mitochondrial oxidation of mice fed with AIN-93 (SD, n=5), high-fat diet (HFD, n=5) and YM YM at 1 g/Kg (HFD-YM, n=5) in muscle (**A**), brown adipose tissue (**B**) and liver (**C**). Bars not sharing a common letter are significantly different (*P*<0.05).



1			
	SD (n=5)	HFD (n=5)	HFD+YM (n=5)
Final body weight (g)	43.60 ± 1.95 ^a	67.60 ± 6.27 ^b	60.00 ± 3.16 ^c
Weight gain (%)	10.16 ± 4.82	13.40 ± 4.85	11.04 ± 5.56
Food intake (g/day)	5.09 ± 0.009	3.69 ± 0.41	3.88 ± 0.47
Energy intake (kcal.g-1/day)	20.09	19.77	20.79
Epididimal adipose tissue (%)	3.95 ± 0.35 ^a	4.55 ± 0.21 ^a	3.33 ± 0.28 ^b
Perirenal adipose tisse (%)	0.25 ± 0.04 ^a	1.60 ± 0.13 ^b	0.94 ± 0.11 ^c
Subcutaneous adipose tisse (%)	1.17 ± 0.14 ^a	5.61 ± 0.85 ^b	4.11 ± 0.18 ^c
Muscle (%)	1.46 ± 0.22 ^a	0.91 ± 0.08 ^b	$0.95 \pm 0.10^{\ b}$
Liver (%)	4.73 ± 0.07^{a}	5.98 ± 0.34 ^b	4.65 ± 0.33^{a}

Table 1. Antropometrical data

Data not sharing a common letter are significantly different (P < 0.05)

CAPÍTULO II: ARTIGO PUBLICADO

Lima NDS, Teixeira L, Gambero A, Ribeiro ML. Guarana (Paullinia cupana) Stimulates Mitochondrial Biogenesis in Mice Fed High-Fat Diet. *Nutrients*. 2018;10(2):165. Published 2018 Jan 31. doi:10.3390/nu10020165

Este artigo teve como objetivo avaliar os efeitos do guaraná na biogênese mitocondrial em camundongos alimentados com dieta rica em gordura (HFD). Camundongos C57BL6J foram divididos em dois grupos: dieta rica em gordura HFD e dieta rica em gordura + guaraná (HFD-GUA). Ambos os grupos receberam HFD e água ad libitum e o grupo HFD-GUA também recebeu gavagem diária de guaraná (1 g / kg de peso).

Foram analisados os níveis de glicemia, triglicerídeo, colesterol, volume de oxigênio e gasto energético por calorimetria indireta. A expressão do gene foi avaliada por PCR em tempo real e o conteúdo de proteína por western blotting.

Obtivemos como resultado: o grupo HFD-GUA apresentou menor peso corporal, depósitos de tecido adiposo subcutâneo, retroperitoneal, visceral e epididimal e níveis glicêmicos e de triglicerídeos, sem alteração na ingestão alimentar e nos níveis de colesterol.

Além disso, o grupo HFD-GUA apresentou aumento no VO2 e no gasto energético basal (EE), bem como na expressão de Pgc1α, Creb1, Ampka1, Nrf1, Nrf2 e Sirt1 no músculo e tecido adiposo marrom.

O grupo HFD-GUA apresentou aumento no conteúdo de mtDNA (ácido desoxirribonucléico mitocondrial) no músculo quando comparado ao grupo HFD.

Assim, nossos dados mostraram que o guaraná leva ao aumento do metabolismo energético e estimula a biogênese mitocondrial, contribuindo para o controle do ganho de peso, mesmo quando associado à dieta hiperlipídica.



Article



Guarana (*Paullinia cupana*) Stimulates Mitochondrial Biogenesis in Mice Fed High-Fat Diet

Natália da Silva Lima * 🔍, Lucimara Teixeira, Alessandra Gambero and Marcelo Lima Ribeiro * 🔍

Laboratory of Immunopharmacology and Molecular Biology, Clinical Pharmacology and Gastroenterology Unit, Sao Francisco University Medical School, Av Sao Francisco de Assis, 218, Braganca Paulista-SP 12916-900, Brazil; lucimara.teixeira@usf.edu.br (L.T.); alessandra.gambero@usf.edu.br (A.G.)

* Correspondences: lima.nat@gmail.com (N.d.S.L.); marcelo.ribeiro@usf.edu.br (M.L.R.);

Tel.: +55-11-2454-8982 (N.d.S.L. & M.L.R.); Fax: +55-11-4034-1825 (N.d.S.L. & M.L.R.)

Received: 22 December 2017; Accepted: 29 January 2018; Published: 31 January 2018

Abstract: The aim of this study was to evaluate the effects of guarana on mitochondrial biogenesis in a high-fat diet (HFD)-fed mice. C57BL6J mice were divided in two groups: high-fat diet HFD and high-fat diet + guarana (HFD-GUA). Both groups received HFD and water ad libitum and the HFD-GUA group also received a daily gavage of guarana (1 g/kg weight). Body weight and food intake was measured weekly. Glycemic, triglyceride, and cholesterol levels were determined. VO₂ and energy expenditure (EE) were determined by indirect calorimetry. Gene expression was evaluated by real-time PCR and protein content by western blotting. The HFD-GUA group presented lower body weight, subcutaneous, retroperitoneal, visceral, and epididyimal adipose tissue depots, and glycemic and triglyceride levels, with no change in food intake and cholesterol levels. Furthermore, the HFD-GUA group presented an increase in VO₂ and basal energy expenditure (EE), as well as $Pgc1\alpha$, *Creb1*, *Ampka1*, *Nrf1*, *Nrf2*, and *Sirt1* expression in the muscle and brown adipose tissue. In addition, the HFD-GUA group presented an increase in mtDNA (mitochondrial deoxyribonucleic acid) content in the muscle when compared to the HFD group. Thus, our data showed that guarana leads to an increase in energetic metabolism and stimulates mitochondrial biogenesis, contributing to control of weight gain, even when associated with high-fat diet.

Keywords: guarana (Paullinia cupana Kunth); obesity; mitochondrial biogenesis; energy expenditure

1. Introduction

Obesity is a major public health problem worldwide and is related to epigenetic factors, excessive consumption of processed food rich in fat and sugar, and lack of physical activity, among other factors. The World Health Organization (WHO) defines overweight and obesity as abnormal or excessive fat accumulation that contribute to development of other diseases, such as diabetes mellitus, hypertension, and kidney or coronary problems [1,2].

Energy metabolism is determined by energy expenditure and food intake, which must be balanced for body weight maintenance. Skeletal muscle is a target organ in the context of cellular bioenergetics due to its important role in glucose homeostasis and insulin sensitivity [3,4]. Thus, it is common that obese subjects, that normally present an increase body fat mass and decrease in fat free mass, have a decrease in energy expenditure.

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha ($Pgc1\alpha$) is responsible for regulating mitochondrial biogenesis, oxygen consumption, and oxidative phosphorylation, through the increase of mitochondrial mass, activation of several key components of adaptive thermogenesis, and stimulation of energy uptake, which allows the adaptation of cells and tissues to situations of high energy demands [5]. $Pgc-1\alpha$ is regulated by posttranslational modification, including phosphorylation

and deacetylation by protein kinase, AMP-activated (*Ampk*) and sirtuin 1 (*Sirt1*), respectively [6]. These three genes compose an energy-sensing network that controls energy expenditure in skeletal muscle [7].

Several strategies for obesity control have been developed, and functional food and/or bioactive compounds with thermogenic effects have been widely used. Green tea has been associated with weight loss and the modulation of energy expenditure and fat metabolism [8]. Consumption of curcumin, a member of the ginger family, increases thermogenic gene expression (such as uncoupling protein 1 (*Ucp1*) and *Pgc1a*) and increases mitochondrial content in inguinal white adipose tissue [9]. In addition, in C57BL6 mice fed with HFD and luteolin, a natural flavonoid abundant in pepper, celery, thyme, peppermint and honeysuckle, an increase in oxygen consumption, as well as higher carbon dioxide production and respiratory exchange ratio was observed [10]. Furthermore, resveratrol was able to reduce oxidative stress, restoring mitochondrial functional activities and stimulating oxidative phosphorylation and mitochondrial biogenesis gene expression in high-fat diet fed mice [11,12].

Guarana (*Paullinia cupana* Kunth) has been associated with weight loss, showing several protective actions against hypertension, obesity, and metabolic syndrome [13], the capacity to reduce food intake [14], and to modulate genes related to adipogenesis [15]. Besides that, it has already been demonstrated that a mixture of guarana extract and green tea containing a fixed dose of caffeine (200 mg) and variable doses of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) increased energy expenditure (measured in a metabolic chamber to measure 24 h energy expenditure) in healthy adults [16]. Thus, the aim of our study was to investigate the effects and the potential mechanisms underlying the effects of oral treatment with guarana on obesity, metabolism, and mitochondrial biogenesis.

2. Material and Methods

2.1. Experimental Design

All animal experiments were performed in accordance with the Brazilian Government's ethics and were approved by the Animal Experimental Ethics Committee (CEUA) of the Sao Francisco University, Bragança Paulista, SP, Brazil, under protocol no. 001.05.2015. All procedures including housing and welfare were carried out in accordance with the recommendations in the Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals of the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS), countersigned by the Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA: Brazilian National Consul for the Control of Animal Experimentation). C57BL6J male mice at approximately 4 weeks of age were obtained from Sao Paulo University (Sao Paulo, Brazil) and maintained in a 12/12 h artificial light/dark cycle and temperature (22 ± 2 °C) in individual cages for 4 weeks. After randomization, C57BL6J mice were given either a high-fat diet (HFD group, n = 6) or a high-fat diet + guarana (*Paullinia cupana*) (1 g/kg of body weight) (HFD-GUA group, n = 6) for 8 weeks. Guarana was administered daily by gavage using an orograstric cannula. HFD group received gavage with pure water (vehicle) in the similar volume of HFD-GUA group for 8 weeks. The composition of the experimental diet is presented in Table 1. In addition, the composition of guarana used in this study was previously determined; 2.42% of flavonoids, 9.18% of total phenolics, and high caffeine content (12.4%) [15].

Composition	High-Fat Diet		
composition	${ m g}{ m kg}^{-1}$	kcal kg ⁻¹	
Cornstarch	115.5	462	
Casein	200	800	
Sucrose	100	400	
Dextrinated starch	132	528	
Lard	312	2808	
Soybean oil	40	360	
Cellulose	50	-	
Mineral mix	35	-	
Vitamin mix	10	-	
L-cystine	3	-	
Choline	2.5	-	
TOTAL	1000	5358	

Table 1. High-fat diet composition.

2.2. Indirect Calorimetry

Basal energy expenditure of the animals was evaluated by indirect calorimetry. Forty-eight hours before euthanasia, mice were acclimatized for 24 h in individual metabolic cages (OXYLET System—for rodents) and monitored for another 24 h. The amount of O₂ (VO₂) consumed and the amount of CO₂ (VCO₂) produced was measured at 25-min intervals for 24 h. Respiratory exchange rate (RER) was calculated using the following formula: (RER) = VCO₂/VO₂. Basal energy expenditure (EE) was determined using following formula: kcal/day/kg^{0.75} = 1.44 × VO₂ × (3815 + 1232 × RER) [17].

2.3. Animal Procedure and Tissue Dissection

Food intake and body weight was measured weekly. Glycemic, triglycerides, and cholesterol levels were determined by Accutrend Plus (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) using specific strips. At the end of 8 weeks, mice were anesthetized (after 12 h of fasting) with a 1:1 solution of 2% xylazine/10% ketamine (1 μ L/g of body weight) and blood samples were collected by cardiac puncture. Adipose tissue depots (subcutaneous, retroperitoneal, visceral, and epididyimal) were dissected and weighed. Gastrocnemius muscle and brown adipose tissue samples were dissected and stored at -80 °C until analysis.

2.4. mRNA (Messenger Robonucleic Acid) Expression Analysis

Muscle samples were used for quantitative real time PCR analysis. Total RNA extraction, complementary DNA (cDNA) synthesis, and quantitative PCR were performed as previously described [18], using specific primers (Table 2). First, all samples were normalized using housekeeping *18S* gene and after, the HFD-GUA group was normalized by HFD group. The equation $2^{-\Delta\Delta Ct}$ was used to calculate the fold change.

Gene	Primer	Sequence $(5' \rightarrow 3')$
Sirt1	Sense Antisense	AGTGGCACATGCCAGAGTC TCCAGATCCTCCAGCACAAT
Creb1	Sense Antisense	TTTGTCCTTGCTTTCCGAAT CACTTTGGCTGGACATCTTG
Ampka1	Sense Antisense	TGAGAACGTCCTGCTTGAATG ATCATTGGCTGAGCCACAGC
Ampka2	Sense Antisense	ACAGGCCATAAAGTGGCAGT GTCGGAGTGCTGATCACGTG
Pgc1a	Sense Antisense	CCGAGAATTCATGGAGCAAT TTTCTGTGGGTTTGGTGTGA

Table 2. Primers used for real-time PCR.

Gene	Primer	Sequence $(5' \rightarrow 3')$
Nrf1	Sense Antisense	CAACAGGGAAGAAACGGAAA CACTCGCGTCGTGTACTCAT
Nrf2	Sense Antisense	AGGACATGGAGCAAGTTTGG TCTGTCAGTGTGGCTTCTGG
Ucp1	Sense Antisense	TCAGGGCTGAGTCCTTTTGT CTGAAACTCCGGCTGAGAAG
Ucp3	Sense Antisense	CTCACTTTTCCCCTGGACAC GTCAGGATGGTACCCAGCAC
185	Sense Antisense	AAACGGCTACCACATCCAAG CAATTACAGGGCCTCGAAAG

Table 2. Cont.

2.5. Mitochondrial DNA Quantification (Mtdna)

Mitochondrial DNA (mtDNA) quantification was performed by quantitative real time-PCR. Briefly, DNA (deoxyribonucleic acid) extraction (from muscle and brown adipose tissue) was performed using the phenol/chloroform method. Next, real time-PCR was performed using Platinum[®] SYBR GREEN[®] qPCR Supermix Uracil-DNA-glycosylase (UDG) (Invitrogen, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. For mtDNA quantification, we used mitochondrial *Cox1* (cytochrome c oxidase subunit I) (FW 5'-GCCCCAGATATAGCATTCCC-3' and RV 5'-GTTCATCCTGTTCCTGCTCC-3') and as an endogenous control, *18S* rRNA (FW 5'-TAGAGGGACAAGTGGCGTTC-3' and RV 5'-CGCTGAGCCAGTCAGTGT-3'). Real time-PCR was performed in a 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems Foster City, CA, USA) and analyzed using RQ Study Software (Applied Biosystems). The relative quantification of mtDNA copies was obtained by the DNAmt/nuclear DNA ratio, and after normalization with housekeeping gene *18S*, the fold change was determined using the equation: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

2.6. Western Blotting Analysis

To obtain cell extracts, samples of muscle and brown adipose tissue were treated to protein extraction using ice-lysis buffer containing protease inhibitors. Subsequently, the homogenates were centrifuged (12,000 rpm, 4 °C, 10 min) and stored at -80 °C. Briefly, protein concentrations were determined by the bicinchoninic acid protein assay kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Samples (30 µg of total protein) were separated by 8.5% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) according to the molecular weight of each protein and transferred to nitrocellulose membranes (Hybond ECL; Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, London, UK). Rainbow standard markers (KaleidoscopeTM, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) were run in parallel to estimate molecular weights. The membranes were blocked with 5% blotting-grade blocker (Bio-Rad Laboratories) in Tween-Tris-buffered saline (20 mM-Tris-HCl, pH 7.5, 500 mM-NaCl and 0.1% Tween-20) for 1 h. Specific primary antibodies were used, anti-*Aampk*, anti-*P* α *p* α , anti-*P* α *p* α , anti-*P* α anti-Ucp1, anti-Ucp3, anti- Oxidative phosphorylation (OXPHOS) (complexes I to V), and anti-vinculin (Abcam, Cambridge, UK) for 1 h. Subsequently, samples were incubated in specific HRP-linked secondary antibodies (DAKO Corporation, Hamburg, Germany) for more 1 h. The targeted proteins were detected by enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) and then exposed to X-ray film. The images were scanned, and the bands were quantified by densitometry using Image J 1.34 s software (Wayne Rasband National Institute of Health, Bethesda, MA, USA). All measurements were normalized to the vinculin protein band intensity.

2.7. Statistical Analysis

Data are presented as mean values \pm SEM. GraphPad Prism 5 was used for statistical analyses and graphics (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Experimental data were analyzed by Student's unpaired t test. For body weight analysis, two-Way Analysis of Variance (ANOVA) was used.

3. Results and Discussion

The effects of guarana (*Paullinia cupana*) extract on body weight control, food intake, protection against hypertension, and in the modulation of some genes and miRNAs associated with the adipogenesis process have been previously shown [13–15]. In addition, in this study, it was demonstrated that guarana might control body weight by enhancing thermogenesis and mitochondrial biogenesis.

Our data show that the HFD group presented an increase in body weight from the first week, while the HFD-GUA group did not change in body weight for the entire period of experiment (Figure 1A). These data confirm that guarana is able to prevent weight gain (even associated with HFD), despite the same food intake for both groups in this experimental model (Figure 1B). These results indicate that the consumption of guarana, even when associated with an increased calorific intake, was able to prevent weight gain independently of satiety, since the food intake was not changed during the experiment. In obese subjects, however, a formulation containing guarana with yerba mate and damiana (denominated "YGD") was associated with a decrease in food intake [14]. In a recent randomized, single blind, placebo-controlled study realized with overweight and obese women, YGD was able to modulate gastrointestinal hormones, leading to a decrease in acylated ghrelin and an increase in glucagon-like peptide 1 (GLP-1) levels that caused a reduction of energy and macronutrient intake [19]. Additionally, guarana also showed protective effect against hypertension, obesity, and metabolic syndrome in elderly healthy volunteers [13]. Recently, it has been shown that the consumption of a multi-ingredient product (containing guarana in addition to many other compounds) in healthy subjects lead to an increase in fatty acid oxidation, decrease in rate of perceived exertion during exercise, and improved satiety [20].

Furthermore, HFD-GUA mice showed a decrease in subcutaneous, retroperitoneal, visceral and epididyimal adipose tissues weight (-74%, -90%, -83% and -82%, respectively) when compared to mice fed with HFD. These data indicate that guarana is able to prevent adipose tissue accumulation. Fasting glycemic and triglyceride levels were lower in the HFD-GUA group when compared to those in the HFD group (-21% and -28%, respectively), with no difference in total cholesterol. Accordingly, previous data from our group indicated that guarana modulates adipogenesis [15] as well as increases fatty acid oxidation [20], which could contribute to the observed results here.

Additionally, the data presented indicate that guarana can exert some effects on energy expenditure and metabolism. Indirect calorimetry showed that guarana treatment was able to increase VO_2 in light cycle to a greater extent than in the dark cycle (Figure 2A), and also EE (+20% in the light cycle and +16% in the dark cycle, p < 0.05, Figure 2B,C) when compared to the HFD group. Despite mice presenting night activity, it is possible that the major increase in EE in the light cycle (+20%) is due to the gavage being performed during this cycle and not in the dark cycle. Furthermore, respiratory exchange ratio (RER) was calculated to determine if predominant fuel source was carbohydrate or fat. It is known that RER of 0.70 indicates predominant fat oxidation; RER of 0.85 suggests a mix of fat and carbohydrates, and a value of 1.00 or above is suggestive of carbohydrate oxidation [21,22]. Our data showed a decrease of RER in the light cycle mainly after gavage (Figure 2D) in the HFD-GUA group when compared to the HFD group (Figure 2E), which indicates increased fatty acid utilization in animals treated with guarana. However, we do not observe a difference in RER in the dark cycle (Figure 2F). Accordingly, guarana extract consumed together with green tea and EGCG was able to increase energy expenditure (measured in a metabolic chamber to measure 24 h energy expenditure) in healthy adults [16]. It is known that guarana has a high concentration of caffeine [15,23], and some studies have already demonstrated that caffeine is able to modulate metabolism and energy expenditure [24–26].

Caffeine is a natural ingredient in tea and coffee that demonstrates several beneficial actions in weight loss and other anti-obesity effects without undesirable effects [27,28]. Recently, it was demonstrated that caffeine can regulate energy metabolism through the modulation of hypothalamic neuronal activities. Peripheral administration of caffeine (by gavage) in diet-induced obese (DIO) mice reduced their food intake, increased wheel running activities, consumption of O₂, and CO₂

production [26]. Other recent study demonstrated that C57BL6 mice that received caffeine showed a lipolysis improve which resulted in considerable weight loss [29]. Furthermore, the administration of caffeine to the mouse brain increased the number of c-Fos⁺ cells in regions of the hypothalamus, such as the paraventricular nucleus (PVN), arcuate (Arc), and ventromedial and dorsomedial (DMH) nuclei. These results indicate that caffeine stimulates neuron activity involved with energy balance control [26]. In humans, a randomized, double-blind, placebo-controlled and cross-over trial with healthy female volunteers showed that the consumption of a thermogenic supplement (containing compounds rich in caffeine) was able to increase resting metabolic rate at 60 min, 120 min, and 180 min post ingestion compared to baseline values [30]. In vitro experiments showed that caffeine (250 and 500 μ M) was able to increase relative metabolic rate in human muscle rhabdomyosarcoma cells after 24 h of incubation [25]. These results are in agreement with our findings and it is plausible that the high caffeine content in guarana extract used [15] may have contributed to increase in VO₂ and EE in these mice.



Figure 1. (**A**) Body weight (g) of high fat diet (HFD)-group (n = 6) and high fat diet + Guarana (HFD-GUA) group (n = 6) during eight weeks of treatment; (**B**) Food intake (g) of HFD-group (n = 6) and HFD-GUA group (n = 6) during eight weeks of treatment; (**C**) Adipose tissue depots (g) of Sub—subcutaneous adipose tisse, Retro—retroperitoneal adipose tissue, Visc—visceral adipose tissue and Epi—epididyimal adipose tissue after eight weeks of treatment; (**D**) Glycemia (mg/dL) after 12 h of fasting; (**E**) Triglycerides (mg/dL) after 12 h of fasting; (**F**) Cholesterol (mg/dL) after 12 h of fasting. Black line/bars correspond to HFD-group (n = 6) and grey line/bars correspond to HFD-GUA group (n = 6) and grey line/bars correspond to HFD-GUA group (n = 6). * p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001 when compared with HFD group.



Figure 2. (**A**) Illustrative evolution of VO₂ (mL/min/kg^{0.75}) during 24 h after eight weeks of treatment. Light cycle (7 a.m. to 6:59 p.m.) and dark cycle (7 p.m. to 6:59 a.m.); (**B**) Energy expenditure (EE) (kcal/day/kg^{0.75}) in the light cycle after weigh weeks of treatment; (**C**) EE (kcal/day/kg^{0.75}) in the dark cycle after weigh weeks of treatment; (**D**) Illustrative evolution of Respiratory exchange ratio (RER) during 24 h after eight weeks of treatment; (**E**) Respiratory exchange ratio (RER) in the light cycle; (**F**) Respiratory exchange ratio (RER) in the dark cycle. Black line/bars correspond to HFD-group (n = 6) and grey line/bars correspond to HFD-GUA group (n = 6). * p < 0.05.

Mitochondria play a key role in energy metabolism in many tissues such as skeletal and cardiac muscle, as well as in the liver, brain, and adipose tissue [31]. Our data shows that treatment with guarana for eight weeks increased the amount of mtDNA in the gastrocnemius muscle (Figure 3B), but this difference was not observed in the brown adipose tissue (Figure 4C). Complementarily, gastrocnemius muscle of the HFD-GUA group showed up-regulated expression of mitochondrial biogenesis genes, such as *Sirt1*, *Creb1*, *Ampka1*, *Pgc1a*, *Nrf1*, and *Nrf2* (Figure 3A). With regard to brown adipose tissue, our data showed that animals treated with guarana (HFD-GUA group) showed up-regulated expression of mitochondrial biogenesis genes, such as *Sirt1*, *Creb1*, *Ampka2*, *Pgc1a*, and *Nrf1* (Figure 4A) and of thermogenic genes, such as *Ucp1* (Figure 4B) when compared to the HFD group. These data probably contributed to the increase in energy expenditure of the HFD-GUA group as compared to HFD group. The results obtained by western blotting showed the same characteristics, such as higher *Pgc1-a* in the gastrocnemius muscle (Figure 3C,D) as well as a higher content of *p-Ampk/Ampk*, *Pgc1-a*, and *Ucp1* in the brown adipose tissue (Figure 4D,E). Furthermore, the data

showed an increase of OXPHOS complex I, II, III, IV and V in the gastrocnemius muscle (Figure 3E,F) and an increase of OXPHOS complex I, II, III and IV in the brown adipose tissue (Figure 4F,G). These data demonstrated that mitochondrial biogenesis and thermogenesis induced by guarana is not restricted to skeletal muscle, since the modulation was also observed in the brown adipose tissue. Other authors have already demonstrated that functional food and its bioactive compounds can modulate the expression of mitochondrial biogenesis-related genes. Resveratrol (mixed with a pelleted high-fat diet) was able to up-regulate uncoupling protein 2 (*Ucp2*) and nuclear respiratory factor 1 and 2 (*Nrf1* and *Nrf2*) expression as compared to mice fed with a high-fat diet without resveratrol [32]. Caffeine induces increases in the mRNA levels and protein levels of a number of mitochondrial enzymes in rat epitrochlearis muscle after 18 h of incubation [33], as well as being able to modulate hypothalamic neuronal activities, increasing energy expenditure and thermogenesis [26]. Taken all together, the modulation caused by guarana treatment contributed to the lower fat accumulation in all adipose tissue depots and the increase in energy expenditure, as well as the higher content of mitochondria in skeletal muscle. This action is demonstrated in Figure 5.



Figure 3. (**A**) Muscle mRNA expression of *Pgc1a*, *Creb1*, *Ampka1*, *Ampka2*, *Mkp1*, *Slc2a4*, *Nrf1*, *Nrf2*, *Sirt1* and *Mttfa* after eight weeks of treatment; (**B**) mtDNA quantification after eight weeks of treatment in gastrocnemius muscle; (**C**,**D**) Muscle protein level of *PGC1a* and *p*-*Ampk/Ampk* and illustrative images of protein content by western blotting; (**E**,**F**) Muscle protein level of subunits of the five OXPHOS complexes and illustrative images of protein content by western blotting. All samples were normalized using housekeeping *18S* gene and, afterwards, the HFD-GUA group was normalized by the HFD group. The equation $2^{-\Delta\Delta Ct}$ was used to calculate the fold change. * *p* < 0.05 using Student's *t*-test. Black bars correspond to the HFD group (*n* = 6) and grey bars correspond to the HFD-GUA group (*n* = 6). Error bars reflect SEM.



Figure 4. (**A**) Brown adipose tissue mRNA expression of $Pgc1\alpha$, Creb1, Ampka1, Ampka2, Nrf1, Nrf2 and *Sirt1* after eight weeks of treatment; (**B**) Brown adipose tissue mRNA expression of *Ucp1* and *Ucp3* after eight weeks of treatment; (**C**) mtDNA quantification after eight weeks of treatment; (**D**,**E**) Brown adipose tissue protein level of $Pgc1\alpha$, p-Ampk/Ampk, *Ucp1* and *Ucp3*; and illustrative images of protein content by western blotting; (**F**,**G**) Brown adipose tissue protein level of subunits of the five OXPHOS complexes and illustrative images of protein content by western blotting. All samples were normalized using housekeeping *18S* gene and, afterwards, the HFD-GUA group was normalized by the HFD group. The equation $2^{-\Delta\Delta Ct}$ was used to calculate the fold change. * p < 0.05 using Student's *t*-test. Black bars correspond to the HFD-group (n = 6) and grey bars correspond to the HFD-GUA group (n = 6). Error bars reflect SEM.



Figure 5. Effects of guarana treatment on mitochondrial biogenesis in gastrocnemius muscle and brown adipose tissue.

4. Conclusions

This study demonstrated that guarana prevents adipose tissue accumulation, as well as increasing energy expenditure, probably because of the modulation of several genes related to mitochondrial biogenesis in gastrocnemius muscle and brown adipose tissue. Animals treated with guarana, even when fed with a high-fat diet, presented lower body weight, lower fat deposits, and higher energy expenditure. Together, our data demonstrate that guarana presents an important role in metabolism and energy expenditure that could contribute to the therapeutic treatment of obesity.

Acknowledgments: This work was supported by grant from Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

Author Contributions: N.d.S.L. and L.T. performed all the experiments; N.d.S.L. and M.L.R. contributed to the collection, interpretation and analysis of data throughout the experiment; N.d.S.L., A.G. and M.L.R. put forward relevant insights and contributed to the discussion, N.d.S.L. and M.L.R. designed the research and directed the project; N.d.S.L. wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Ng, M.; Fleming, T.; Robinson, M.; Thomson, B.; Graetz, N.; Margono, C.; Mullany, E.C.; Biryukov, S.; Abbafati, C.; Abera, S.F.; et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2014, 384, 766–781. [CrossRef]
- 2. Pearce, M.; Bray, I.; Horswell, M. Weight gain in mid-childhood and its relationship with the fast food environment. *J. Public Health (Oxf.)* **2017**, *10*, 1–8. [CrossRef] [PubMed]
- 3. Krssak, M.; Falk Petersen, K.; Dresner, A.; DiPietro, L.; Vogel, S.M.; Rothman, D.L.; Roden, M.; Shulman, G.I. Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: A 1H-NMR spectroscopy study. *Diabetologia* **1999**, *42*, 113–116. [CrossRef] [PubMed]

- 4. Greco, A.V.; Mingrone, G.; Giancaterini, A.; Manco, M.; Morroni, M.; Cinti, S.; Granzotto, M.; Vettor, R.; Camastra, S.; Ferrannini, E. Insulin resistance in morbid obesity reversal with intramyocellular fat depletion. *Diabetes* **2002**, *51*, 144–151. [CrossRef] [PubMed]
- 5. Villena, J.A. New insights into PGC-1 coactivators: Redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond. *FEBS J.* **2015**, *282*, 647–672. [CrossRef] [PubMed]
- Viscomi, C.; Bottani, E.; Civiletto, G.; Cerutti, R.; Moggio, M.; Fagiolari, G.; Schon, E.A.; Lamperti, C.; Zeviani, M. In vivo correction of COX deficiency by activation of the AMPK/PGC-1α axis. *Cell Metab.* 2011, 14, 80–90. [CrossRef] [PubMed]
- 7. Cantó, C.; Auwerx, J. PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr. Opin. Lipidol.* **2009**, *20*, 98–105. [CrossRef] [PubMed]
- Nomura, S.; Ichinose, T.; Jinde, M.; Kawashima, Y.; Tachiyashiki, K.; Imaizumi, K. Tea catechins enhance the mRNA expression of uncoupling protein 1 in rat brown adipose tissue. *J. Nutr. Biochem.* 2008, 19, 840–847. [CrossRef] [PubMed]
- Wang, S.; Wang, X.; Ye, Z.; Xu, C.; Zhang, M.; Ruan, B.; Wei, M.; Jiang, Y.; Zhang, Y.; Wang, L.; et al. Curcumin promotes browning of white adipose tissue in a norepinephrine-dependent way. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015, 466, 247–253. [CrossRef] [PubMed]
- Zhang, X.; Zhang, Q.X.; Wang, X.; Zhang, L.; Qu, W.; Bao, B.; Liu, C.A.; Liu, J. Dietary luteolin activates browning and thermogenesis in mice through an AMPK/PGC1α pathway-mediated mechanism. *Int. J. Obes.* (*Lond.*) 2016, 40, 1841–1849. [CrossRef] [PubMed]
- 11. Lagouge, M.; Argmann, C.; Gerhart-Hines, Z.; Meziane, H.; Lerin, C.; Daussin, F.; Messadeq, N.; Milne, J.; Lambert, P.; Elliott, P.; et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* **2006**, *127*, 1109–1122. [CrossRef] [PubMed]
- 12. Baur, J.A.; Pearson, K.J.; Price, N.L.; Jamieson, H.A.; Lerin, C.; Kalra, A.; Prabhu, V.V.; Allard, J.S.; Lopez-Lluch, G.; Lewis, K.; et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* **2006**, 444, 337–342. [CrossRef] [PubMed]
- 13. Krewer Cda, C.; Ribeiro, E.E.; Ribeiro, E.A.; Moresco, R.N.; da Rocha, M.I.; Montagner, G.F.; Machado, M.M.; Viegas, K.; Brito, E.; da Cruz, I.B. Habitual intake of guarana and metabolic morbidities: An epidemiological study of an elderly Amazonian population. *Phytother. Res.* **2011**, *25*, 1367–1374. [CrossRef] [PubMed]
- Harrold, J.A.; Hughes, G.M.; O'Shiel, K.; Quinn, E.; Boyland, E.J.; Williams, N.J.; Halford, J.C. Acute effects of a herb extract formulation and inulin fibre on appetite, energy intake and food choice. *Appetite* 2013, 62, 84–90. [CrossRef] [PubMed]
- 15. Lima, N.S.; Numata, E.P.; Mesquita, L.M.S.; Dias, P.H.; Vilegas, W.; Gambero, A.; Ribeiro, M.L. Modulatory effects of guarana (*Paullinia cupana*) on adipogenesis. *Nutrients* **2017**, *20*, 635. [CrossRef]
- 16. Bérubé-Parent, S.; Pelletier, C.; Doré, J.; Tremblay, A. Effects of encapsulated green tea and Guarana extracts containing a mixture of epigallocatechin-3-gallate and caffeine on 24 h energy expenditure and fat oxidation in men. *Br. J. Nutr.* **2005**, *94*, 432–436. [CrossRef] [PubMed]
- 17. Tseng, Y.H.; Kokkotou, E.; Schulz, T.J.; Huang, T.L.; Winnay, J.N.; Taniguchi, C.M.; Tran, T.T.; Suzuki, R.; Espinoza, D.O.; Yamamoto, Y.; et al. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature* **2008**, *454*, 1000–1004. [CrossRef] [PubMed]
- Santos, J.C.; Gotardo, E.M.; Piraee, M.; Gambero, A.; Ribeiro, M.L. Effects of yerba maté, a plant extract formulation ("YGD") and resveratrol in 3T3-L1 adipogenesis. *Molecules* 2014, 19, 16909–16924. [CrossRef] [PubMed]
- Celestino, M.M.; Gomes, A.C.; Botelho, P.B.; Gambero, A.; de Souza Mesquita, L.M.; Vilegas, W.; Ribeiro, M.L.; Mota, J.F. South American herbal extracts reduce food intake through modulation of gastrointestinal hormones in overweight and obese women. *J. Funct. Foods* 2017. [CrossRef]
- 20. Alkhatib, A.; Seijo, M.; Larumbe, E.; Naclerio, F. Acute effectiveness of a "fat-loss" product on substrate utilization, perception of hunger, mood state and rate of perceived exertion at rest and during exercise. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* **2015**, *12*, 44. [CrossRef] [PubMed]
- 21. Kalinovich, A.V.; Mattsson, C.L.; Youssef, M.R.; Petrovic, N.; Ost, M.; Skulachev, V.P.; Shabalina, I.G. Mitochondria-targeted dodecyltriphenylphosphonium (C12TPP) combats high-fat-diet-induced obesity in mice. *Int. J. Obes. (Lond.)* **2016**, *40*, 1864–1874. [CrossRef] [PubMed]

- Moro, C.; Harant, I.; Badin, P.M.; Patarca, F.X.; Guilland, J.C.; Bourlier, V.; Langin, D.; De Glisezinski, I. Influence of lipolysis and fatty acid availability on fuel selection during exercise. *J. Physiol. Biochem.* 2014, 70, 583–591. [CrossRef] [PubMed]
- 23. Cadoná, F.C.; Machado, A.K.; Azzolin, V.F.; Barbisan, F.; Dornelles, E.B.; Glanzner, W.; Gonçalves, P.B.; Assmann, C.E.; Ribeiro, E.E.; da Cruz, I.B. Guaraná a richest caffeine food increase oxaliplatin sensitivity of colorectal HT-29 cells by apoptosis pathway modulation. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2015**, *16*, 26673759.
- 24. Hursel, R.; Viechtbauer, W.; Dulloo, A.G.; Tremblay, A.; Tappy, L.; Rumpler, W.; Westerterp-Plantenga, M.S. The effects of catechin rich teas and caffeine on energy expenditure and fat oxidation: A meta-analysis. *Obes. Rev.* **2011**, *12*, e573–e581. [CrossRef] [PubMed]
- Vaughan, R.A.; Garcia-Smith, R.; Bisoffi, M.; Trujillo, K.A.; Conn, C.A. Effects of caffeine on metabolism and mitochondria biogenesis in rhabdomyosarcoma cells compared with 2,4-dinitrophenol. *Nutr. Metab. Insights* 2012, 5, 59–70. [CrossRef] [PubMed]
- Wu, L.; Meng, J.; Shen, Q.; Zhang, Y.; Pan, S.; Chen, Z.; Zhu, L.Q.; Lu, Y.; Huang, Y.; Zhang, G. Caffeine inhibits hypothalamic A₁R to excite oxytocin neuron and ameliorate dietary obesity in mice. *Nat. Commun.* 2017, 27, 15904. [CrossRef] [PubMed]
- 27. Zheng, G.; Sayama, K.; Okubo, T.; Juneja, L.R.; Oguni, I. Anti-obesity effects of three major components of green tea, catechins, caffeine and theanine, in mice. *In Vivo* **2004**, *18*, 55–62. [PubMed]
- Murase, T.; Nagasawa, A.; Suzuki, J.; Hase, T.; Tokimitsu, I. Beneficial effects of tea catechins on dietinduced obesity: Stimulation of lipid catabolism in the liver. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2002, 26, 1459–1464. [CrossRef] [PubMed]
- 29. Dangol, M.; Kim, S.; Li, C.G.; Fakhraei Lahiji, S.; Jang, M.; Ma, Y.; Huh, I.; Jung, H. Anti-obesity effect of a novel caffeine-loaded dissolving microneedle patch in high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice. *J. Control Release* **2017**, *265*, 41–47. [CrossRef] [PubMed]
- Campbell, B.I.; Zito, G.; Colquhoun, R.; Martinez, N.; Kendall, K.; Buchanan, L.; Lehn, M.; Johnson, M.; St Louis, C.; Smith, Y.; et al. The effects of a single-dose thermogenic supplement on resting metabolic rate and hemodynamic variables in healthy females—A randomized, double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 2016, *13*, 13. [CrossRef] [PubMed]
- Cedikova, M.; Kripnerová, M.; Dvorakova, J.; Pitule, P.; Grundmanova, M.; Babuska, V.; Mullerova, D.; Kuncova, J. Mitochondria in White, Brown, and Beige Adipocytes. *Stem Cells Int.* 2016, 2016, 6067349. [CrossRef] [PubMed]
- 32. Wang, B.; Sun, J.; Ma, Y.; Wu, G.; Tian, Y.; Shi, Y.; Le, G. Resveratrol preserves mitochondrial function, stimulates mitochondrial biogenesis, and attenuates oxidative stress in regulatory T cells of mice fed a high-fat diet. *J. Food Sci.* **2014**, *79*, H1823–H1831. [CrossRef] [PubMed]
- Wright, D.C.; Geiger, P.C.; Han, D.H.; Jones, T.E.; Holloszy, J.O. Calcium induces increases in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha and mitochondrial biogenesis by a pathway leading to p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.* 2007, 282, 18793–18799. [CrossRef] [PubMed]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).
CONCLUSÃO

Podemos concluir que os polifénois como erva-mate e guaraná provaram ser excelentes reguladores termogênicos e estimuladores da biogênese mitocondrial. A ervamate melhorou a função mitocondrial, estimulou a biogênese mitocondrial a expressão de UCPs, levando a um aumento da capacidade respiratória sobressalente e dissipação de energia tanto no músculo estriado esquelético como no tecido adiposo marrom.

O guaraná levou ao aumento do metabolismo energético e estimulou a biogênese mitocondrial no músculo estriado esquelético e no tecido adiposo marrom e atuou sobre a redução do ganho do peso mesmo com a dieta hiperlipídica.

O guaraná e a erva-mate são compostos naturais que modulam a função mitocondrial que contribuem para a redução do peso como também reestabelecem a homeostase metabólica. Desta forma estes polifenois apresentam uma esperança para a prevenção e tratamento da obesidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Notícias: Sibutramina e remédios para emagrecer: entenda.** Disponível em: <u>https://www.gov.br/anvisa/pt-br</u>. Acesso em 23 dez.2020.

ALBERDI, G.; RODRIGUEZ, V.M.; MIRANDA, J.; MACARULLA, M.T.; CHURRUCA, I.; PORTILLO, M.P. Thermogenesis is involved in the body-fat lowering effects of resveratrol in rats. **Food Chem.**, v.141, p.1530–1535, 2013.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RALF, M. ROBERTS, K.; WALTER, P.; WILSSON, J.; HUNT, T.; ANDRADE, A.E.B.; BIZARRO, C.V.; RENARD, G. Biologia Molecular da Célula. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.1464p.

ANDERSON, A.J; JACKSON, T.D.; STROUD, D.A.; STOJANOVSKI D. Mitochondria— hubs for regulating cellular biochemistry: emerging concepts and networks. **Open Biol.**, v.9, n. 190126, 2019.

ANNESLEY, S.J.; FISHER, P.R. Mitochondria in Health and Disease. **Cells**, *v*.8, n.7, p.680; 2019.

ANTONI, R; JOHNSTON, KELLY L.; COLLINS, ADAM L.; ROBERTSON, DENISE M. Effects of intermittent fasting on glucose and lipid metabolism. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.76.n.3, p. 361-368, 2016.

ARÇARI, D.P., BARTCHEWSKY, W., DOS SANTOS, T.W., OLIVEIRA, K.A., FUNCK, A., PEDRAZZOLI, J., DE SOUZA, M.F., SAAD, M.J., BASTOS, D.H., GAMBERO, A., CARVALHO, P.D.O. AND RIBEIRO, M.L., Antiobesity Effects of *yerba maté* Extract (*llex paraguariensis*) in High-fat Diet–induced Obese Mice. **Obesity**, n.17, p. 2127-2133, 2009.

ARÇARI, D.P; BARTCHEWSKY JR, W.; DOS SANTOS, T.W.; OLIVEIRA,K.A.; DE OLIVEIRA, C.C.; GOTARDO, E.; PEDRAZZOLI JR, J.; GAMBERO, A.; FERRAZ, L.C.; CARVALHO, P.O.; RIBEIRO, M.L. Anti-inflammatory effects of yerba maté extract (Ilex paraguariensis) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.335, p.110-115, 2011.

BASTOS, D.H.M.; OLIVEIRA, D.M.DE; MATSUMOTO, R.L.T., CARVALHO P.O.; RIBEIRO, M.L. *Yerba mate:* pharmacological properties, research and biotechnology. **Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol.**, v.1, p.37-46, 2007

BAUR, J.A.; PEARSON, K.J.; PRICE, N.L.; JAMIESON, H.A.; LERIN, C.; KALRA, A.; PRABHU, V.V.; ALLARD, J.S.; LOPEZ-LLUCH, G.; LEWIS, K., Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature**, v.444, p.337–342, 2006.

BERUBE-PARENT, S.; PELLETIER, C.; DORE, J.; TREMBLAY, A. Effects of encapsulated green tea and guarana extracts containing a mixture of epigallocatechin-3-gallate and caffeine on 24 h energy expenditure and fat oxidation in men. **Br. J. Nutr.**, v.94, p.432–436, 2005.

BORCHARDT, R.T.; HUBER, J.A. Catechol o-methyltransferase. 5. Structure-activity relationships for inhibition by flavonoids. **J. Med. Chem.**, v.18, p.120–122, 1975.

BRAND, M.D.; NICHOLLS, D.G. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. **Biochem. J.**, v.435, p. 297–312, 2011.

BRACESCO, N.; SANCHES, A.G.; CONTRERAS,V.; MENINI,T.; GUGLIUCCI, A. Recent advances on *llex paraguariensis* research: minireview. **J.Ethnopharmacol.**, v.136, n.3, p. 378-84, 2011.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, **Agência Saúde**. Disponível em : <u>https://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude</u>. Acesso em 20 ago.2020.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: Function and physiological significance. **Physiol. Rev.**, v.84, p.277-359, 2004.

CANTO, C.; GERHART-HINES, Z.; FEIGE, J.N.; LAGOUGE, M.; NORIEGA, L.; MILNE, J.C.; ELLIOTT, P.J.; PUIGSERVER, P.; AUWERX, J. Ampk regulates energy expenditure by modulating nad+ metabolism and sirt1 activity. **Nature**, v.458, p.1056–1060, 2009.

CARDEAL, M. A. **Termogênese induzida pela dieta em pacientes com reganho de peso após o bypass gástrico em y-de-roux.** 2015. 97 f., il. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana) Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

CARVALHO, L.V.N; CORDEIRO,M.F.; LINS E LINS, T.U.; SAMPAIO, M.C.P.D.; MELLO,G.S.V.; COSTA, V.C.M.; MARQUES, L.M.M.; KLEIN, T.; MELLO, J.C.P.; CAVALCANTI, I.M.F.; PITTA, I.R.; PITTA, M.G.R.; REGO, M.J.B.M., Evaluation of Antibacterial, Antineoplastic, and Immunomodulatory Activity of *Paullinia cupana* Seeds Crude Extract and Ethyl-Acetate Fraction. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2016, p.1-7, 2016.

CEDERROTH, C.R.; VINCIGUERRA, M.; KUHNE, F.; MADANI, R.; DOERGE, D.R.; VISSER, T.J.; FOTI, M.; ROHNER-JEANRENAUD, F.; VASSALLI, J.D.; NEF, S. A phytoestrogen-rich diet increases energy expenditure and decreases adiposity in mice. **Environ. Health Perspect.**, v.115, p.1467–1473, 2007.

CHEN, D.; WANG, C.Y.; LAMBERT, J.D.; AI, N.; WELSH, W.J.; YANG, C.S. Inhibition of human liver catechol-o-methyltransferase by tea catechins and their metabolites: Structure-activity relationship and molecular-modeling studies. **Biochem. Pharmacol.**, v.69, p.1523–1531, 2005

CHERNOGUBOVA, E.; HUTCHINSON, D.S.; NEDERGAARD, J.; BENGTSSON, T. Alpha1and beta1-adrenoceptor signaling fully compensates for beta3-adrenoceptor deficiency in brown adipocyte norepinephrine-stimulated glucose uptake. **Endocrinology**, v.146, p.2271– 2284, 2005.

CHIN, D.; HAGL, S.; HOEHN, A.; HUEBBE, P.; PALLAUF, K.; GRUNE, T.; FRANK, J.; ECKERT, G.P.; RIMBACH, G. Adenosine triphosphate concentrations are higher in the brain of apoe3- compared to apoe4-targeted replacement mice and can be modulated by curcumin. **Genes Nutr.**, v.9, p.397, 2014.

CHO, A.S.; JEON, S.M.; KIM, M.J.; YEO, J.; SEO, K.I.; CHOI, M.S.; LEE, M.K. Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. **Food Chem. Toxicol.**, v.48, p.937–943, 2010.

CHONDRONIKOLA, M.; VOLPI, E.; BORSHEIM, E.; PORTER, C.; ANNAMALAI, P.; ENERBACK, S.; LIDELL, M.E.; SARAF, M.K.; LABBE, S.M.; HURREN, N.M. Brown adipose tissue improves whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity in humans. **Diabetes**, v.63, p.4089–4099, 2014.

COLITI, M, GRASSO, S. Nutraceuticals and regulation of adipocyte life: Premises or promises. **BioFactors**, v.40, n.4, p.398-418, 2014.

COSTA, R.M. DA **Disfunção mitocondrial no tecido adiposo perivascular seu papel nas alterações vasculares em modelo experimental de obesidade.** 2015,121 p. Dissertação. (Mestrado em Farmacologia) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

CRESPILLO, A.; ALONSO, M.; VIDA, M.; PAVON, F.J.; SERRANO, A.; RIVERA, P.; ROMERO-ZERBO, Y.; FERNANDEZ-LLEBREZ, P.; MARTINEZ, A.; PEREZ-VALERO, V. Reduction of body weight, liver steatosis and expression of stearoyl-coa desaturase 1 by the isoflavone daidzein in diet-induced obesity. **Br. J. Pharmacol.**, v.164, p.1899–1915, 2011.

CYPESS, A.M.; LEHMAN, S.; WILLIAMS, G.; TAL, I.; RODMAN, D.; GOLDFINE, A.B.; KUO, F.C.; PALMER, E.L.; TSENG, Y.H.; DORIA, A. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. **N. Engl. J. Med.**, v.360, p.1509–1517, 2009.

DA-SILVA, W.S.; HARNEY, J.W.; KIM, B.W.; LI, J.; BIANCO, S.D.; CRESCENZI, A.; CHRISTOFFOLETE, M.A.; HUANG, S.A.; BIANCO, A.C. The small polyphenolic molecule kaempferol increases cellular energy expenditure and thyroid hormone activation. **Diabetes**, v.56, p.767–776, 2007.

DAVIS, J.M.; CARLSTEDT, C.J.; CHEN, S.; CARMICHAEL, M.D.; MURPHY, E.A. The dietary flavonoid quercetin increases vo(2max) and endurance capacity. **Int. J. Sport Nutr.**

Exerc. Metab., v.20, p.56–62, 2010.

DAVIS, J.M.; MURPHY, E.A.; CARMICHAEL, M.D.; DAVIS, B. Quercetin increases brain and muscle mitochondrial biogenesis and exercise tolerance. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.296, p.1071–1077, 2009.

DE JONGE, L.; BRAY, G.A. The thermic effect of food and obesity: A critical review. **Obes. Res.**, v.5, p.622–631, 1997.

DE MELLO, A.H.; COSTA, A.B.; ENGEL, J.D.G.; REZIN, G.T. Mitochondrial dysfunction in obesity. Life Sci., v.192, p.26-32, 2018.

DECORDE, K.; TEISSEDRE, P.L.; SUTRA, T.; VENTURA, E.; CRISTOL, J.P.; ROUANET, J.M. Chardonnay grape seed procyanidin extract supplementation prevents high-fat dietinduced obesity in hamsters by improving adipokine imbalance and oxidative stress markers. **Mol. Nutr. Food Res.**, v.53, p.659–666, 2009.

DOS SANTOS, T.W.; PEREIRA, Q.C.; TEIXEIRA, L.; GAMBERO, A.; VILLENA, J.A.; RIBEIRO, M.L. Effects of Polyphenols on thermogenesis and mitochondrial biogenesis. **Int.J. Mol.Sci.**, v.19, n.9, p.2757-2771, 2018.

DULLOO, A.G.; DURET, C.; ROHRER, D.; GIRARDIER, L.; MENSI, N.; FATHI, M.; CHANTRE, P.; VANDERMANDER, J. Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.70, p.1040–1045, 1999.

EJAZ, A.; WU, D.; KWAN, P.; MEYDANI, M. Curcumin inhibits adipogenesis in 3t3-I1 adipocytes and angiogenesis and obesity in c57/bl mice. **J. Nutr.**, v.139, p.919–925, 2009.

FERNANDEZ-MARCOS, P.J.; AUWERX, J. Regulation of pgc-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. **Am J Clin Nutr.**, v.93, n.4, p.884–890, 2011.

FONSECA-ALANIZ, M.H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M.I.C.; LIMA, F.B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v.50, n.2, p.216-229, 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) **Panorama** of Food and Nutrition security in Latin America and the Caribbean. Disponível em <u>http://www.fao.org/news/story/en/item/463472/icode/. Acesso</u> em 23. jan.2017

GLEDHILL, J.R.; MONTGOMERY, M.G.; LESLIE, A.G.; WALKER, J.E. Mechanism of inhibition of bovine f1-atpase by resveratrol and related polyphenols. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.104, p.13632–13637, 2007.

GONZALEZ-MUNIESA, P.; MARTINEZ-GONZALEZ, M.A.; HU, F.B.; DESPRES, J.P.;

MATSUZAWA, Y.; LOOS, R.J.F.; MORENO, L.A.; BRAY, G.A.; MARTINEZ, J.A. Obesity. **Nat. Rev. Dis. Primers**, v.3, p.17034, 2017.

GOTTLIEB, R.A; STOTLAND, A. MitoTimer: a novel protein for monitoring mitochondrial turnover in the heart. **J. Mol. Med.**, v.93, p.271–278, 2015.

GREGERSEN, N.T.; BITZ, C.; KROG-MIKKELSEN, I.; HELS, O.; KOVACS, E.M.; RYCROFT, J.A.; FRANDSEN, E.; MELA, D.J.; ASTRUP, A. Effect of moderate intakes of different tea catechins and caffeine on acute measures of energy metabolism under sedentary conditions. **Br. J. Nutr.**, v.102, p.1187–1194, 2009.

GRUENDEL, S.; GARCIA, A.L.; OTTO, B.; MUELLER, C.; STEINIGER, J.; WEICKERT, M.O.; SPETH, M.; KATZ, N.; KOEBNICK, C. Carob pulp preparation rich in insoluble dietary fiber and polyphenols enhances lipid oxidation and lowers postprandial acylated ghrelin in humans. **J. Nutr.**, v.136, p.1533–1538, 2006.

GUGLER, R.; DENGLER, H.J. Inhibition of human liver catechol-o-methyltransferase by flavonoids. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, v.276, p.223–233,1973.

HARBRON, J.; VAN DER MERWE, L.; ZAAHL, M.G.; KOTZE, M.J.; SENEKAL, M. Fat mass and obesity- associated (fto) gene polymorphisms are associated with physical activity, food intake, eating behaviors, psychological health, and modeled change in body mass index in overweight/obese caucasian adults. **Nutrients**, v.6, p.3130–3152, 2014.

HARROLD, J.A.; HUGHES, G.M.; O'SHIEL, K.; QUINN, E.; BOYLAND, E.J.; WILLIAMS, N.J.; HALFORD, J.C. Acute effects of a herb extract formulation and inulin fibre on appetite, energy intake and food choice. **Appetite**, v.62, p.84–90, 2013.

HAUNER, H.; VOLLHARDT, C; SCHNEIDER, K.T., ZIMMERMANN, A., SCHUSTER, T; AMANN-GASSNER, U. The Impact of Nutritional Fatty Acids during Pregnancy and Lactation on Early Human Adipose Tissue Development. **Ann Nutr Metab.**, v.54, p.97–103, 2009.

HAWLEY, S.A.; ROSS, F.A.; CHEVTZOFF, C.; GREEN, K.A.; EVANS, A.; FOGARTY, S.; TOWLER, M.C.; BROWN, L.J.; OGUNBAYO, O.A.; EVANS, A.M. Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of ampk activation. **Cell Metabol.**, v11, p.554–565, 2010.

HOLLIS, J.H.; HOUCHINS, J.A.; BLUMBERG, J.B.; MATTES, R.D. Effects of concord grape juice on appetite, diet, body weight, lipid profile, and antioxidant status of adults. **J. Am. Coll. Nutr.**, v.28, 574–582, 2009.

HOU, X.; XU, S.; MAITLAND-TOOLAN, K.A.; SATO, K.; JIANG, B.; IDO, Y.; LAN, F.; WALSH, K.; WIERZBICKI, M.; VERBEUREN, T.J. Sirt1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating amp-activated protein kinase. **J. Biol. Chem.**, v.283, p.20015–20026, 2008.

HUGHES, L.A.; ARTS, I.C.; AMBERGEN, T.; BRANTS, H.A.; DAGNELIE, P.C.; GOLDBOHM, R.A.; VAN DEN BRANDT, P.A.; WEIJENBERG, M.P. Higher dietary flavone, flavonol, and catechin intakes are associated with less of an increase in bmi over time in women: A longitudinal analysis from the netherlands cohort study. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.88, p.1341–1352, 2008.

HUTTUNEN, P.; HIRVONEN, J.; KINNULA, V. The occurrence of brown adipose tissue in outdoor workers. **Eur. J. Appl. Physiol. Occup. Physiol.**, v.46, p.339–345, 1981.

IM, A.R.; KIM, Y.H.; UDDIN, M.R.; LEE, H.W.; CHAE, S.W.; KIM, Y.H.; JUNG, W.S.; KANG, B.J.; MUN, C.S.; LEE, M.Y. *Scutellaria baicalensis* extracts and flavonoids protect rat l6 cells from antimycin a-induced mitochondrial dysfunction. **Evid. Based. Complement. Alternat. Med.**, v.2012, p.517965- 517973, 2012.

ITEM, F.; KONRAD, D. Visceral fat and metabolic inflammation: The portal theory revisited. **Obes. Rev.**, v.13, p.30-39, 2012.

KIM, G.W.; LIN, J.E.; BLOMAIN, E.S.; WALDMAN, S.A. Antiobesity pharmacotherapy: New drugs and emerging targets. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v.95, p.53–66, 2014.

KOWALTOWSKY, A.J. Participação das mitocôndrias na regulação da viabilidade celular. Livre Docente. USP. São Paulo. 1-32.2004.

KREWER CDA, C.; RIBEIRO, E.E.; RIBEIRO, E.A.; MORESCO, R.N.; DA ROCHA, M.I.; MONTAGNER, G.F.; MACHADO, M.M.; VIEGAS, K.; BRITO, E.; DA CRUZ, I.B. Habitual intake of guarana and metabolic morbidities: An epidemiological study of an elderly Amazonian population. **Phytother. Res.**, v.25, p.1367–1374, 2011.

KU, C.R.; CHO, Y.H.; HONG, Z.Y.; LEE, H.; LEE, S.J.; HONG, S.S.; LEE, E.J. The effects of high fat diet and resveratrol on mitochondrial activity of brown adipocytes. **Endocrinol. Metab.**, v.31, p.328–335, 2016.

KUMAR, P.; BHANDARI, U. Obesity pharmacotherapy: Current status. **EXCLI J.**, v.14, p.290–293, 2015.

LACROIX, S., KLICIC BADOUX, J., SCOTT-BOYER, MP. A computationally driven analysis of the polyphenol-protein interactome. **Sci Rep.**, v.8, p.2232 ,2018.

LAGOUGE, M.; ARGMANN, C.; GERHART-HINES, Z.; MEZIANE, H.; LERIN, C.; DAUSSIN, F.; MESSADEQ, N.; MILNE, J.; LAMBERT, P.; ELLIOTT, P. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating sirt1 and pgc-1alpha. **Cell**, v. 127, p.1109–1122, 2006.

LAI, C.S.; WU, J.C.; HO, C.T.; PAN, M.H. Chemoprevention of obesity by dietary natural

compounds targeting mitochondrial regulation. Mol. Nutr. Food Res., v.61, n.6., 2017.

LAI, C.-S.; WU, J.-C.; PAN, M.-H. Molecular mechanism on functional food bioactives for antiobesity. **Curr. Opin. Food Sci.**, v.2, p.9–13, 2015.

LAN, F.; CACICEDO, J.M.; RUDERMAN, N.; IDO, Y. Sirt1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of lkb1. Possible role in amp-activated protein kinase activation. **J. Biol. Chem.**, v.283, p. 27628–27635, 2008.

LI, L.; PAN, R.; LI, R.; NIEMANN, B.; AURICH, A.C.; CHEN, Y.; ROHRBACH, S. Mitochondrial biogenesis and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha (pgc-1alpha) deacetylation by physical activity: Intact adipocytokine signaling is required. **Diabetes**, v.60, p.157–167, 2011.

LI, X.; WANG, H.; GAO, Y.; LI, L.; TANG, C.; WEN, G.; ZHOU, Y.; ZHOU, M.; MAO, L.; FAN, Y. Protective effects of quercetin on mitochondrial biogenesis in experimental traumatic brain injury via the nrf2 signaling pathway. **PLoS ONE**, v.11, n.10, p1-12, 2016.

LIMA, N.S.; NUMATA, E.P.; MESQUITA, L.M.S.; DIAS, P.H.; VILEGAS, W.; GAMBERO, A.; RIBEIRO, M.L. Modulatory effects of guarana (*Paullinia cupana*) on adipogenesis. **Nutrients**, v.20, p.635, 2017.

LIMA, W.P.; CARNEVALI JR, EDER, L.C.; COSTA ROSA, L.F.; BACCHI, E.M.; SEELAENDER, M.C. Lipid metabolism in trained rats: effect of guarana (*Paullinia cupana* Mart.) supplementation. **Clin. Nutr.**, v.24, p.1019–1028, 2005.

LIU, P.; ZOU, D.; YI, L.; CHEN, M.; GAO, Y.; ZHOU, R.; ZHANG, Q.; ZHOU, Y.; ZHU, J.; CHEN, K. Quercetin ameliorates hypobaric hypoxia-induced memory impairment through mitochondrial and neuron function adaptation via the pgc-1alpha pathway. **Restor. Neurol. Neurosci.**, v.33, p.143–157, 2015.

LONAC, M.C.; RICHARDS, J.C.; SCHWEDER, M.M.; JOHNSON, T.K.; BELL, C. Influence of short-term consumption of the caffeine-free, epigallocatechin-3-gallate supplement, teavigo, on resting metabolism and the thermic effect of feeding. **Obesity**, v.19, p.298–304, 2011.

LOWELL, B.B.; SPIEGELMAN, B.M. Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. **Nature**, v.404, p.652-660, 2000.

MANCINI, M.C. Tratado de Obesidade 2ªed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2015

MARTIN J.G.P; PORTO E.; ALENCAR S.M., DA GLÓRIA E.M., CORRÊA C. B.; CABRAL, I.S.R. Antimicrobial activity of yerba mate (Ilex paraguariensis St. Hil.) against food pathogens. **Rev Argent Microbiol.**, v.45, n.2, p.93-98, 2013.

MILESKI, K.S. de L. Efeitos de diferentes protocolos de treinamento físico na expressão de genes relacionados a termogênese do tecido adiposo de camundongos com obesidade induzida pela dieta. 104 f., il. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

MIRANDA, D.D., ARÇARI, D.P., PEDRAZZOLI, J.JR.; CARVALHO, P.O.; CERUTTI, S.M.; BASTOS, D.H.M.; RIBEIRO, M.L. Protective effects of mate tea (*llex paraguariensis*) on H2O2-induced DNA damage and DNA repair in mice. **Mutagenesis**, v.23, n.4, p.261-265, 2008.

MONTANARI, T., POŠĆIĆ, N., COLITTI, M. Factors involved in white-to-brown adipose tissue conversion and in thermogenesis: a review. **Obesity Reviews**, v.18, p.495–513, 2017.

NEDERGAARD, J.; BENGTSSON, T.; CANNON, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v.293, p.444–452, 2007.

NIEMAN, D.C.; WILLIAMS, A.S.; SHANELY, R.A.; JIN, F.; MCANULTY, S.R.; TRIPLETT, N.T.; AUSTIN, M.D.; HENSON, D.A. Quercetin's influence on exercise performance and muscle mitochondrial biogenesis. **Med. Sci. Sports. Exerc.**, v.42, p.338–345, 2010.

OI-KANO, Y.; KAWADA, T.; WATANABE, T.; KOYAMA, F.; WATANABE, K.; SENBONGI, R.; IWAI, K. Oleuropein, a phenolic compound in extra virgin olive oil, increases uncoupling protein 1 content in brown adipose tissue and enhances noradrenaline and adrenaline secretions in rats. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v.54, p.363–370, 2008.

OKLA, M; KIM, J; KOEHLER, K; CHUNG, S. Dietary Factors Promoting Brown and Beige Fat Development and Thermogenesis. **Adv Nutr.**, v.8, n.3, p.473-483, 2017.

ORGAARD, A.; JENSEN, L. The effects of soy isoflavones on obesity. **Exp. Biol. Med.**, v.233, p.1066–1080, 2008.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS) **World Health Data Platform: Indicators.** Disponível em: <u>http://www.who.int/gho/database/en/</u>. Acesso em 23.dez.2020.

PALMA, R.P. Análise da expressão das catepsinas K, L e S durante a diferenciação induzida de adipócitos 3T3-L1. 2014.47p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Universidade Federal do ABC, Santo André, 2014. PAN, M.H.; KOH, Y.C; LEE, T.L; WANG, B.; CHEN, W.K.; NAGABHUSHANAM, K.; HO, C.T. Resveratrol and Oxyresveratrol Activate Thermogenesis via Different Transcriptional Coactivators in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.**, v.67, n.49, p.13605-13616, 2019.

PANG J.; CHOI, Y.; PARK, T. *Ilex paraguarienses* extract ameliorates obesity induced by hight-fat diet: Potencial role of AMPK in the visceral adipose tissue. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.476, p.178-185. 2008.

PARK, A.; KIM, W.K., BAE, K.H. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. **World J Stem Cells.**, v.6, n.1, p.33-42. 2014.

PARK, S.J.; AHMAD, F.; PHILP, A.; BAAR, K.; WILLIAMS, T.; LUO, H.; KE, H.; REHMANN, H.; TAUSSIG, R.; BROWN, A.L.; Resveratrol ameliorates aging-related metabolic phenotypes by inhibiting camp phosphodiesterases. **Cell**, v.148, p.421–433, 2012.

PARK, S., CHOI, S.G., YOO, S.M., NAH, J., JEONG, E., KIM, H., AND JUNG, Y.K. Pyruvate stimulates mitophagy via PINK1 stabilization. **Cell Signal.**, v.27, p.1824-1830, 2015.

PHUNG, O.J.; BAKER, W.L.; MATTHEWS, L.J.; LANOSA, M.; THORNE, A.; COLEMAN, C.I. Effect of green tea catechins with or without caffeine on anthropometric measures: A systematic review and meta-analysis. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 91, p.73–81, 2010.

PICARD, M.; TAIVASSALO, T.; GOUSPILLOU, G.; HEPPLE, R.T. Mitochondria: Isolation, structure and function. **J. Physiol.**, v.589, p.4413-4421. 2011.

PRASANTH, M. I.; SIVAMARUTHI, B. S.; CHAIYASUT, C.; TENCOMNAO, T. A Review of the Role of Green Tea (*Camellia sinensis*) in Antiphotoaging, Stress Resistance, Neuroprotection, and Autophagy. **Nutrients**, v.11, n.2, p.1-24, 2019.

PRICE, N.L.; GOMES, A.P.; LING, A.J.; DUARTE, F.V.; MARTIN-MONTALVO, A.; NORTH, B.J.; AGARWAL, B.; YE, L.; RAMADORI, G.; TEODORO, J.S. Sirt1 is required for ampk activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. **Cell Metabol.**, v.15, p.675–690, 2012.

POPOV, L.D. Mitochondrial biogenesis: An update. **J Cell Mol Med.**, v.24, p.4892–4899, 2020.

RAY, S.; PHANDKE, S.; PATEL, C.; HACKMAN, R.; STOHNS, S. Short-term and long -term in vivo exposure to na ephedra and caffeine-containing metabolic nutrition system dors not induce cardiotoxicity in B6C3F1 mice. **Arch. Toxicol.**, v.79, p.330-340, 2005.

RAYAMAJHI, N.; KIM, S.-K.; GO, H.; JOE, Y.; CALLAWAY, Z.; KANG, J.-G.; RYTER, S.W.; CHUNG, H.T. Quercetin induces mitochondrial biogenesis through activation of ho-1 in hepg2

cells. Oxid. Med. Cell. Longev., v.2013, p.1-10, 2013.

REHMAN, H.; KRISHNASAMY, Y.; HAQUE, K.; THURMAN, R.G.; LEMASTERS, J.J.; SCHNELLMANN, R.G.; ZHONG, Z. Green tea polyphenols stimulate mitochondrial biogenesis and improve renal function after chronic cyclosporin a treatment in rats. **PLoS ONE**, v. 8, n.6, p.1-12, 2014.

ROBERTS A.T; JONGE-LEVITAN, L.; PARKER C.C; GREENWAY, F.L. The effect of na Herbal Supplement containing Black tea and Caffeine on metabolic parameters in Humans. **Alternative Medicine Review**, v.10, n.4, p.321-325, 2006.

RUDELLE, S.; FERRUZZI, M.G.; CRISTIANI, I.; MOULIN, J.; MACE, K.; ACHESON, K.J.; TAPPY, L. Effect of a thermogenic beverage on 24-hour energy metabolism in humans. **Obesity**, v.15, p.349–355, 2007.

SANTOS, J.C.; GOTARDO, É.M.F.; BRIANTI, M.T.; PIRAEE, M.; GAMBERO, A.; RIBEIRO, M.L. Effects of *Yerba maté*, a Plant Extract Formulation ("YGD") and Resveratrol in 3T3-L1 Adipogenesis. *Molecules*, v.19, n.10, p. 16909-16924, 2014.

SCARPULLA, R.C. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the pgc-1 family regulatory network. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1813, p.1269–1278,2011.

SILVA, A. A.; GONÇALVES, R.C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.4, p.994-1002, 2010.

SHARMA, D.R.; SUNKARIA, A.; WANI, W.Y.; SHARMA, R.K.; VERMA, D.; PRIYANKA, K.; BAL, A.; GILL, K.D. Quercetin protects against aluminium induced oxidative stress and promotes mitochondrial biogenesis via activation of the pgc-1alpha signaling pathway. **Neurotoxicology**, v 51, p.116–137, 2015.

SPIELGEMAN BM. Regulation of adipogenesis: toward new therapeutics for metabolic disease. **Diabetes**, v.62, n.6, p.1774-1782, 2013.

STEINBERG, G.R.; KEMP, B.E. Ampk in health and disease. **Physiol. Rev.**, v.89, p.1025–1078, 2009.

TAUB, P.R.; RAMIREZ-SANCHEZ, I.; CIARALDI, T.P.; PERKINS, G.; MURPHY, A.N.; NAVIAUX, R.; HOGAN, M.; MAISEL, A.S.; HENRY, R.R.; CEBALLOS, G.; Alterations in skeletal muscle indicators of mitochondrial structure and biogenesis in patients with type 2 diabetes and heart failure: Effects of epicatechin rich cocoa. **Clin. Transl. Sci.**, v.5, p.43–47. 2012.

THIELECKE, F.; RAHN, G.; BOHNKE, J.; ADAMS, F.; BIRKENFELD, A.L.; JORDAN, J.; BOSCHMANN, M. Epigallocatechin-3-gallate and postprandial fat oxidation in

overweight/obese male volunteers: A pilot study. Eur. J. Clin. Nutr., v.64, p.704–713, 2010.

VAN DER BLIEK, A.M.; SEDENSKY, M.M.; MORGAN, P.G. Cell Biology of the Mitochondrion. **Genetics**, v.207, p.843–871, 2017.

VAN MARKEN LICHTENBELT, W.D.; SCHRAUWEN, P. Implications of nonshivering thermogenesis for energy balance regulation in humans. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.301, p.285–296, 2011.

VAN MARKEN LICHTENBELT, W.D.; VANHOMMERIG, J.W.; SMULDERS, N.M.; DROSSAERTS, J.M.; KEMERINK, G.J.; BOUVY, N.D.; SCHRAUWEN, P.; TEULE, G.J. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. **N. Engl. J. Med.**, v.360, p.1500–1508, 2009.

VENABLES, M.C.; HULSTON, C.J.; COX, H.R.; JEUKENDRUP, A.E. Green tea extract ingestion, fat oxidation, and glucose tolerance in healthy humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.87, p.778–784, 2008.

VILLENA, J.A. New insights into pgc-1 coactivators: Redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond. **FEBS J.**, v.282, p.647–672, 2015.

VIRTANEN, K.A.; LIDELL, M.E.; ORAVA, J.; HEGLIND, M.; WESTERGREN, R.; NIEMI, T.; TAITTONEN, M.; LAINE, J.; SAVISTO, N.J.; ENERBACK, S. Functional brown adipose tissue in healthy adults. **N. Engl. J. Med.**, v.360, p.1518–1525, 2009.

WANDERLEI, E.N; FERREIRA V.A. Obesidade: uma perspectiva plural. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.15, n.1, p.185-194, 2010.

WANNMACHER, L. Obesidade como fator de risco para morbidade e mortalidade: evidências sobre o manejo com medidas não medicamentosas. Uso Racional de Medicamentos: fundamentação em condutas terapêuticas e nos macroprocessos da Assistência Farmacêutica., v.1, n.7, 2016.

WAI T, LANGER T. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. **Trends Endocrinol Metab.**, v.27, n.2, p.105-117, 2016.

WIJERS, S.L.; SARIS, W.H.; VAN MARKEN LICHTENBELT, W.D. Recent advances in adaptive thermogenesis: Potential implications for the treatment of obesity. **Obes. Rev.**, v.10, p. 218–226, 2009.

YONESHIRO, T.; AITA, S.; MATSUSHITA, M.; KAMEYA, T.; NAKADA, K.; KAWAI, Y.; SAITO, M. Brown adipose tissue, whole-body energy expenditure, and thermogenesis in healthy adult men. **Obesity**, v.19, p.13–16, 2011.

YANOVSKI, S.Z.; YANOVSKI, J.A. Long-term drug treatment for obesity: A systematic and clinical review. **JAMA**, v.311, n.1, p.74-86, 2014.

YOO, S.M; JUNG, Y.K. A Molecular Approach to Mitophagy and Mitochondrial Dynamics. **Mol. Cells**, v.41, n.1, p.18-26, 2018.

YUAN, Y., ZHENG, Y., ZHANG, X., CHEN, Y., WU, X., WU, J., SHEN, Z., JIANG, L., WANG, L., YANG, W., BNIP3L/NIX-mediated mitophagy protects against ischemic brain injury independent of PARK2. **Autophagy**, v.13, p.1754-1766, 2017.

ZHU, L.; LIU, Z.; FENG, Z.; HAO, J.; SHEN, W.; LI, X.; SUN, L.; SHARMAN, E.; WANG, Y.; WERTZ, K.; Hydroxytyrosol protects against oxidative damage by simultaneous activation of mitochondrial biogenesis and phase ii detoxifying enzyme systems in retinal pigment epithelial cells. **J. Nutr. Biochem.**, v.21, p.1089–1098, 2010.