

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

**ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA YERBA MATE
EN LA GLUCEMIA, PESO CORPORAL E INGESTA
DE ALIMENTO EN RATONES.**

Sánchez, Julieta Carolina – LU 1079992

Licenciatura en Biotecnología.

Tutora:

Bumaschny, Viviana Florencia

Laboratorio de Neuroendocrinología Molecular

Instituto de Fisiología y Biofísica – Bernardo Houssay (CONICET-UBA)

Co-Tutora:

Pérez, Adriana Alicia

Universidad Argentina de la Empresa.

2021



UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA

FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	4
ABSTRACT	5
RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 La obesidad	7
1.1.1 Causas del sobrepeso y la obesidad	7
1.1.2 Características fisiopatológicas de la obesidad	8
1.1.3 Consecuencias de la obesidad y su relación con otras enfermedades	9
1.1.3.1 Obesidad y sus consecuencias en la diabetes de tipo II	10
1.1.4 Tratamientos actuales de la obesidad y sobrepeso	11
1.2 La diabetes	12
1.2.1 Tratamientos actuales de la DMT2	14
1.3 El sistema nervioso y su relación con la obesidad	15
1.4 El sistema neuroendócrino y la pro-opiomelanocortina (Pomc).....	17
1.4.1 Modelos murinos empleados en el proyecto de investigación.....	20
1.5 La yerba mate.....	21
1.5.1 Componentes de la yerba mate	23
2. HIPÓTESIS	25
3. OBJETIVOS.....	26
4. MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1 Cuidado animal	27
4.2 Generación de animales y armado de apareos	27
4.3 Marcación de animales.....	28
4.4 Purificación de ADN genómico	28
4.5 Genotipificación de los animales mediante reacción en cadena de la polimerasa a tiempo final (PCR).....	29
4.6 Electroforesis en gel de agarosa	30
4.7 Preparación de mate: extracto húmedo o cebada simulada.....	31
4.8 Preparación de mate: extracto liofilizado (extracto seco).....	32

4.9 Modo de administración de mate	34
4.9.1 Exposición aguda al mate	34
4.9.2 Exposición crónica al mate	36
4.10 Test de tolerancia a la glucosa (GTT).....	37
4.11 Extracción de grasa	39
4.12 Perfusión	41
4.13 Obtención de cortes histológicos	44
4.14 Análisis estadístico.....	45
5. RESULTADOS	
5.1 Obtención de distintas preparaciones de mate para administrar a los ratones como infusión	46
5.2 Determinación de los efectos de una exposición aguda al mate en la ingesta de alimento de ratones hembra	48
5.3 Determinación de los efectos de una exposición crónica al mate sobre la tolerancia a la glucosa en hembras.....	51
5.4 Determinación de los efectos de una exposición crónica al mate en la ingesta de alimento en ratones	53
5.5 Determinación de los efectos de una exposición crónica al mate en el peso corporal en ratones.....	54
5.5.1 Evaluación del cambios en el peso corporal y en la ingesta de alimento en ratones obesos (arcPomc ^{-/-}) dados por una exposición crónica al mate (resultados preliminares)	55
6. DISCUSIÓN.....	57
6.1 Perspectivas a futuro	60
7. CONCLUSIÓN	62
8. ALCANCES DEL PROYECTO FINAL	63
BIBLIOGRAFÍA.....	64
ANEXOS.....	72

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo y sincero agradecimiento, a todos aquellos que aportaron, colaboraron, formaron parte y que me han acompañado para que el presente proyecto final de carrera se haga realidad:

A *Vivi*, por abrirme las puertas para formar parte de su equipo de laboratorio, brindándome muchísimos conocimientos nuevos y oportunidades, por integrarme al ámbito de investigación y por instruirme en todo lo necesario para la realización de este proyecto.

A *Mili*, por entrenarme, enseñarme y ayudarme con infinita paciencia y dedicación, por colaborar con diversos experimentos, y por tener la mejor predisposición para asistirme siempre en todo lo que necesité.

A todo el *equipo de Neurociencia de Sistemas*, estudiantes, becarios, investigadores y técnicas de bioterio y de biología molecular, quienes me han integrado rápidamente a su equipo, y con quienes he compartido muchos momentos lindos y risas mientras realizaba mis experimentos en el instituto. También a la *Dra. Irene Taravini* y al *equipo de laboratorio de la Dra. Mariel Marder* por asistirnos en el proyecto, en distintas oportunidades.

A mis *profesores de carrera*, quienes me formaron y de quienes aprendí muchísimas técnicas de biología molecular, bioestadística, bioética y muchísimas áreas más que me permitieron llevar a cabo este proyecto de la mejor manera posible. Especialmente a *Fede*, quien siempre ha tenido la mejor predisposición para ayudarnos y guiarnos con diversos temas del proyecto, y a *Adriana*, co-tutora de este trabajo, quien nos ha asistido en varios temas relacionados con el análisis estadístico de los resultados.

A *Ro, Tomi, Belu y Agus*, mis amigos de la vida, quienes me han animado, apoyado y motivado para que este proyecto sea realidad.

A *Lu, Flori, Claxi, Sofi, Meli, Ailu, Mini, Tebi, Manu, Eze, Cami, Alan* por acompañarme desde el primer día, por apoyarme siempre y por haber compartido conmigo todo el camino de esta hermosa carrera, alegrándome el día a día durante todos estos años. Especialmente, a *Male*, por además escucharme siempre, acompañarme, comprenderme y ser mi mejor amiga desde el día uno.

Finalmente, a mi *familia* y a *Martín*, por su cariño y por estar siempre conmigo, acompañándome y apoyándome siempre en cada decisión que tomo, animándome a no bajar los brazos nunca y motivándome a poner siempre lo mejor de mí.

ABSTRACT

More than 1.9 billion adults around the world are overweight, of which more than 650 million are obese. There is strong evidence that BMI, central adiposity, and increased body weight predispose to type II diabetes mellitus (T2DM). The leading role of α and β -MSH melanocortins (produced by hypothalamic neurons that express the prohormone Proopiomelanocortin or *Pomc*) in the control of energy balance was demonstrated in humans and mice, in which mutations in the *Pomc* gene trigger morbid obesity as a consequence of extreme hyperphagia and decreased metabolic rate. As a result, they are predisposed to suffer from insulin resistance and diabetes, in part, due to mechanisms involving POMC-expressing neurons. The consumption of yerba mate has become popular worldwide due to growing reports about its potential health benefits. Several studies have shown that supplementation with yerba mate extracts in rats fed a high-fat diet has significantly decreased body weight, visceral fat, liver and circulating lipids, glucose, insulin, and leptin levels. This project aims to analyze whether yerba mate is beneficial for decreasing body weight, reducing food intake and increasing glucose tolerance in wild type mice. Similarly, it is intended to lay the foundations to replicate these experiments in obese mice, *knock-out* for the hypothalamic expression of POMC, in order to analyze the role of POMC in the effects of yerba mate on energy metabolism, in the future. For this reason, we have developed two ways of preparing yerba mate, which have allowed us to determine that yerba mate increases glucose tolerance and decreases basal blood glucose in wild type females. In addition, we have determined that an acute exposure to yerba mate does not generate significant effects on food intake at one hour and 2 hours after food administration in wild type female mice. Finally, we have shown that chronic exposure to yerba mate has no significant effect on food intake or body weight in wild type male and female mice. These results allow us to conclude that yerba mate generates beneficial effects on the blood glucose of wild type female mice but not on body weight or food intake, at least under the experimental conditions tested.

RESUMEN

Más de 1900 millones de personas adultas en todo el mundo padecen de sobrepeso, de las cuales más de 650 millones son obesas. Existe gran evidencia de que el IMC, la adiposidad central, y el aumento de peso corporal son factores predisponentes para la diabetes mellitus de tipo II (DMT2). El rol protagónico de las melanocortinas α y β -MSH (expresadas por las neuronas hipotalámicas que expresan la prohormona Proopiomelanocortina o POMC) en el control del balance energético, fue demostrado en seres humanos y ratones en los cuales mutaciones en el gen de *Pomc* desencadenan obesidad mórbida como producto de hiperfagia extrema y disminución de la tasa metabólica, y que como consecuencia presentan predisposición a padecer resistencia a la insulina y la consiguiente diabetes, en parte, por mecanismos que involucran a las neuronas que expresan POMC. El consumo de yerba mate se ha popularizado mundialmente debido a los crecientes reportes sobre sus potenciales beneficios a la salud. Diversos estudios han demostrado que la suplementación con extractos de yerba mate en ratas alimentadas con una dieta rica en grasas ha disminuido significativamente el peso corporal, la grasa visceral, lípidos hepáticos y en circulación, la glucosa, la insulina, y los niveles de leptina. El presente trabajo tiene el propósito de analizar si la yerba mate resulta beneficiosa para la pérdida de peso corporal, disminución de la ingesta de alimento y aumento de la tolerancia a la glucosa en ratones salvajes. Del mismo modo, se pretende sentar las bases para replicar estos experimentos en ratones obesos mutantes para la expresión hipotalámica de POMC, a fines de analizar a futuro el rol de POMC en los efectos de la yerba mate en el metabolismo energético. Por ello, hemos puesto a punto dos modos de preparación de yerba mate, que nos han permitido determinar que la yerba mate aumenta la tolerancia a la glucosa y disminuye la glucemia basal en hembras *salvajes*. Además hemos determinado que una exposición aguda a la yerba mate no genera efectos significativos en la ingesta de alimento a la hora y 2 horas posterior a la administración de alimento, en hembras *salvajes*. Por último, hemos demostrado que una exposición crónica a la yerba mate no genera efectos significativos en la ingesta de alimento ni en el peso corporal en machos y en hembras *salvajes*. Estos resultados nos permiten concluir que la yerba mate genera efectos beneficiosos en la glucemia de ratones hembra *salvajes* pero no en el peso corporal ni en la ingesta de alimento, al menos en las condiciones experimentales testeadas.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 La obesidad

Según la Organización Mundial de la Salud, más de 1900 millones de personas adultas en todo el mundo padecen de sobrepeso, de las cuales más de 650 millones son obesas (WHO, 2017). La obesidad y el sobrepeso se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud (WHO, 2020). En la práctica clínica, se evalúa el padecimiento de sobrepeso y obesidad usando el índice de masa corporal (IMC). El IMC se calcula dividiendo al peso corporal sobre la altura del individuo al cuadrado, y se define que un individuo adulto padece de sobrepeso cuando su IMC se encuentra entre 25-30 kg/m² y padece de obesidad cuando su IMC es mayor o igual a 30 kg/m². Una clasificación graduada de sobrepeso y obesidad usando valores del IMC permite establecer comparaciones significativas sobre el peso entre y dentro de poblaciones, y la detección de individuos y grupos de riesgo de obesidad mórbida y mortalidad. Asimismo, permite la evaluación de la efectividad de dichas intervenciones. Para medir el tamaño de los depósitos de grasa, en la práctica clínica se utilizan otros métodos, entre los que se destacan la circunferencia de cintura, el espesor de pliegue cutáneo y la bioimpedancia (Kopelman, 2000), los cuales complementan al parámetro IMC para la identificación de la obesidad y del sobrepeso.

1.1.1 Causas del sobrepeso y obesidad

Aunque la obesidad es mayormente causada por un exceso en el consumo energético (ingesta dietética) por sobre el gasto energético (pérdida de energía mediante actividad física y metabólica), la etiología de la obesidad es altamente compleja e incluye factores genéticos, fisiológicos, ambientales, psicológicos, sociales, económicos e incluso políticos que interactúan en diversos niveles para promover el desarrollo de la obesidad. (Wright & Aronne, 2012). La Organización Mundial de la Salud señala que a nivel mundial se evidenció lo siguiente:

- Un aumento en la ingesta de alimentos de alto contenido calórico que son ricos en grasa; y
- Un descenso en la actividad física debido a la naturaleza cada vez más sedentaria de muchas formas de trabajo, los nuevos modos de transporte y la creciente urbanización (WHO, 2020).

Además de las influencias primarias del aumento de ingesta calórica y disminución del gasto energético, Keith y col. propone 10 factores que contribuyen a que la obesidad sea un problema epidemiológico, donde se destacan los siguientes: privación del sueño, interruptores endócrinos, reducción en la variabilidad de la temperatura ambiente, disminución del tabaquismo, consumo de ciertos medicamentos (entre ellos, medicamentos psicotrópicos, anticonvulsivos, antidiabéticos, antihipertensivos, hormonas esteroideas, anticonceptivos, antihistamínicos e inhibidores de proteasas), cambios en la distribución étnica y etaria, embarazos de edad avanzada, efectos intrauterinos e intergeneracionales, selección de rendimiento reproductivo para genotipos que están más predispuestos a la obesidad y por último, emparejamiento selectivo y efectos fenotípicos (Keith et al., 2006; McAllister et al., 2009).

1.1.2 Características fisiopatológicas de la obesidad

El exceso de adiposidad generalmente evoluciona lentamente con el tiempo, con un balance energético positivo a largo plazo. La acumulación de lípidos en el tejido adiposo, principalmente triglicéridos, se produce junto con el aumento del volumen en el músculo esquelético, el hígado y otros órganos y tejidos (Hall et al., 2010).

Con el aumento de peso a lo largo del tiempo, el exceso de lípidos es distribuido a muchos compartimentos corporales. El tejido adiposo subcutáneo contiene la mayor parte de la cantidad de lípidos almacenados en una variedad de sitios anatómicos que difieren en las características metabólicas y fisiológicas (Shen et al., 2003). La mayoría de los adipocitos en el tejido adiposo subcutáneo son blancos, debido a los triglicéridos almacenados, aunque también existen cantidades relativamente pequeñas y variables de adipocitos termogénicos de color marrón y beige cuya función principal es la termogénesis (Tchkonia et al., 2013). A continuación se presentan las características generales de los adipocitos, expuestas por Heymsfield & Wadden (Heymsfield & Wadden, 2017):

- **Adipocitos blancos:** los adipocitos blancos son el tipo de célula principal que se encuentra en el tejido adiposo humano. Los triglicéridos que producen energía y el éster de colesterol se almacenan dentro de las grandes gotas de lípidos intracelulares. Leptina, adiponectina y otras adipocinas están entre las proteínas secretadas por los adipocitos blancos.

- Adipocitos marrones: con el uso de métodos de imagen, se observan depósitos de adipocitos marrones dentro de los tejidos supraclaviculares, depósitos paravertebrales, mediastínicos y otros tejidos adiposos en adultos. Múltiples gotas de lípidos y mitocondrias que contienen proteína 1-desacoplante se encuentran dentro de los adipocitos marrones, que pueden activarse para producir calor mediante la estimulación del sistema nervioso simpático después de la exposición al frío.
- Adipocitos beige: los adipocitos termogénicos beige o “brite” (“brown and white”) se encuentran dispersos dentro del tejido adiposo blanco. Se caracterizan por tener múltiples gotas de lípidos y mitocondrias que contienen proteína 1-desacoplante y tienen un origen celular progenitor. El "amarronado" del tejido adiposo blanco puede inducirse con exposición al frío, ejercicio y algunas hormonas endocrinas.

La obesidad se acompaña de aumento en los macrófagos y otras células inmunes en el tejido adiposo, en parte debido a la remodelación del tejido en respuesta a la apoptosis de los adipocitos (Grant & Dixit, 2015). Estas células inmunes secretan citoquinas proinflamatorias, que contribuyen a la resistencia a insulina que a menudo está presente en pacientes con obesidad (Heymsfield & Wadden, 2017). Asimismo, a medida que un individuo va aumentando su IMC, aumenta linealmente el nivel de secreción de insulina en ayunas, así como también luego de una carga de glucosa (Heymsfield & Wadden, 2017).

1.1.3 Consecuencias de la obesidad y su relación con otras enfermedades

Un IMC elevado es un importante factor de riesgo de enfermedades no transmisibles, como las siguientes:

- las enfermedades cardiovasculares (principalmente las cardiopatías y los accidentes cerebrovasculares)
- la diabetes mellitus tipo 2
- los trastornos del aparato locomotor (en especial la osteoartritis, una enfermedad degenerativa de las articulaciones), y
- algunos cánceres (endometrio, mama, ovarios, próstata, hígado, vesícula biliar, riñones y colon) (WHO, 2020).

Hay una relación estrecha entre el IMC y la incidencia de diversas enfermedades crónicas no transmisibles, como las mencionadas anteriormente, causadas por el exceso de grasa que es aproximadamente lineal para un rango de IMC menor a 30kg/m², pero los riesgos aumentan considerablemente para aquellos sujetos con un IMC superior a 29kg/m², independientemente del género del sujeto (Kopelman, 2000). Particularmente, en el caso de diabetes de tipo II, Willett y col. han observado que en mujeres con un IMC de 26 kg/m² el riesgo en diabetes de tipo II fue ocho veces más alto que en mujeres con un IMC normal. En el caso de IMC iguales o mayores a 29 kg/m², estos riesgos aumentaron considerablemente. (Willett et al., 1999). Por esta razón es de suma importancia continuar estudiando la interacción entre la obesidad y la diabetes de tipo II.

1.1.3.1 Obesidad y sus consecuencias en la diabetes de tipo II

Existe gran evidencia de que el IMC, la adiposidad central, y el aumento de peso corporal son factores predictores de diabetes mellitus de tipo II (DMT2). Un metaanálisis de estudios prospectivos proporcionó evidencia de que a medida que aumenta la adiposidad de la parte superior del cuerpo, aumenta tanto el riesgo de desarrollar síndromes metabólicos como el riesgo de desarrollar diabetes mellitus de tipo II. El aumento de peso en la vida adulta aumenta el riesgo de desarrollar DMT2, particularmente en el rango de edad de 25 a 40 años (Bray et al., 2018).

La obesidad se caracteriza por elevar la insulina plasmática en ayunas, y por una respuesta de insulina excesiva frente a una carga oral de glucosa. La distribución de la grasa corporal influye en el metabolismo de la glucosa a través de mecanismos independientes pero aditivos. El aumento de la obesidad de la parte superior del cuerpo predispone a la resistencia a la insulina lo que se manifiesta por una disminución en la tolerancia oral a una sobrecarga de glucosa. Los niveles de insulina se ven aumentados en la obesidad de la parte superior del cuerpo, lo que induce resistencia a la insulina periférica (Figura 1) (Kopelman, 2000).

Por otro lado, las tasas elevadas del catabolismo de grasas (lipólisis) conducen a la liberación de ácidos grasos libres. Estos tienen una acción perjudicial sobre la sensibilidad hepática a la insulina, lo que a su vez resulta en un aumento de la gluconeogénesis (generación de glucosa *de novo*), y dislipidemia sistémica. Estos factores contribuyen a la hiperinsulinemia sistémica prevalente (concentraciones elevadas de insulina en el torrente sanguíneo) y a una disminución de la sensibilidad del músculo esquelético a la insulina con una menor absorción

de glucosa. Inicialmente, las células β del páncreas compensan estos procesos produciendo más insulina. Con el tiempo, hay un fallo en las células β y se comienza a desarrollar un aumento de la concentración de glucosa en el torrente sanguíneo (hiperglucemia), y por lo tanto, diabetes mellitus de tipo II (Kopelman, 2000).

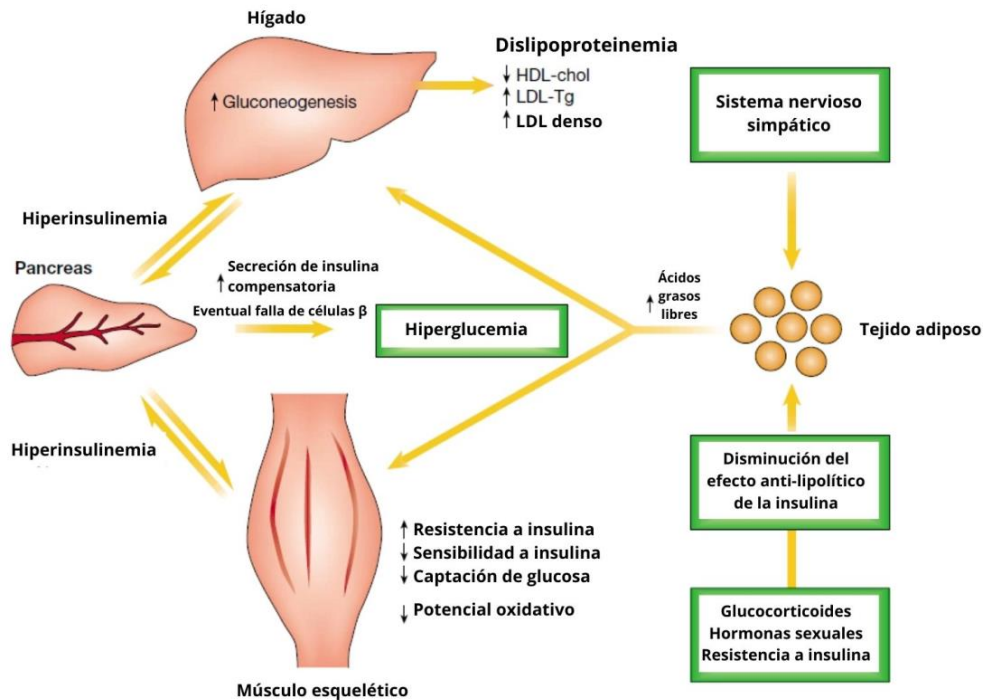


Figura 1: Ilustración esquemática del efecto del almacenamiento de altas cantidades de tejido graso en la sensibilidad a la insulina y tolerancia a la glucosa (Kopelman, 2000).

1.1.4 Tratamientos actuales de la obesidad y el sobrepeso

Los tratamientos más comunes para la obesidad y el sobrepeso incluyen la pérdida de peso mediante la alimentación saludable, ser más activo físicamente, y hacer otros cambios a los hábitos cotidianos. Los programas de manejo del peso corporal pueden ser de ayuda para algunas personas a perder peso, o a evitar ganar más peso. Algunas personas que tienen obesidad no pueden perder suficiente peso para mejorar su salud, o no pueden evitar seguir ganando peso. En dichos casos, un doctor puede considerar acompañar con tratamientos farmacológicos o quirúrgicos (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2018).

Los 5 medicamentos aprobados por la FDA para control de peso a largo plazo son tres drogas individuales y dos drogas combinadas: *Orlistat*, *Lorcaserina* y *Liraglutida*, y

Fentermina-Topiramato y Naltrexona-Bupropion, respectivamente. La pérdida de peso lograda a partir de farmacoterapia se asocia generalmente a mejoras en los factores de riesgo y enfermedades crónicas (Heymsfield & Wadden, 2017).

Con respecto a las cirugías bariátricas, estas se indican en pacientes de alto riesgo, con altas tasas de morbilidad y mortalidad, es decir, aquellos pacientes que presentan un IMC de 35-39 kg/m² y además una enfermedad coexistente, o aquellos con un IMC mayor a 39 kg/m². Aunque son más efectivos que las intervenciones en el estilo de vida y las terapias farmacológicas, estos procedimientos están asociados con mayores riesgos (Heymsfield & Wadden, 2017).

Los expertos recomiendan perder del 5-10% del peso corporal durante los primeros 6 meses de tratamiento (Jensen et al., 2014). Esta pérdida de peso puede disminuir las chances de desarrollar problemas de salud asociados a la obesidad y sobrepeso entre los que se destacan la diabetes mellitus de tipo II, síndromes metabólicos, osteoartritis, enfermedad coronaria, entre otros, así como también mejorar problemas de la salud asociados a la obesidad y sobrepeso como la hipertensión y niveles altos de colesterol (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, 2018).

1.2 La diabetes

La diabetes es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia a causa de defectos en la secreción de insulina, acción de la insulina, o ambos. La hiperglucemia crónica de la diabetes está asociada a daños a largo plazo, disfunción y falla de diferentes órganos, tales como los ojos, riñones, nervios, corazón y arterias (American Diabetes Association, 2013). A nivel mundial, el número de personas con diabetes mellitus se ha cuadruplicado en las últimas tres décadas, y la diabetes mellitus es la novena causa principal de muerte. Aproximadamente 1 de cada 11 adultos en todo el mundo ahora tiene diabetes mellitus, de los cuales, el 90% tiene diabetes mellitus tipo 2 (Zheng et al., 2018).

Los síntomas de hiperglucemia marcada incluyen poliuria, polidipsia, pérdida de peso, a veces con polifagia y visión borrosa. Las consecuencias agudas y potencialmente mortales de la diabetes no controlada son la hiperglucemia con cetoacidosis o el síndrome hiperosmolar no cetónico. Las complicaciones a largo plazo de la diabetes incluyen retinopatía con posible pérdida de visión; nefropatía que conduce a insuficiencia renal; neuropatía periférica con riesgo

de úlceras en los pies, amputaciones y articulaciones de Charcot; y neuropatía autonómica que causa síntomas gastrointestinales, genitourinarios y cardiovasculares y disfunción sexual. Los pacientes con diabetes tienen una mayor incidencia de enfermedad aterosclerótica a nivel cardiovascular, arterial periférico y cerebrovascular. Además, frecuentemente presentan hipertensión arterial y anomalías del metabolismo de las lipoproteínas (American Diabetes Association, 2013).

Existen diversos tipos de diabetes, entre los que se destacan los siguientes:

- Diabetes mellitus tipo 1: Ocurre destrucción de células β que conduce a una deficiencia absoluta de insulina. Generalmente mediado por mecanismos autoinmunes (LADA o diabetes autoinmune latente en adultos se clasifica como diabetes tipo 1).
- Diabetes mellitus tipo 2: Abarca el 90-95% de personas que padecen esta patología. Puede variar desde la resistencia a la insulina predominante con deficiencia relativa de insulina hasta la secreción defectuosa predominante con resistencia a la insulina. Con frecuencia se asocia con otros problemas del llamado “síndrome metabólico” (Kerner & Brückel, 2014).

La mayoría de los pacientes con esta forma de diabetes son obesos, y la obesidad en sí misma causa cierto grado de resistencia a la insulina (American Diabetes Association, 2013).

Algunos de los principales factores impulsores de la epidemia mundial de este tipo de diabetes incluyen sobrepeso y obesidad, el estilo de vida sedentario y un mayor consumo de dietas poco saludables que contienen altos niveles de carne roja y procesada, granos refinados y bebidas azucaradas (Zheng et al., 2018). Diferentes procesos patogénicos están involucrados en el desarrollo de la diabetes. Estos derivan desde la destrucción autoinmune de las células- β del páncreas con la consecuente deficiencia de insulina, hasta anormalidades que resultan en resistencia a la acción de la insulina. La base de las anormalidades en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas en la diabetes es la acción deficiente de la insulina en los tejidos blanco. La acción deficiente de la insulina resulta de la secreción inadecuada de la misma y/o de la disminución de la respuesta de los tejidos a la insulina por alteración de sus vías de acción (American Diabetes Association, 2013).

En particular, en la diabetes de tipo I, la causa es una deficiencia absoluta de la secreción de insulina. Las personas con mayor riesgo de desarrollar este tipo de diabetes a menudo se pueden identificar por evidencia serológica de un proceso patológico autoinmune que ocurre en

los islotes pancreáticos y por marcadores genéticos. Por otro lado, en una categoría mucho más prevalente está la diabetes tipo II cuya causa es una combinación de resistencia a la acción de la insulina y una respuesta secretora de insulina compensatoria inadecuada. Un grado de hiperglucemia suficiente para causar cambios patológicos y funcionales en varios tejidos blanco, pero sin síntomas clínicos, puede estar presente durante un largo período de tiempo antes de que se detecte la diabetes (American Diabetes Association, 2013).

1.2.1 Tratamientos actuales de la DMT2

La diabetes de tipo I puede tratarse mediante la administración de insulina al paciente, mientras que existen diversas estrategias para tratar pacientes con diabetes de tipo II, entre las que se destacan la educación al paciente en cuanto a los hábitos alimenticios, la realización de actividad física y el monitoreo de la glucemia, a veces en combinación con farmacoterapia. En particular, la *metformina* es una primera opción como monoterapia para la mayoría de los casos. Esta droga permite la reducción del riesgo de mortalidad, la ausencia de un riesgo de hipoglucemia, y efectos beneficiosos en la concentración de lípidos. Sin embargo, en diversos casos, el efecto de esta droga es muchas veces insuficiente, por lo cual se prosigue a administrar una terapia combinada con otras drogas anti-hiperglucémicas como la *sulfonylurea*, *repaglinida* o bien, con *agonistas del receptor GLP-1*. Si alguna de estas farmacoterapias de combinación dual falla o es insuficiente, es recomendada la adición de insulina (Reusch & Manson, 2017).

Una estrategia diferente para casos de diabetes de tipo II avanzada sería la cirugía bariátrica, la cual ofrece el potencial para la prevención o remisión de la diabetes, un mejor control de los factores de riesgo cardiovascular, una mejoría en la calidad de vida y posiblemente una disminución de la mortalidad (Jensen et al., 2014). Esta puede ser una opción para pacientes con obesidad extrema que no han podido disminuir su peso corporal, o bien, para pacientes con niveles menores de obesidad pero con comorbilidades (American Diabetes Association, 2013). Sin embargo, es necesario continuar realizando investigaciones al respecto para caracterizar mejor a aquellos pacientes que tienen más probabilidades de ser beneficiados y menos probabilidades de sufrir consecuencias adversas de este tipo de procedimientos (Jensen et al., 2014).

La cirugía bariátrica es un tratamiento eficaz para tratar la obesidad extrema y sus comorbilidades, aunque es un tratamiento invasivo para los pacientes, y que implica potenciales complicaciones severas. La cirugía bariátrica es, por definición, invasiva y tiene riesgos al corto

plazo inherentes a la cirugía, así como también efectos adversos que pueden evidenciarse sólo al largo plazo. Incurrir en estos riesgos sólo puede ser aceptable si los beneficios en la salud del paciente son mantenidos a través del tiempo (Jensen et al., 2014).

Se han evidenciado diversos tipos de complicaciones en pacientes que han sido tratados con cirugía bariátrica, entre los que se destacan las fistulas (que oscila entre el 2-7% de los pacientes tratados), hernias quirúrgicas externas e internas y oclusiones intestinales, tromboembolia pulmonar (que oscila entre el 1.4-2.6% de los pacientes, postcirugía bariátrica), estenosis gastroyeyunal, úlceras anastomóticas, complicaciones hepatobiliares y síndrome de Dumping, así como también problemas nutricionales (Brasceso & Corengia, 2009). De acuerdo a un estudio llevado a cabo por Encinosa y col. en 2522 pacientes tratados con cirugía bariátrica, se evidenció que aproximadamente un 21.9% de pacientes tuvo complicaciones durante la cirugía bariátrica, y 6 meses posteriores, esa tasa se elevó a un 39.6% de pacientes totales con complicaciones post-operatorias (Encinosa et al., 2006).

Consecuentemente, consideramos necesaria la investigación de terapias no invasivas para tratar estas enfermedades, como la terapia con yerba mate, que potencialmente permitiría a los pacientes llevar una sobrieda sin complicaciones mayores. Si este tratamiento conduce a la pérdida de peso, disminución de la ingesta de alimento y/o el aumento en la tolerancia a la glucosa, la yerba mate podría ofrecer una estrategia de terapia no invasiva y diferente a la que ofrece la terapia con cirugía bariátrica.

1.3 El sistema nervioso y su relación con la obesidad

Aunque la obesidad extrema en un pequeño grupo poblacional es claramente impulsada por mutaciones específicas, la presencia de la obesidad en la mayor parte de la población representa una interacción entre el genoma y el ambiente. La mayoría de estos genes que, al mutar, pueden predisponer a la obesidad se encuentran expresados en el sistema nervioso, lo cual sugiere que el control neurológico de la ingesta de alimento y el metabolismo son esenciales en la regulación del balance energético (Berthoud & Klein, 2017).

El cerebro utiliza información nutricional tanto del exterior como del interior del cuerpo antes, durante y después de la ingesta.

- Durante la fase de iniciación, la atención puede hacer foco en el hambre o la oportunidad de consumir un alimento altamente gratificante en ausencia de necesidad metabólica.
- Durante la fase de adquisición, los estímulos no condicionados y condicionados de los alimentos y las señales de alimentación interactúan a través de los sentidos externos con el cerebro cognitivo, emocional y ejecutivo.
- Durante la fase de consumo, las señales interoceptivas del gusto y el tracto gastrointestinal que llegan al cerebro "metabólico" guían los procesos relativamente estereotípicos de digestión, transporte y absorción. Los reflejos anticipatorios formados por la experiencia previa ayudan a mantener los parámetros regulados dentro de los límites óptimos.
- Finalmente, durante la fase "post-ingesta" o metabólica, las señales del intestino y los órganos que pueden almacenar y/o metabolizar la energía, como el tejido adiposo y el hígado, informan al cerebro sobre las consecuencias metabólicas de la comida, proporcionando recompensa por la satisfacción y generando representaciones conmemorativas episódicas de toda la comida para referencia futura (Berthoud et al., 2017).

Al integrar información externa e interna, el cerebro puede regular el peso corporal a largo plazo de manera flexible y adaptativa, para adaptarse a circunstancias especiales (*alostasis*) (Berthoud et al., 2017).

Particularmente, la regulación energética involucra neuronas hipotalámicas y su conexión con otras áreas cerebrales y órganos periféricos, tales como el tracto gastrointestinal y el tejido adiposo. Además, las áreas cerebrales que están involucradas en el control del comportamiento de recompensa, cognición, y emociones también toman un rol importante en la regulación del peso corporal (Berthoud & Klein, 2017).

Las neuronas hipotalámicas basomediales funcionan como integradoras de la información nutricional interna y externa para lograr la homeostasis energética. Las neuronas del hambre (aquellas que expresan el péptido relacionado con *Agouti* (AGRP) y el neuropéptido Y (NPY)) traducen las señales del hambre tanto del medio interno como de la retroalimentación hedónica promoviendo la ingesta e inhibiendo el gasto energético mediante la programación de una red neuronal "río abajo" que aumenta la sensación de recompensa de determinados

alimentos. Mientras que las neuronas AGRP / NPY podrían considerarse estimuladoras, las neuronas que expresan proopiomelanocortina (POMC) o el transcripto de cocaína y anfetamina (CART) actúan como inhibidoras reduciendo como consecuencia la ingesta de alimentos e induciendo un aumento en el gasto energético, actuando a través de vías paralelas (Berthoud et al., 2017).

1.4 El sistema neuroendócrino y la pro-opiomelanocortina (*Pomc*)

El cerebro es el regulador principal del equilibrio energético y recibe señales periféricas del estado de energía en forma de nutrientes y hormonas circulantes, como por ejemplo la leptina, combinadas con señales neuronales aferentes transmitidas a través del nervio vago (Woods, 2009). En particular, el hipotálamo es una estructura cerebral conservada evolutivamente que regula los principales mecanismos homeostáticos que aseguran la supervivencia del organismo, como el equilibrio hidrosalino, la presión arterial, la respuesta al estrés, la temperatura corporal y el balance energético, entre otros. Dentro de las poblaciones neuronales hipotalámicas, el sistema de las melanocortinas expresadas en el núcleo arcuato juega un papel importante en el control de las funciones homeostáticas (Toda et al., 2017).

Dos poblaciones de neuronas dentro del núcleo arcuato (Arc) del hipotálamo sensan y responden a la mayoría de las señales que responden a cambios en el estado de energía (Coll et al., 2007): las neuronas orexigénicas que expresan el péptido relacionado con *agouti* (AgRP) y el neuropéptido *Y* (NPY) son inhibidas por la leptina e inducen una mayor ingesta de alimentos y un menor gasto de energía. Por el contrario, las neuronas que expresan pro-opiomelanocortina (*Pomc*) y el transcripto de cocaína y anfetamina (CART) son estimuladas por la leptina, y consecuentemente reducen la ingesta de alimentos e inducen un aumento en el gasto energético (Toda et al., 2017).

El gen que codifica para la prohormona proopiomelanocortina (*Pomc*) se expresa principalmente en dos regiones en vertebrados: por un lado, corticotrofos y melanotrofos en la hipófisis, y por otro, una pequeña población de neuronas en el núcleo arcuato del hipotálamo. La expresión de *Pomc* en el hipotálamo está regulada por dos estimuladores de la transcripción denominados nPE1 y nPE2 ubicados aproximadamente a 10-12 kb corriente arriba de las unidades transcripcionales de *Pomc* en mamíferos (De Souza et al., 2005), mientras que en la hipófisis, la expresión de *Pomc* está regulada por la presencia de un promotor proximal, esencial

para la expresión en melanotrofos y corticotrofos hipofisiarios (de Souza et al., 2005). Existen diversos factores de transcripción involucrados en la expresión de *Pomc* en la glándula pituitaria, entre ellos el complejo Pitx1, el factor T-box (Tpit/Tbx19) y las proteínas básicas de la subfamilia NeuroD1 (Lamolet et al., 2001; Lamonerie et al., 1996; Poulin et al., 1997).

El gen de *Pomc* tiene tres exones y dos intrones, con el sitio del inicio de la traducción en el exón 2 y se sintetiza como un pre-pro-péptido que, una vez que pierde el péptido señal, es procesado en diferentes péptidos en forma específica de tejido. Para ello, *Pomc* contiene sitios de corte reconocidos por las convertasas de prohormonas que cortan en sitios dibásicos que comprenden los aminoácidos lisina (K) y arginina (R), dando lugar a los distintos productos (Figura 2) (Harno et al., 2018).

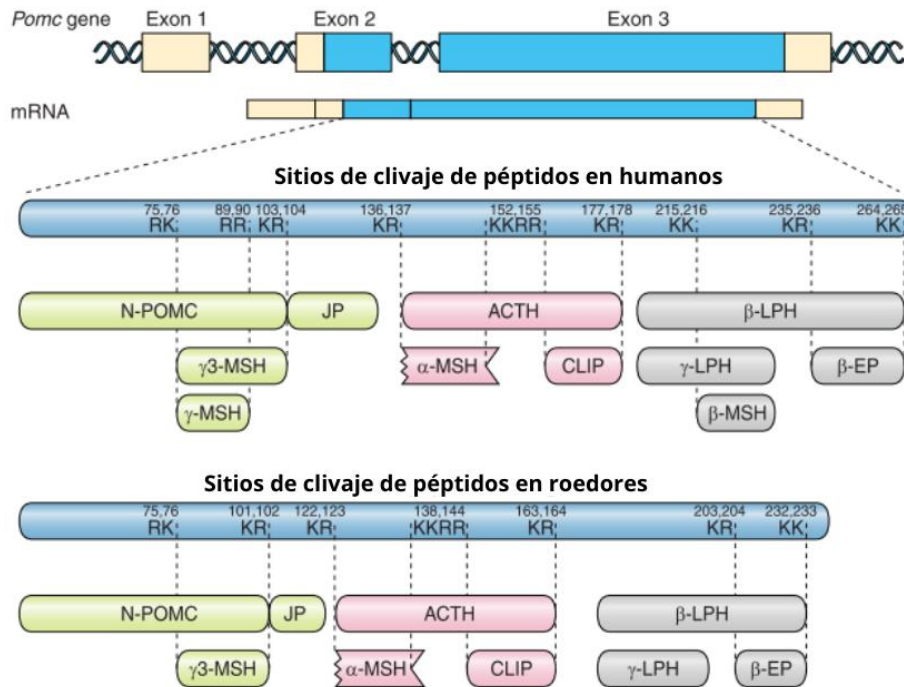


Figura 2: Esquema del gen de *Pomc* y su procesamiento en seres humanos y roedores. Las siglas de los productos de *Pomc* pertenecen a los siguientes compuestos: ACTH: hormona adrenocorticotrófica; CLIP: péptido intermedio similar a corticotropina; β -LPH: hormona β lipotrófica; γ -LPH: hormona γ lipotrófica; β -EP: β -endorfina; N-*Pomc*: extremo N-terminal de la proopiomelanocortina; $\alpha/\beta/\gamma$ -MSH: hormona estimulante de melanocitos $\alpha/\beta/\gamma$ (Harno et. al., 2018)

Entre los productos de *Pomc* hipotalámica se encuentran las hormonas estimulantes de los melanocitos, α -MSH y β -MSH (aunque este último no se encuentra presente en roedores pero sí en humanos), el péptido ACTH responsable del mantenimiento del balance de la

concentración de glucocorticoides en situaciones de estrés (Harno et al., 2018) y el péptido opioide β -endorfina, estimulante de la analgesia inducida por estrés, que se liberan en respuesta a señales metabólicas periféricas (Toda et al., 2017). Las neuronas que expresan POMC activan a las neuronas que expresan MC4R en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVH), generando por consecuencia, la inhibición de la ingesta de alimentos y el aumento del gasto de energía, mientras que las neuronas NPY/AgRP antagonizan estos efectos (Toda et al., 2017).

El procesamiento correcto de los péptidos de *Pomc* es esencial para mantener el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, y las anormalidades en el procesamiento de *Pomc* tienen un impacto crítico en la regulación del apetito y en la homeostasis energética (Harno et al., 2018). Existen diversos trabajos que destacan la importancia del procesamiento de *Pomc* en la regulación y mantenimiento del equilibrio energético, y el impacto de la carencia de expresión de este gen, o de alguno de sus productos derivados.

En un trabajo realizado por Krude y col. en humanos se demostró por primera vez que los defectos genéticos dentro del gen de *Pomc* tienen un impacto fundamental en la aparición de la obesidad en humanos, definiendo un trastorno endócrino monogénico que resulta en obesidad de inicio temprano, insuficiencia suprarrenal y pigmentación pelirroja (Krude et al., 1999). Debido a las mutaciones en ambos alelos de POMC, los pacientes estudiados no poseían expresión de *Pomc*, y consecuentemente, carecían de expresión de los productos de *Pomc*, entre los que se destacan α -MSH y β -MSH. Particularmente, la ausencia de α -MSH y β -MSH que tienen efecto directo sobre MC3R y MC4R a nivel cerebral indujeron la obesidad en los pacientes (Krude et al., 1999), confirmando de esta manera la relevancia e importancia del rol de señalización generado por las melanocortinas en la homeostasis energética.

Similarmente, Yaswen y col. han demostrado en un estudio realizado en ratones que aquellos roedores que carecen de expresión de los péptidos derivados de *Pomc* poseen el mismo fenotipo de obesidad, desarrollo defectuoso de las glándulas adrenales y pigmentación alterada, asemejándose a los resultados postulados por Krude y col. en humanos. Al tratar a estos animales con un agonista estable de la α -MSH, los ratones mutantes perdieron más del 40% de su sobrepeso después de 2 semanas, demostrando nuevamente la relevancia de la función, interacción y señalización de los péptidos derivados de POMC como posibles blancos terapéuticos para el tratamiento de la obesidad (Yaswen et al., 1999).

Por último, Bumashny y col. han demostrado que la inactivación genética de la expresión hipotalámica de *Pomc* en ratones (con conservación de la expresión hipofisaria), que

resulta en hiperfagia severa y obesidad temprana, puede restituirse mediante una estrategia de recombinación genética (Bumaschny et al., 2012). Asimismo, el rescate genético de *Pomc* resulta en una disminución en el peso corporal y en la ingesta de alimentos, atenuando incluso comorbilidades asociadas a la obesidad como la hiperglucemia, la hiperinsulinemia y la esteatosis hepática (Bumaschny et al., 2012). Por otro lado, el grupo que dirige la Dra. Bumaschny observó que la reactivación de *Pomc* hipotalámica revierte completamente el fenotipo diabetogénico en ratones hembra (Alsina et al., 2018). Estos resultados sugieren que las neuronas que expresan *Pomc* en el núcleo arcuato son un potencial objetivo terapéutico para el tratamiento de la diabetes, en especial de la diabetes mellitus de tipo II. Es por ello que los estudios de caracterización, funcionamiento, interacción y regulación de *Pomc* son esenciales en lo que concierne al estudio de la obesidad y diabetes de tipo 2, y podrían contribuir al desarrollo de terapias novedosas para ambas patologías.

1.4.1 Modelos murinos empleados en el proyecto de investigación

Existen diversos modelos biológicos que permiten estudiar el rol de *Pomc* en la actualidad. Particularmente, en este estudio se empleó un modelo de ratón recombinante que llevan un alelo de *Pomc* mutante que contiene un *cassette del gen* de resistencia para la neomicina flanqueado por sitios loxP, corriente arriba del gen de *Pomc* (*arcPomc*^{-/-}, Figura 3). Esta modificación impide la actividad de los estimuladores de la transcripción neuronal de *Pomc* y por lo tanto, la expresión de *Pomc* en el núcleo arcuato del hipotálamo, pero no en las células hipofisarias, debido a que el promotor proximal está intacto (Bumaschny et. al, 2012). Esta falta de expresión hipotalámica de *Pomc* en los ratones *arcPomc*^{-/-} conduce a hiperfagia y la consiguiente obesidad extrema de inicio temprano, detectable fácilmente a las cinco semanas de edad, lo cual al mismo tiempo, predispone a la diabetes de tipo 2 en ratones adultos (Bumaschny et al., 2012). Por esta razón, la línea *arcPomc*^{-/-} constituye un buen modelo biológico para estudiar la obesidad y la diabetes de tipo 2.

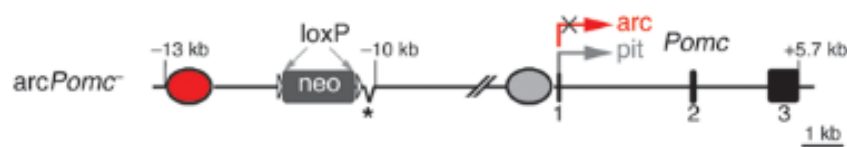


Figura 3. Esquema del constructo del alelo *arcPomc*^{-/-}. Contiene una inserción de un *cassette* de resistencia a neomicina (neo), flanqueado por sitios loxP que interrumpe la expresión de *Pomc* en el arcuato pero conserva la expresión en la hipófisis (Bumaschny et. al., 2012).

Por otro lado, para este estudio también se emplearon ratones transgénicos, generados en el laboratorio del Dr. Marcelo Rubinstein que poseen un constructo en el cual está insertada la región codificante del gen EGFP (proteína verde fluorescente) en el exón 2 de *Pomc* de ratón, inmediatamente antes del codón de inicio de la traducción de la prohormona *Pomc* (Figura 4, (Cowley et al., 2001)). Este transgén de 22 kb que contiene la unidad transcripcional completa de *Pomc* de ratón, conduce a la expresión de EGFP a casi el 100% de las neuronas que expresan *Pomc* en el núcleo arcuato y ha permitido realizar estudios electrofisiológicos de neuronas de *Pomc* en rebanadas de cerebro de ratón (de Souza et al., 2005).



Figura 4: Esquema del transgén POMC-EGFP. La región codificante del gen de EGFP (E) se encuentra insertada en el exón 2, previo al codón de inicio de la traducción. Los exones de POMC están indicados por cajas negras (de Souza et. al., 2005).

1.5 La yerba mate

La yerba mate (*Ilex paraguariensis*) es un árbol de la familia de las *aquifoliáceas* que se produce y cultiva en las regiones del sur de Latinoamérica, particularmente en Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay (Heck & De Mejia, 2007). Sus hojas y tallos son usados para preparar una bebida similar al té denominada *mate*, extensamente consumida por la población local (Rocha et al., 2018) (Figura 5).

El mate es una infusión compuesta por hojas secas de *Ilex paraguariensis* (Conceição et al., 2017). En Latinoamérica, el mate es a menudo bebido de una calabaza ahuecada y seca, utilizando un sorbete metálico denominado *bombilla*. Las hojas secas de yerba mate (aproximadamente 50 gramos) son envasadas dentro del recipiente y se vierte agua caliente sobre las mismas reiteradas veces. En Estados Unidos, en cambio, la yerba mate es comercialmente envasada en bolsitas individuales (1 o 2 gramos) o como un concentrado para su uso como ingrediente en la industria de suplementos dietéticos (Heck & De Mejia, 2007).

Argentina es el mayor productor y exportador de Yerba Mate en el mundo, alcanzando los 837 millones de kg de yerba mate cosechados en 2019, de los cuales 40 millones de kg fueron exportados al mercado exterior (INYM, 2019b). Asimismo, en Argentina se consumen en promedio 6.4kg de yerba mate *per cápita* anuales, y se estima que está presente en el 90%

de los hogares argentinos (INYM, 2019a). Debido a los crecientes reportes sobre sus potenciales beneficios a la salud, el consumo de yerba mate está popularizándose en Europa y en Norteamérica (Conceição et al., 2017). La yerba mate no sólo ha demostrado ser hipocolesterolémica, hepatoprotectiva, estimulante del sistema nervioso central, diurética y beneficiosa para el sistema cardiovascular, sino que también, hay estudios que demuestran que la yerba mate protege al ADN de la oxidación y a la lipoproteína de baja densidad (LDL) de la lipoperoxidación in vitro, así como también se remarca su alta capacidad de antioxidante (Heck & De Mejia, 2007).

Además, un estudio realizado por Conceição y colaboradores en ratas *Wistar* sugiere que el mate puede ser útil en la prevención y tratamiento de algunas patologías endocrino-metabólicas tal como la esteatosis hepática, debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Conceição et al., 2017). Asimismo, también se ha demostrado en el mismo estudio que la Yerba Mate ha mejorado significativamente la señalización hipotalámica de insulina con sobrealimentación postnatal temprana, sugiriendo una mejora en la acción periférica de la insulina (Conceição et al., 2017). Similarmente, también se ha demostrado que la suplementación con extractos de *Ilex paraguariensis* en ratas *Wistar* alimentadas con una dieta rica en grasas, ha disminuido significativamente el peso corporal, la grasa visceral, lípidos hepáticos y en circulación, la glucosa, insulina y los niveles de leptina (Pang et al., 2008). Asimismo, es importante remarcar los efectos protectores y mejoradores de ciertas características de la diabetes mellitus de tipo II como la resistencia a insulina y la dislipidemia, resultados que nuevamente, sugieren el uso de la yerba mate como un candidato natural prometedor de la prevención de síndromes metabólicos y de la promoción de la salud (Hussein et al., 2011).



Figura 5. A. Hojas de *Ilex paraguariensis* (INYM, 2019) – B. Mate.

Por todo lo expuesto anteriormente, se postula que la yerba mate podría convertirse en una estrategia terapéutica para la obesidad y la diabetes de tipo II.

1.5.1 Componentes de la yerba mate

Diversos estudios han demostrado que la yerba mate tiene potenciales propiedades de mejoras en el desequilibrio oxidativo y en el metabolismo de lípidos. Estas propiedades están principalmente relacionadas con sus componentes bioactivos, representados por metilxantinas, saponinas y polifenoles (Bastos et al., 2007):

En primer lugar se pueden encontrar alcaloides, como las xantinas y metilxantinas, representadas en la yerba mate por la cafeína y teobromina. De acuerdo con un estudio realizado por Yamada y col. en gatos, la acción estimulante de la cafeína está relacionada con la activación del sistema nervioso simpático (Rocha et al., 2018; Yamada et al., 1989). Además, Pang y col. han observado el efecto del consumo crónico de la Yerba Mate en la disminución de la ingesta calórica y de marcadores de inflamación, así como también en un aumento de las moléculas de señalización de saciedad (leptina) en ratas *Sprague-Dawley* expuestas a una dieta rica en grasas durante 60 días (Pang et al., 2008; Rocha et al., 2018).

Otro componente principal son los polifenoles, representados en la yerba mate en compuestos como ácidos fenólicos y flavonoides, en particular el ácido clorogénico y la rutina (Borré et al., 2010). Los polifenoles pueden desempeñar funciones protectoras (A. C. Colpo et al., 2018).

Las saponinas también son un componente de *Ilex paraguariensis*. En un estudio realizado por De Resende y col. en ratas Wistar alimentadas con una dieta rica en grasas y tratadas con saponinas provenientes de hojas de Yerba Mate, se demostró que este componente tiene efectos en el metabolismo de los lípidos (de Resende et al., 2015). Las saponinas inducen la reducción de la grasa corporal, la disminución del nivel de triglicéridos en plasma sanguíneo, reducen el apetito e inhiben a la lipasa pancreática (Resende et al., 2012).

Otros componentes encontrados en la yerba mate son aminoácidos, minerales (fósforo, hierro y calcio), y vitaminas (C, B1 y B2) (Pomilio et al., 2002; Zaporozhets et al., 2004).

Los extractos de *Ilex paraguariensis* son una importante fuente de polifenoles, metilxantinas y saponinas, y diversos estudios han demostrado su efecto protector frente a especies reactivas de oxígeno (ROS) y su efecto estimulador de las defensas antioxidantes celulares (Ana C. Colpo et al., 2016; Resende et al., 2012).

En la Figura 6 se pueden evidenciar los compuestos descritos en este apartado, en un análisis de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) realizado por Heck & De Mejía donde se estudió la presencia de dichos compuestos en una muestra aleatoria de mate.

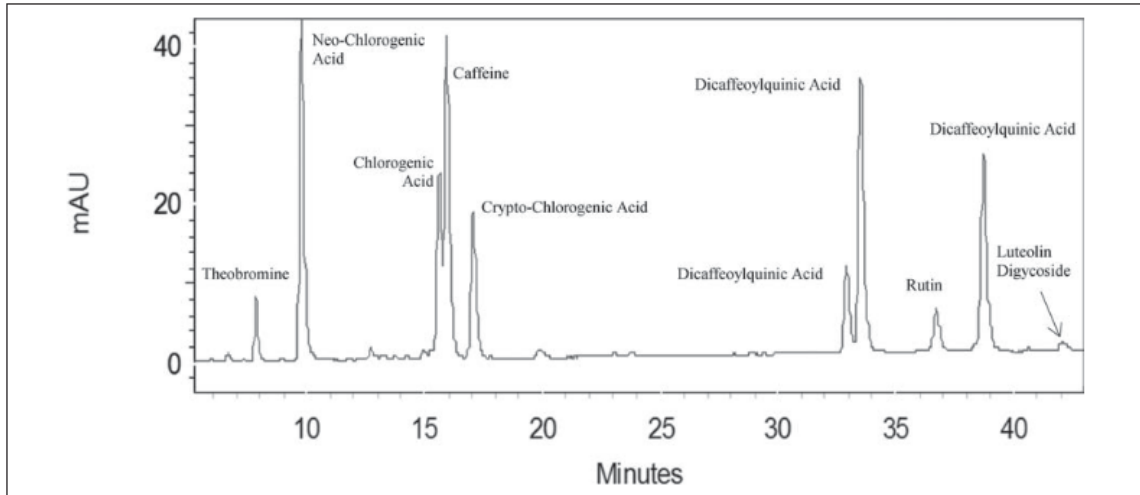


Figura 6: Perfil de HPLC de una muestra de mate identificando polifenoles, alcaloides, y otros compuestos. (Heck & De Mejía, 2007).

2. HIPÓTESIS

En el laboratorio de Neuroendocrinología Molecular estudiamos el rol que cumplen las neuronas de POMC en el control del balance energético y la glucemia utilizando un modelo de ratones mutantes para la expresión hipotalámica de POMC. Entre los hallazgos recientes del laboratorio se destaca que el déficit hipotalámico de POMC en ratones desencadena intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina por mecanismos independientes al control de la ingesta y el peso corporal (Alsina et. al., 2018). Teniendo en cuenta que la yerba mate disminuye el tejido adiposo y la glucemia modificando las vías de señalización de la leptina y la insulina en el hipotálamo y que estas hormonas actúan, en parte, a través de las neuronas hipotalámicas de POMC, la **hipótesis** de esta línea de trabajo es que **la yerba mate mejoraría la obesidad y la diabetes a través de las neuronas de POMC.**

3. OBJETIVOS

El **OBJETIVO GENERAL DE LA LÍNEA DE TRABAJO** es estudiar cómo impacta el consumo de la yerba mate sobre los circuitos hipotalámicos que regulan el balance energético y la glucemia en modelos de ratones obesos y diabéticos. Los experimentos realizados en el contexto del presente Proyecto Final de Investigación fueron diseñados para comenzar con el proyecto, poniendo a punto algunas técnicas. Debido al contexto de la Pandemia por SARS-Cov2, que motivó la prohibición de acceso al IFIBIO hasta el día de la escritura de este documento, muchos de los experimentos planificados originalmente han quedado truncaos, por lo que hemos alcanzado a poner a punto y obtener resultados acerca de ratones salvajes y no sobre los modelos de obesidad y diabetes de tipo 2. Por esta razón hemos decidido ajustar y reformular los objetivos generales y específicos de modo que se adapten más a los resultados alcanzados.

OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO FINAL: El presente trabajo final tiene como objetivo general la determinación de los efectos de la yerba mate en la tolerancia a la glucosa, ingesta de alimento y peso corporal en ratones. Del mismo modo se pretende sentar las bases para el estudio del impacto del consumo de la yerba mate sobre los circuitos hipotalámicos que regulan el balance energético y la glucemia en modelos de ratones obesos y diabéticos.

Partiendo del mencionado objetivo general, se plantean los siguientes **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- **Objetivo 1:** Poner a punto distintas preparaciones de mate para administrar a los ratones como infusión.
- **Objetivo 2:** Determinar los efectos de una exposición aguda a la yerba mate en la ingesta de alimento en ratones salvajes.
- **Objetivo 3:** Determinar los efectos de una exposición crónica a la yerba mate en la tolerancia a la glucosa en ratones salvajes.
- **Objetivo 4:** Determinar los efectos de una exposición crónica a la yerba mate en el peso corporal y en la ingesta de alimento en ratones salvajes.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cuidado animal

Los animales fueron alojados en jaulas comunes a temperatura controlada y ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con luces encendidas de 7 a.m. a 7 p.m., con agua corriente y alimento de laboratorio compuesto por 28.0% kcal de proteínas, 12.1% kcal de grasas y 59.8% kcal de carbohidratos, disponibles ad libitum.

4.2 Generación de animales y armado de apareos

En este estudio se analizaron los efectos de la yerba mate mediante la utilización de tres modelos murinos: ratones “salvajes” (de fenotipo normal), ratones *knock-out* para *Pomc* (*arcPomc*^{-/-}, ratones de fenotipo obeso) y, ratones POMC-EGFP (de fenotipo normal, que expresan la proteína verde fluorescente en las células de POMC). A fines de poner a prueba nuestro objetivo general, fue necesario armar apareos que permitan obtener los genotipos mencionados:

- Para generar ratones mutantes para la expresión de POMC en el hipotálamo (*arcPomc*^{-/-}), dado que estos animales son infértiles, se debió cruzar animales heterocigotas, es decir, ratones *arcPomc*^{+/-} (un macho y dos hembras). Estos apareos dan como resultado crías de los siguientes genotipos: *arcPomc*^{-/-}, *arcPomc*^{+/+} o *wild type* (“wt” o “salvajes”) y *arcPomc*^{+/-} (Figura 7).
- Por otro lado, en el caso del armado de apareos POMC-EGFP, se cruzaron animales de genotipo POMC-EGFP, y se dispusieron 2 hembras y un macho de este genotipo por jaula, de diferente progenie. Estos animales fueron utilizados para un protocolo de exposición aguda a mate y posteriormente, en el protocolo de exposición crónica a mate, a fines de analizar a futuro el nivel de activación neuronal de las neuronas que expresan POMC generado por un tratamiento con yerba mate. Debido a que este análisis no se ha llegado a realizar para este trabajo y a que estos ratones expresan *Pomc* de forma normal, para dar mayor claridad a este manuscrito, en la sección de resultados se los ha llamado ratones “salvajes”.



Figura 7. Izquierda. Ratón *arcPomc^{-/-}* (de fenotipo obeso). **Derecha.** Ratón con genotipo *salvaje* (de fenotipo normal).

4.3 Marcación de animales

Con el fin de identificar a los animales, a los 21 días postnatales se destetó a las crías y se les realizó una perforación en sus orejas, mediante un sistema de marcación establecido por el Grupo de Neurociencia de Sistemas en el Instituto de Fisiología y Biofísica “Bernardo Houssay” (Anexo 1). Mediante esta marcación, el animal queda numerado e identificado, y los trozos de tejido extraídos son almacenados en tubos Eppendorf para luego identificar el genotipo de cada animal mediante una purificación de ADN genómico y posterior PCR a tiempo final.

4.4 Purificación de ADN genómico

Los trozos de tejido almacenados en la marcación de cada animal fueron sometidos a una purificación de ADN genómico, con el fin de extraer el ADN para utilizarlo en la identificación del genotipo por PCR.

Materiales:

- Micropipetas P200
- Tips P200
- Bloque térmico
- Vórtex
- Centrífuga
- Solución de lisis (NaOH 25mM).
- Buffer de neutralización (Tris-HCl 40mM).

El protocolo de purificación empleado fue el siguiente:

1. Se añadieron 75µL de solución de lisis a cada tubo Eppendorf con muestra animal.
2. Se colocaron los tubos a 98°C durante 2 horas en bloque térmico, o hasta que se vio que el tejido estaba disuelto.
3. Se agregaron 75µL de buffer de neutralización.
4. Se homogenizó con vórtex.
5. Se centrifugó a 10000 rpm durante 15 segundos.
6. Se almacenó el sobrenadante a -20°C.

4.5 Genotipificación de los animales mediante reacción en cadena de la polimerasa, a tiempo final (PCR)

Se realizó una genotipificación por PCR para identificar los genotipos de los animales. Particularmente, en este estudio fueron necesarias 3 PCRs diferentes dados los 3 genotipos diferentes buscados (*wt* para POMC, *arcPomc*^{-/-} y POMC-EGFP). El protocolo para PCR fue el mismo en todos los casos; sólo variaron los *primers* utilizados en función de cada genotipo.

Para la identificación del genotipo *salvaje* para POMC, se utilizó el siguiente set de *primers*, que amplifican un fragmento de 340 pb, dentro del cual se encuentra el elemento de estimulación de la transcripción de POMC, nPE2:

- Δ2.5 (*primer sense*): 5'-TGATTTTACTTGGGCCTC-3'
- Δ2.3 (*primer antisense*): 5'-TTCAGGCTGTTCCCATCC-3'

En el caso de la identificación del genotipo *arcPomc*^{-/-}, los *primers* utilizados fueron los siguientes, los cuales amplifican un fragmento de 400 pb correspondiente a un segmento de la secuencia de la resistencia a Neomicina, presente en el alelo *arcPomc*^{-/-}:

- Δ2.5 (*primer sense*): 5'-TGATTTTACTTGGGCCTC-3'
- ΔNeoAs (*primer antisense*): 5'-CGGTAGAATTCGCCAATGAC-3'

Por último, para la identificación del genotipo POMC-EGFP, se utilizaron los siguientes *primers*, que identifican una inserción heteróloga de 30 pb presente en el exón 3 de los transgenes, y que consecuentemente, generan un amplicón de 210 pb en animales POMC-EGFP (Young et al., 1998). Aquellos animales que no poseen este genotipo generan un amplicón de 180 pb.

- M329 (*primer sense*): 5'-GAAGTACGTCATGGGTCCT-3'

- M330 (*primer antisense*): 5'-AGCTCCCTCTTGA ACTCTAG-3'

Los reactivos para cada tubo de PCR fueron los siguientes:

- 1 μ L de ADN genómico purificado mediante el método descrito en el apartado 3.4
- 0.6 μ L de *primer sense* (Concentración del reactivo: 25 μ M).
- 0.6 μ L de *primer antisense* (Concentración del reactivo: 25 μ M).
- 3.5 μ L de *Master Mix PCR - Pegasus*[®] de Productos Bio-Lógicos (Anexo 2), el cual posee dNTPs, MgCl₂ 1.5mM, polimerasa *Taq* y buffer.
- 6.5 μ L de agua MiliQ o *Sigma*[®] *DNase & RNase free*.

Controles de la PCR:

- Como control positivo se utilizó una mezcla de muestras positivas de nuestro laboratorio.
- Como control negativo, se usó agua MiliQ o *Sigma*[®] *DNase & RNase free*, en la misma proporción.

Posteriormente, se posicionaron las muestras en la termocicladora (en este caso, *PTC-200*TM *MJ Research*[®] de Bio-Rad Laboratories) y se configuró el siguiente programa de ciclado de PCR:

1. Desnaturalización inicial a 95°C durante 4 minutos.
2. 35 ciclos compuestos por:
 - Desnaturalización a 95°C por 30 segundos.
 - *Annealing* a 55°C por 30 segundos.
 - Elongación a 72°C por 30 segundos.
3. Elongación final a 72°C durante 5 minutos.

Una vez terminado el programa de ciclado, las muestras se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa o se almacenaron a -20°C para ser corridas posteriormente.

4.6 Electroforesis en gel de agarosa

Posterior a la PCR, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa 2% en buffer TAE, con bromuro de etidio y se visualizaron las bandas correspondientes a cada genotipo en un transiluminador UV. Se sembraron 10 μ L de cada producto de PCR, además de 3.5 μ L de

marcador de peso molecular *100 bp Plus*[®] de *Transgen Biotech* (Anexo 3) para comparar con el tamaño de banda.

4.7 Preparación de mate: extracto húmedo o cebada simulada

Con el propósito de poner a punto distintas preparaciones de mate, se siguió el protocolo puesto a punto por la Dra. Irene Taravini (Laboratorio de Neurobiología Experimental, Universidad de Entre Ríos, Argentina), para tratar modelos murinos de Parkinson. Este modo de preparación consiste en obtener una infusión de yerba mate en base acuosa que remeda la forma en que tradicionalmente se consume esta infusión en Latinoamérica.

Materiales:

- 50 g de Yerba Mate “*Mañanita*”.
- Vaso de precipitados.
- Balanza.
- Kitasato
- Tapón de Kitasato con tubo de extracción.
- Trompa de vacío.
- Mangueras de caucho.
- Bombilla de acero inoxidable.
- Probeta de vidrio.
- Erlenmeyer de vidrio.

Protocolo de extracción húmeda de yerba mate (Figura 8):

1. Se pesaron 50 g de yerba mate *Mañanita*[®] en un vaso de precipitado.
2. Se tomó un Kitasato de 1 litro y se lo tapó con un tapón de goma el cual contiene una varilla con pasaje para extracción.
3. Se tomó una bombilla metálica y se la posicionó dentro del vaso de precipitado con la yerba mate.
4. Se conectó mediante mangueras de caucho, a la bombilla dentro del vaso de precipitados con la varilla con pasaje para extracción dispuesta en el tapón de

goma, y por otro lado, al tubo extractor del Kitasato con la trompa de vacío acoplada a la canilla, como se muestra en la Figura 8.

5. Se tomó en un Erlenmeyer agua filtrada calentada previamente a 70°C-75°C.
6. Se midieron 100 ml de agua filtrada en una probeta, y se la vertió dentro del vaso de precipitado que contiene la yerba mate.
7. Se esperaron a que pasen 15 segundos para que el agua filtrada tome contacto con la yerba mate.
8. Se activó la trompa de vacío abriendo la canilla.
9. Se repitió el proceso 4 veces, hasta haber vertido 500 ml de agua filtrada a 70°C-75°C.
10. Se almacenó la infusión en un Erlenmeyer de vidrio y se aguardó a que tome temperatura ambiente (25°C) previo a la administración a los animales.



Figura 8. Protocolo de extracción húmeda o “cebada simulada”. Debido al vacío generado por la trompa, el agua caliente dentro del vaso de precipitado con yerba mate es extraída y retenida en el Kitasato, simulando una cebada.

4.8 Preparación de mate: extracto liofilizado (extracto seco)

Con el objetivo de concentrar y estandarizar distintas dosis de mate, se preparó mate en polvo mediante un protocolo de liofilización de una infusión de yerba mate. La liofilización

y la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para medir su composición, se realizaron a través de una colaboración con el laboratorio que dirige la Dra. Mariel Marder (IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA, Argentina). A continuación se detalla el procedimiento:

1. Se colocaron 25 g de yerba mate en 500 ml de agua destilada.
2. Se calentó a 95°C-100°C durante 30 minutos con calor directo (siguiendo el protocolo utilizado por Hussein et al., 2011).
3. Se filtró al vacío.
4. Se llevó a sequedad con el rotavapor
5. Se resuspendió con etanol 50 % (Etanol:H₂O 5:10). De aquí se tomaron 100 µl para realizar un análisis de HPLC.
6. Se pusieron 500 µl de la solución en cada microtubo (fueron 30 tubos en total) y se llevaron a sequedad con un evaporador centrífugo de vacío.
7. Se secó nuevamente y se guardaron las alícuotas a -20°C. Cada alícuota pesó aproximadamente 169 mg.

Posteriormente, para la preparación de la infusión, los 169 mg de yerba mate liofilizada se resuspendieron en 500 µl de agua destilada y se calentaron a 60°C durante 2hs en estufa, homogenizando con vórtex cada 30 min. Finalmente, se agregaron 500 µl de agua destilada y se homogenizó nuevamente con vórtex.

En un estudio realizado por Hussein y col. se han observado diferencias en la ingesta dado por un tratamiento con mate preparado por un extracto liofilizado en roedores de genotipo TSOD (Hussein et al., 2011), en el cual se ha utilizado una dosis de 100 µg de extracto/g de ratón. Debido a ello, hemos decidido utilizar la misma dosis para administrar en nuestro estudio. Para ello, se tomaron 300 µl de la suspensión obtenida y se resuspendieron en 4 ml finales con agua filtrada. En uno de los experimentos de la puesta a punto se administraron 20 µl del preparado/g de ratón. Luego, fue necesario ajustar la dosis, por lo que se administraron 40 µl del preparado/g de ratón (es decir, 200 µg de extracto/g de ratón).

Como se destacó en el paso 5, se almacenaron 100 µl de muestra para un posterior análisis por HPLC. Para ello, se diluyeron con agua los 100 µl de muestra a un volumen final de 1.5 ml, y de esta suspensión, se tomaron 10 µl que se analizaron en el cromatógrafo. Como controles del análisis, se utilizó a la rutina y al ácido clorogénico. El análisis cromatográfico fue realizado a una atenuación de 1024 y un “proficiency testing” (PT) de 1200. Las

cromatografías por HPLC se realizaron utilizando un aparato LKB Pharmacia para HPLC analítica utilizando una columna Vydac de fase inversa C-18. Cada extracto se inyectó adecuadamente en la columna y se eluyó utilizando un gradiente de ACN acuoso (5-20% ACN, 0-20 min; 20-80% ACN, 20-30 min), a un caudal de 1 ml / min. La detección se realizó a $\lambda = 280$ nm.

4.9 Modo de administración de mate

4.9.1 Exposición aguda al mate

Nos propusimos diseñar un test comportamental que nos revelara si hay cambios en la ingesta de alimento después de la ingesta aguda de mate. Como no había datos bibliográficos previos, exploramos diferentes alternativas.

Materiales:

- Agua filtrada a 25°C
- Mate (preparado mediante protocolo de cebada simulada o mediante el protocolo de extracto liofilizado).
- Jeringa de tuberculina.
- Balanza.

El diseño experimental fue el siguiente:

Se utilizaron ratones de genotipo POMC-EGFP, que tienen expresión salvaje de *Pomc*, por lo que tienen un peso corporal normal y estable. El propósito del uso de este genotipo fue poder identificar las neuronas de POMC mediante la expresión de EGFP, para analizar su actividad luego de la exposición al mate mediante inmunohistoquímica contra c-FOS. Pero como no hemos observado ninguna evidencia de diferencias en la ingesta de alimento, hemos decidido no analizar la actividad de las neuronas de *Pomc* mediante este protocolo de exposición aguda. Debido a que tienen expresión normal de *Pomc*, a fines prácticos, en la sección de Resultados se los ha llamado animales “salvajes”.

La semana anterior al experimento los ratones POMC-EGFP fueron aislados de a 2 por jaula (separados por una pared de acrílico, Figura 9) y se los dividió en dos grupos en forma aleatoria: uno que recibió siempre agua y otro que fue habituado a la toma de mate. En este último grupo se reemplazó la botella de agua por una botella con mate (tapada con papel

aluminio para evitar la fotooxidación), durante 3 días, para que se habitúen al sabor. Luego se los dejó con agua hasta el día del experimento. Mediante todo el proceso se pesó a los ratones y al alimento una vez al día.

- Día 1: Los ratones fueron privados completamente de agua durante 24 horas pero recibieron alimento ad libitum.
- Día 2: Se administró a todos los ratones 1 ml de agua con jeringa de tuberculina, por vía oral, para que se habitúen a tomar mediante esta nueva forma de administración. El primer día los ratones no llegaron a tomar 1 ml.
- Día 3: Se repitió el DÍA 2. (En un primer experimento, además se quitó el alimento de las jaulas a las 18 P.M. para que tengan hambre al día siguiente).
- Día 4: A las 7 A.M. se les sacó el alimento, y se los dejó en ayunas durante 6 horas. Posterior a las 6 horas se les administró 1 ml de agua o mate según correspondía y se dejó pasar una hora (para que los ratones absorban el agua o mate). Luego se les devolvió el alimento (previamente pesado) y se pesó nuevamente a la hora y las 2 hs.

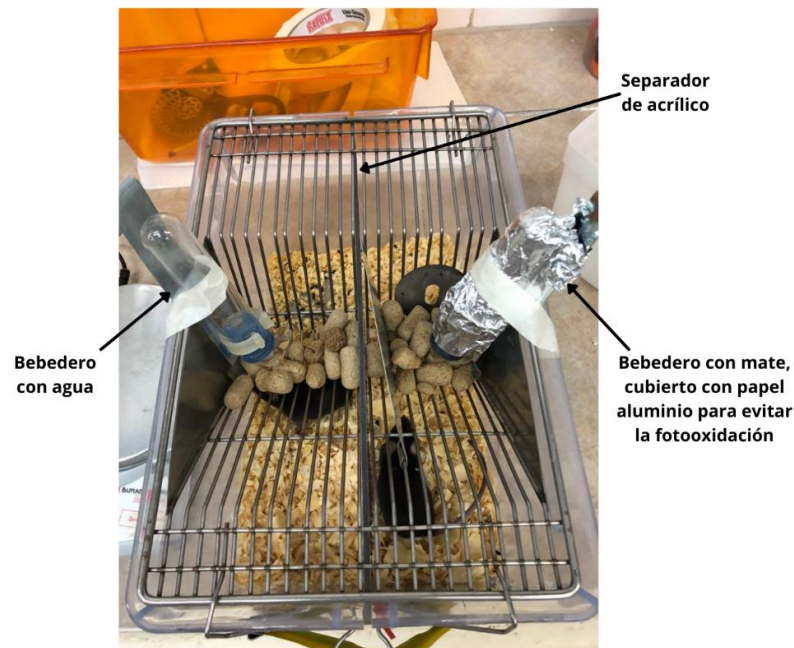


Figura 9. Almacenamiento de animales en el bioterio. Etapa de habituación de los animales al aislamiento. Aislamiento de 2 animales en una misma jaula mediante un separador de acrílico. Se pueden ver indicados mediante flechas los bebederos con mate (tapado con papel aluminio) y con agua, así como también el separador de acrílico que permite el aislamiento de dos animales por jaula.

4.9.2 Exposición crónica al mate

Con el propósito de evaluar si existen cambios en la ingesta, en el peso corporal o en la tolerancia a la glucosa inducidos por el mate, hemos llevado a cabo un protocolo de exposición crónica al mate.

Los materiales necesarios para el experimento son los siguientes:

- Bebederos de 30 ml de capacidad.
- Probeta.
- Balanza.
- Papel aluminio.
- Mate (preparado mediante el protocolo de cebada simulada) a 25°C.
- Agua filtrada a 25°C.

El diseño experimental fue el siguiente:

En primer lugar, se dividieron aleatoriamente ratones (*arcPomc^{-/-}*) y ratones *salvajes* para *Pomc* de 12 semanas de edad, se los aisló del mismo modo que se mostró en la Figura 9, y se los separó en dos grupos: aquellos que recibirían agua filtrada, y aquellos que recibirían mate preparado mediante el protocolo de cebada simulada descrito en el apartado 3.7, durante 3 meses consecutivos.

A partir de la semana 12 de edad, se les midió dos veces por semana su peso corporal, su ingesta diaria y el volumen de bebida ingerida diariamente, y a partir de la semana 14 se les comienza a dar mate o agua. Para ello, fue necesario conseguir bebederos (como los que se muestran en la Figura 9) que no tengan fugas de líquido, y que consecuentemente permitan calcular el volumen bebido diariamente mediante la diferencia entre el volumen inicial que se dejó en cada bebedero, y el volumen final, es decir, el volumen que quedó en la botella. Al momento de administrar la infusión a los animales, se cubrieron los bebederos con papel aluminio para evitar la fotooxidación del mate. De modo similar se calculó la ingesta diaria: la diferencia entre el alimento dejado para cada animal y el alimento que quedó. Estas dos mediciones, junto con la medición del peso corporal, fueron continuadas hasta haber concluido los 3 meses de tratamiento.

En la semana 22 de edad, se les realizó a los animales tratados un test de tolerancia a la glucosa, y en la semana 24, se los sacrificó con fines de extraer grasa blanca (inguinal, gonadal) e hígado, así como también, grasa marrón o parda.

Como se describió en el apartado 4.9.1, no encontramos diferencias significativas en lo que concierne a cambios conductuales en la ingesta generados por una exposición aguda al mate. Es por ello que hemos decidido repetir el protocolo de exposición crónica pero en este caso, para ratones POMC-EGFP, a fines de analizar a futuro si existen diferencias significativas en la actividad de las neuronas de *Pomc* entre ambos tratamientos (mate y agua), generadas por una exposición crónica. Debido a ello, sólo se modificó el último paso del protocolo de exposición crónica, por lo que concluidos los 3 meses de exposición, en la semana 24 de edad se ha perfundido a los animales con el propósito de fijar sus tejidos con paraformaldehído, extraer su cerebro y consecuentemente obtener cortes histológicos del mismo para el posterior análisis futuro de actividad neuronal mediante una inmunohistoquímica.

4.10 Test de tolerancia a la glucosa (GTT)

En la semana 22 de edad los animales tratados fueron sometidos a un test de tolerancia a la glucosa con el propósito de analizar si existen diferencias en la tolerancia a la glucosa entre animales que tomaron crónicamente mate y los que tomaron agua.

Materiales necesarios para el experimento:

- Aguja 30G
- Jeringa de tuberculina con una capacidad de 1 ml
- Bisturí
- Solución de glucosa (0,2 g/ml) en agua destilada
- Glucómetro
- Tiras reactivas para el glucómetro
- Cronómetro

El protocolo de este experimento consiste en lo siguiente:

El día del experimento se les quitó el alimento a los animales alrededor de las 7 A.M. Luego de 6 horas de ayuno, a las 13 P.M. se los trasladó a una habitación de experimentación

y se los dejó durante una hora con el fin de que se aclimaten. Una vez transcurrida esa hora de aclimatación, alrededor de las 14 P.M. comenzó el experimento:

1. En primer lugar, con un bisturí se les realizó un corte de 0.2 cm en la cola del ratón a evaluar, con el propósito de extraer una pequeña muestra de sangre para medir su glucemia basal. Para ello, se utilizó un glucómetro *OneTouch UltraMini*[®] de Johnson & Johnson y tiras reactivas *OneTouch Ultra*[®] de la misma marca, que en un extremo se insertan dentro del glucómetro y en el extremo contrario reaccionan con la muestra de sangre, mostrando como resultado la glucemia del animal (Figura 10).
2. Luego, se les realizó una inyección intraperitoneal de glucosa (2g de glucosa/kg de ratón).
3. A partir de ese momento se comenzó a registrar la glucemia post-inyección de glucosa, a los 15, 30, 60 y 120 minutos, extrayendo la muestra de sangre desde el pequeño corte en la cola del animal que se realizó en el paso 1 del protocolo.
4. Posteriormente, los animales fueron pasados a jaulas limpias, se les agregó alimento y la bebida correspondiente, y se los volvió a alojar en el bioterio.
5. Los datos obtenidos mediante este experimento fueron analizados mediante un “análisis de la varianza de medidas repetidas” utilizando el test post-hoc de Bonferroni para evaluar comparaciones múltiples, así como también, se ha calculado el área bajo la curva mediante una Prueba T para muestras independientes, con el programa estadístico *GraphPad Prism 8*. Como criterio de inclusión, sólo se tomaron en cuenta a aquellos ratones que superaron los 300 mg/dl de glucemia posterior a la sobrecarga de glucosa.



Figura 10. Protocolo de test de tolerancia a la glucosa. En las tres imágenes se muestra una medición de la glucemia de un ratón con un glucómetro. La muestra de sangre es una gota extraída de la cola del animal.

4.11 Extracción de grasa

Tal como se detalló en el apartado 4.9.2, a las 24 semanas de edad se sacrificó a los ratones y se les realizó un protocolo de extracción de grasa. El propósito de este experimento fue estudiar si existen diferencias significativas en la cantidad de ciertos depósitos de grasa presentes en aquellos animales expuestos crónicamente a la toma de mate, con respecto al grupo control (aquellos animales expuestos a la toma de agua). Para ello, se extrajo y se pesó la grasa inguinal unilateral, y visceral (retroperitoneal), así como también hígado y grasa parda de cada uno de los animales tratados crónicamente. En la Figura 11 se pueden observar los tejidos mencionados extraídos de 4 animales diferentes.

Materiales:

- Pinzas de disección: rectas de punta roma, rectas de punta curva, Kocher.
- Tijeras de disección: Tijera Mayo e Iris.
- Plataforma de telgopor cubierto de papel aluminio.
- Agujas o alfileres.
- Alcohol 70%.
- Microtubos.
- Hielo
- Papel de pesada.
- Balanza analítica.
- Placa de petri
- Solución de SDS 1X

Una consideración importante previo a comenzar el experimento es que es necesario trabajar en condiciones sin RNAsa, ya que se almacenará el hipotálamo de cada animal en caso de desear realizar análisis cuantitativos de la expresión a nivel transcripcional de POMC entre los animales tratados, mediante una RT-qPCR. Por esta razón, es necesario dejar la placa de Petri, las pinzas y tijeras de disección en solución de SDS 1X durante 10 minutos y luego, enjuagar en agua libre de RNAsas. Del mismo modo, también se debe rociar la mesada de trabajo con alcohol 70 %.

Por otro lado, es conveniente pesar de antemano los papeles de pesada a fin de agilizar los tiempos del experimento ya que es importante registrar el peso de los tejidos inmediatamente después de ser extraídos, debido a que una vez extraídos del organismo comienzan a secarse, afectando potencialmente el peso de cada tejido. Para ello, una vez que se extrajo cada tejido, se lo posicionó sobre el papel de filtro previamente pesado y se registró el peso de cada tejido mediante una balanza analítica.

Protocolo de extracción de grasa:

1. En primer lugar, se le realizó una dislocación cervical al ratón, y rápidamente se lo trasladó a la plataforma de telgopor cubierta de papel aluminio. Mediante el uso de tijeras y pinzas de disección se le realizó un corte cervical, se le extrajo el cerebro, se lo posicionó en la placa de Petri y posteriormente, se extrajo el hipotálamo, el cual fue almacenado en un microtubo en frío.
2. Luego, se posicionó el cuerpo del animal sobre la plataforma de telgopor boca abajo y se lo acomodó utilizando las agujas o alfileres de modo tal de que su cuerpo quede estirado. Se le realizó un corte de un centímetro de la cola del animal, el cual fue almacenado en otro microtubo en frío. El propósito de ello es almacenar tejido del animal en caso de que se necesite confirmar su genotipo.
3. Posteriormente, se le realizó un corte subcutáneo aproximadamente donde finaliza la columna dorsal y comienza la columna lumbar del animal, y se continuó realizando cortes longitudinales sobre la columna dorsal, hasta alcanzar la zona interescapular, donde se encuentra en mayor proporción la grasa marrón/parda o BAT (*brown adipose tissue*). Una vez alcanzada, mediante el uso de una tijera de disección Iris, se extrajo la grasa parda, se la colocó sobre un papel de pesada, se la pesó en la balanza analítica, se registra su peso y se almacenó en un microtubo en frío con el fin de realizar

potencialmente análisis cuantitativos posteriores de presencia de la proteína UCP1 (proteína-1 desacoplante o *termogenina*), una proteína que se expresa cuando se activa la termogénesis a partir del metabolismo de la grasa parda, a fin estudiar si hay mayor activación de la termogénesis en aquellos animales tratados con mate con respecto al grupo control.

4. Luego, fue necesario dar vuelta el cuerpo del animal, posicionándolo boca arriba y estirándolo con las agujas o alfileres. Se le realizó un corte subcutáneo aproximadamente donde finaliza la región abdominal y comienza la cavidad pélvica, y se continuó cortando longitudinalmente sobre una de las regiones inguinales, a fin de extraer la grasa inguinal unilateral.
5. En quinto lugar, se realizó un corte intramuscular aproximadamente donde finaliza la caja torácica y comienza la cavidad abdominal, y se continuó cortando longitudinalmente hasta donde finaliza la zona gonadal, a fin de extraer la grasa gonadal.
6. Posteriormente, se extrajo el hígado.
7. Por último, los microtubos que contienen al hipotálamo y a la grasa parda fueron almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, y por otro lado, los que contienen el trozo de cola del animal fueron almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. El resto de los tejidos fueron descartados como residuos patogénicos.



Figura 11. Tejidos extraídos mediante el protocolo de extracción de grasa. Se pueden observar de izquierda a derecha el hígado, la grasa gonadal y la grasa inguinal. La grasa parda fue pesada como se muestra en los papeles de pesada e inmediatamente reservada en tubos Eppendorf para su almacenamiento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.12 Perfusión

Como se mencionó previamente en el apartado 4.9.1 y 4.9.2, debido a que no obtuvimos diferencias significativas en lo que concierne a la ingesta de ratones expuestos de forma aguda al mate con respecto al grupo control, hemos decidido analizar si con el protocolo de exposición crónica al mate/agua existen diferencias entre los tratamientos, y de ser así, si existe una diferencia en la actividad de las neuronas de *Pomc* entre los animales expuestos crónicamente al mate con respecto a los que tomaron agua.

Es por ello que en la semana 24 de edad, a los animales de genotipo POMC-EGFP expuestos crónicamente al tratamiento se los sacrificó mediante un protocolo de perfusión, con el fin de fijar los tejidos con paraformaldehído (PFA) y extraer el cerebro para obtener posteriormente cortes histológicos y a futuro, realizar una inmunohistoquímica contra el marcador C-FOS, a fin de analizar si aquellas neuronas que expresan *Pomc* (que se verán verdes debido al gen reportero expresado corriente abajo, EGFP) están activadas en mayor proporción en los animales que tomaron mate que en los que tomaron agua. Debido a la pandemia por Sars-Cov2, no hemos podido continuar con estos experimentos por lo que sólo se han dejado almacenados los cortes histológicos de estos animales tratados. Queda pendiente la realización de la inmunohistoquímica para finalmente analizar el nivel de activación en neuronas que expresan *Pomc*.

Materiales:

- Solución de PBS 1X (Buffer Fosfato Salino - 137mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10mM de Na₂HPO₄, 2mM de KH₂PO₄; pH 7,4)
- Solución de paraformaldehído (PFA) 4% en Buffer Fosfato Salino (PBS: 137mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 10mM de Na₂HPO₄, 2mM de KH₂PO₄; p.H. 7,4)
- Hielo
- Bomba de pistón
- Solución de hidrato de cloral 5% en PBS
- Pinza mariposa
- Cánula y aguja de perfusión
- Solución de sacarosa 30% en PBS
- Aguja 30G

- Jeringa de tuberculina de 1ml de capacidad.
- Plataforma plástica
- Cinta
- Pinzas de disección: recta de punta roma, recta de punta curva, Kocher
- Tijeras de disección: tijera Mayo y tijera Iris.

Protocolo de perfusión:

1. En primer lugar, se le realizó al ratón a perfundir una inyección intraperitoneal con una solución de hidrato de cloral 5% en PBS, a una dosis de 100 μ l/10 gr de ratón. Una vez que el ratón entró en anestesia profunda (no reacciona al dolor), se lo trasladó a una plataforma plástica y se lo dispuso boca arriba. Se lo afirmó en la plataforma con cinta, de manera que quede estirado.
2. Luego, se le realizó una incisión en el abdomen por debajo del esternón, y se corrió el contenido hasta visualizar el diafragma del animal. Se le realizó un neumotórax, se cortó toda la parrilla costal y se le expuso el corazón. Posteriormente, se le realizó una incisión en la aurícula derecha de tal manera que salga la sangre del circuito venoso, y se inyectó 1ml/1g de ratón de solución de PBS 1X mediante una cánula y aguja de perfusión, en la aorta, asegurando con una pinza con clamp sobre el ventrículo izquierdo (Figura 12).
3. Una vez suministrada la solución salina, se procedió a instilar la solución de PFA 4% en PBS, a una dosis de 1ml/1g de ratón. Tanto para el paso 2 como para el paso 3 se ha utilizado una bomba de tipo pistón que garantiza una presión constante de 5ml/min.
4. Por último, una vez completamente perfundido el animal, se procedió a extraer el cerebro mediante el uso de pinzas y tijeras de disección, y se lo almacenó en solución de PFA al 4% en PBS durante 18 horas a 4°C. Transcurridas las 18 horas, se le realizó un lavado con solución de PBS 1X, y se lo incubó en solución de sacarosa 30 % en PBS durante 1 o dos días, a 4°C.

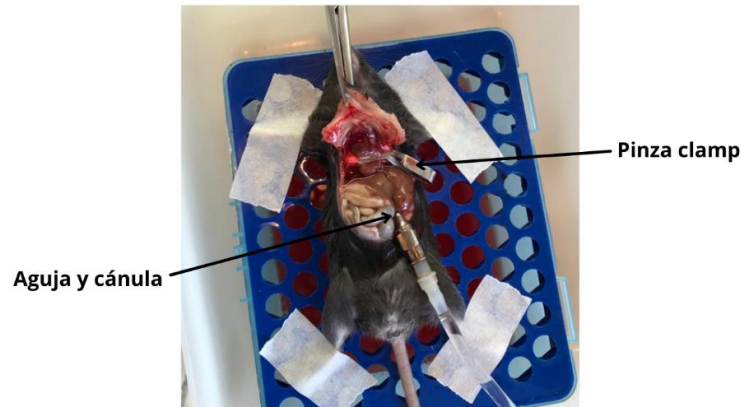


Figura 12. Perforación de un animal POMC-EGFP. Instilación de 1ml/1g de solución de PBS 1X, mediante el uso de una cánula y aguja de perfusión, asegurando la aguja insertada en el corazón con una pinza.

4.13 Obtención de cortes histológicos

Materiales:

- Micrótopo de congelación *Leica SM 2010R*[®]
- Solución de sacarosa en PBS 30%
- Hielo
- Pinzas de disección: rectas de punta roma, rectas de punta curva.
- Cuchilla
- Pincel
- Cuadrado de *Parafilm* de 16 cm².
- Solución de PBS 1X.
- Multiwell 6
- Papel aluminio
- Papel film
- Solución de congelamiento (50 % Polietilenglicol, 30 % PBS y 20 % Glicerol)

Posterior a la perfusión del ratón a analizar se debieron obtener cortes histológicos, necesarios para el análisis de inmunohistoquímica a realizar a futuro. Por ello, una semana posterior a la perfusión, se cortaron coronalmente los cerebros con un micrótopo de congelación, en rebanadas de 35 µm de espesor. Para ello, previamente se cortó axialmente por

detrás del cerebelo y por delante del quiasma óptico, descartándose las partes anterior y posterior (Figura 13A) y luego, se montó el cerebro medio sobre la platina del micrótopo, utilizando una solución de sacarosa 30% en PBS, a fin de que quede correctamente adherido (Figura 13B). Con el fin de guardar 3 series de cada cerebro, las rebanadas coronales se repartieron en tres pocillos de una placa Multiwell 6 con solución de PBS 1X (Figura 13C), cubriendo las tapas con papel aluminio a fin de proteger de la luz a la fluorescencia EGFP de las neuronas que expresan *Pomc*. Una vez obtenidos todos los cortes histológicos, se almacenaron en microtubos con 1ml de solución de congelamiento, a una temperatura de -20 °C.

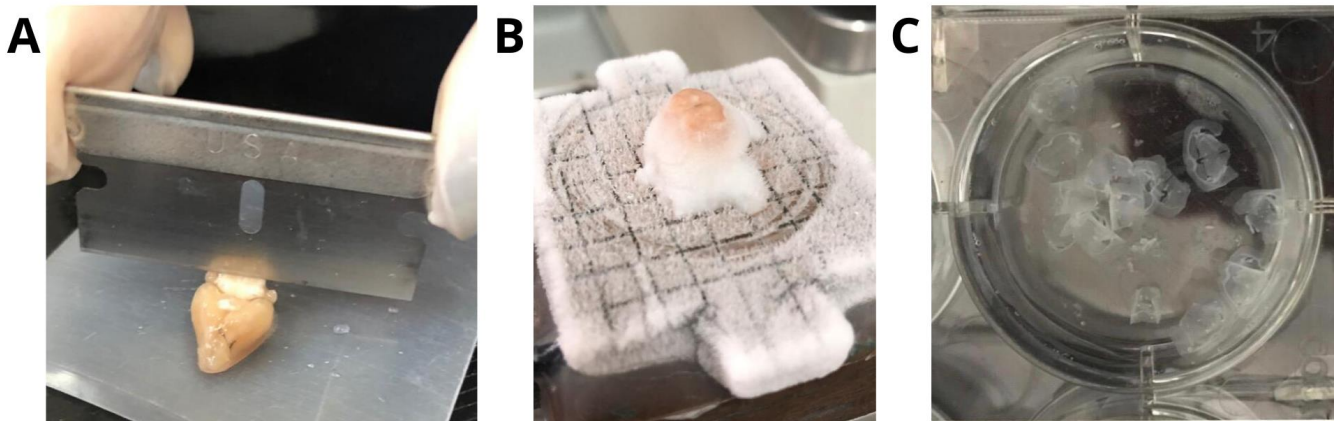


Figura 13. Protocolo de obtención de cortes histológicos. A. Se realizan dos cortes para descartar las porciones anterior y posterior del cerebro. B. Montaje del cerebro sobre la platina del micrótopo de congelamiento. C. Cortes histológicos de cerebro en pocillo de una placa Multiwell.

4.14 Análisis estadístico

Todos los datos fueron presentados como el promedio \pm error estándar de la media, y fueron analizados mediante Test T para muestras pareadas, Test T para muestras independientes y ANOVA de medidas repetidas (RMA), en el programa estadístico GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, La Jolla California, USA). También se ha utilizado el post-hoc test de Bonferroni en determinados análisis estadísticos cuando fue necesario. Se han considerado como significativos los p-valores menores a 0.05.

5. RESULTADOS

5.1 Obtención de distintas preparaciones de mate para administrar a los ratones como infusión

A fines de poner a prueba nuestra hipótesis, primero fue necesario obtener distintos modos de preparación del mate para administrarlo a los ratones de forma oral, de modo tal de remedar la manera más tradicional de beber mate, y al mismo tiempo conservar sus componentes principales característicos de la yerba mate.

Para ello, por un lado hemos puesto a punto un protocolo de *Cebada Simulada* descrito en el apartado 4.7, donde obtuvimos una concentración de mate de 10% para administrar a los ratones en bebederos de bioterio. Este protocolo fue propuesto por la Dra. Irene Taravini (Laboratorio de Neurobiología Experimental, Universidad de Entre Ríos, Argentina), mediante el cual trató con infusión de mate modelos murinos de Parkinson. De esta manera, obtuvimos una suspensión de 500 ml de mate, que usamos para administrar a los ratones de forma oral.

Se pudo evidenciar cualitativamente la presencia de cuatro de los componentes principales (teobromina, ácido clorogénico, cafeína y rutina) en una muestra aleatoria de mate preparada con el protocolo de *Cebada Simulada*, en una cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), realizado por la Dra. Irene Taravini (Laboratorio de Neurobiología Experimental, Universidad de Entre Ríos, Argentina), quien ya había evidenciado la presencia de estos compuestos previamente (Tribbia et al., 2018).

En segundo lugar, hemos puesto a punto un protocolo de *Extracción liofilizada*, descrito en el apartado 4.8, donde obtuvimos un extracto seco de mate de 169 mg en 30 tubos separados. A fines de analizar si esta preparación conserva los componentes característicos de las hojas de yerba mate, se le ha realizado un análisis de HPLC en colaboración con la Dra. Mariel Marder (Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina), donde se evaluó la presencia de dos de los componentes principales: el ácido clorogénico y la rutina. En la Figura 14A donde se muestra este perfil cromatográfico, se puede observar que la muestra de Yerba Mate conserva ambos componentes, en comparación con los patrones utilizados (Figura 14B y 14C).

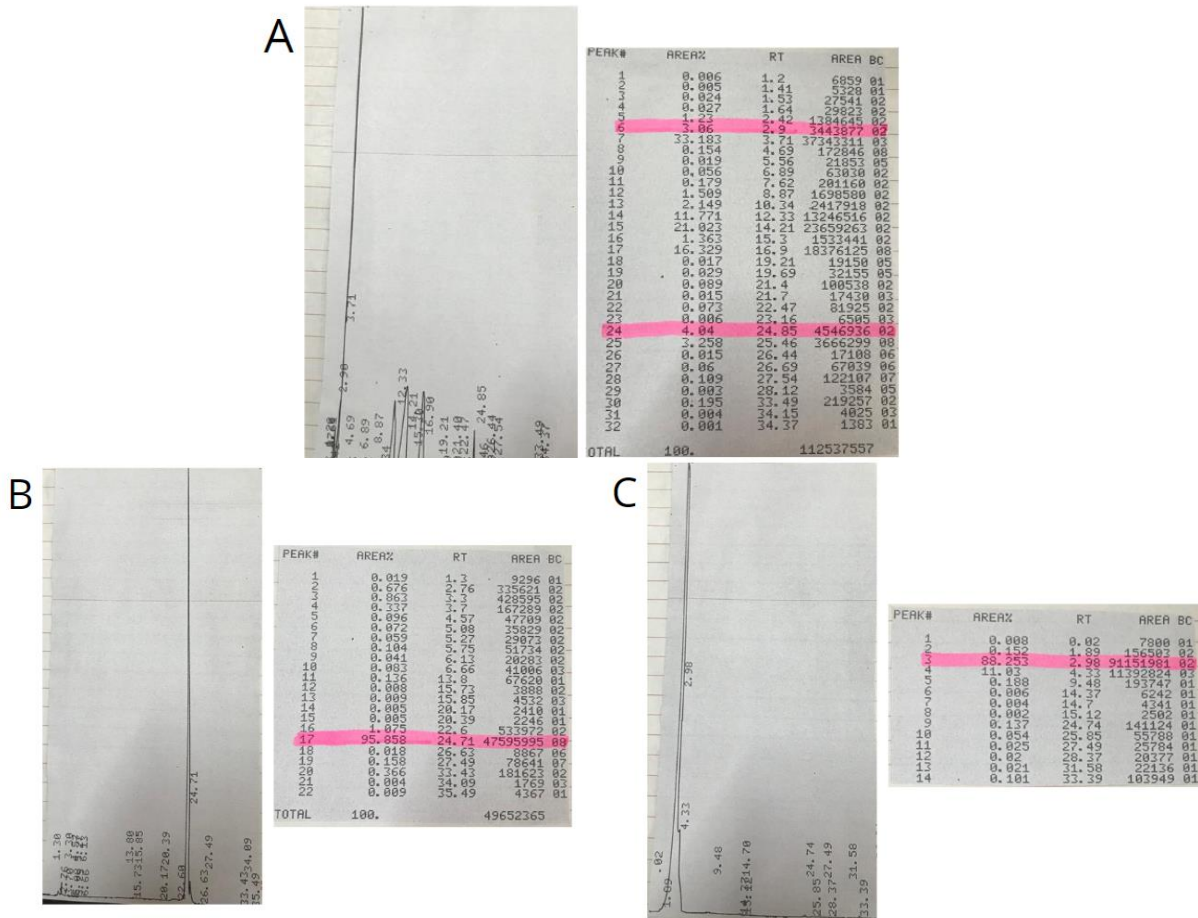


Figura 14: Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) del mate liofilizado. Cromatograma analítico representativo de HPLC del cocimiento de *Ilex paraguariensis* – Yerba Mate (A) y como testigos la rutina (B) y el ácido clorogénico (C). Como se puede observar el tiempo de retención del pico mayoritario (2.9) coincide con el de ácido clorogénico. El pico de 24,85 coincide con el tiempo de retención de la rutina.

Como resultado, hemos podido obtener dos preparaciones de mate de las cuales podemos asumir que ambas conservan los componentes característicos de la yerba mate, ya que por un lado, hemos utilizado la misma metodología utilizada por la Dra. Irene Taravini y la misma marca comercial de yerba mate mediante el cual evidenció los mencionados componentes y por otro lado, en el caso del extracto liofilizado, hemos podido observarlos por un perfil cromatográfico. Además ambos remedan la forma tradicional de beber esta infusión, de modo tal de administrar a los ratones de forma oral para analizar los efectos del mismo en la ingesta, peso corporal y en la tolerancia a la glucosa.

Una vez puestos a punto los modos de preparación de mate, hemos diseñado dos protocolos de administración de mate para evaluar sus efectos en la ingesta de alimento, peso corporal y tolerancia a la glucosa. Particularmente, diseñamos un protocolo de exposición aguda al mate el cual nos permitió evaluar cambios rápidos en la ingesta de alimento producidos por la ingesta de mate, que serían evidenciados en el corto plazo y de forma aguda, y que de otro modo, podrían ser enmascarados por una habituación al mate (como podría ocurrir en un protocolo de exposición crónica al mate).

Concomitantemente, hemos diseñado un protocolo de exposición crónica al mate a fines de evaluar cambios en la ingesta de alimento, peso corporal y tolerancia a la glucosa, el cual nos permitió analizar cambios a un mediano-largo plazo (10 semanas de exposición). Debido a que la dosis fue mayor y más persistente en el tiempo, este protocolo nos permitiría evidenciar cambios más marcados así como también su evolución a lo largo de las semanas de exposición.

5.2 Determinación de los efectos de una exposición aguda al mate en la ingesta de alimento de ratones hembra

Para poder llevar a cabo este objetivo fue necesario poner a punto distintos protocolos de exposición aguda y dosis de mate a administrar, en ambos modos de preparación de mate, a fin de diseñar un protocolo que permita dilucidar si existen efectos en la ingesta de alimento dado por una exposición aguda al mate.

En un primer experimento, se utilizaron ratones POMC-EGFP machos y la dosis administrada fue de 1 ml de mate preparado mediante el protocolo de *Cebada simulada*, o agua filtrada como grupo control, siguiendo el protocolo base descrito en el apartado 4.9.1, con la excepción de que se registró únicamente la ingesta de alimento a las 2 horas posteriores a la exposición de mate. Debido a que no se alcanzó a obtener un número de casos suficiente para realizar un análisis estadístico de los resultados, se determinó la existencia de alguna tendencia entre los tratamientos mediante gráficos de barras. Para este propósito, los registros de ingesta fueron promediados para cada grupo experimental (Figura 15). 24 horas previo al comienzo del experimento se registró la ingesta de alimento sin encontrarse diferencias basales entre los grupos experimentales (ingesta diaria: 2,16 g y 2 g, para los grupos que serán sometidos a mate y agua, respectivamente).

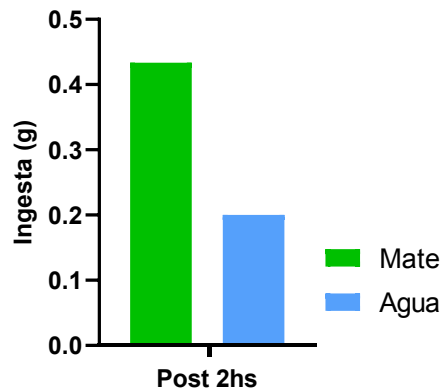


Figura 15. Ingestas de alimento de los grupos experimentales dadas por la administración de 1 ml de mate preparado según el protocolo de *Cebada simulada*. A fines ilustrativos, se presentan las medias halladas correspondientes a la ingesta de alimento a las 2 horas posterior al experimento, entre los animales expuestos al mate de forma aguda respecto del grupo control. Los gráficos de barras se encuentran representados por la media de cada grupo experimental. Muestra: n=3 (Mate) y n=2 (Agua).

Para esta puesta a punto, hemos observado el efecto contrario al buscado. Es por ello que hemos decidido probar con el protocolo de *Extracto liofilizado* a fines de poner a punto el protocolo de exposición aguda con un preparado de mate diferente y analizar qué efectos tiene este preparado en la ingesta de alimento.

A fines de probar diferentes concentraciones de mate, en un tercer experimento hemos preparado esta infusión mediante el protocolo de *Extracto liofilizado*, donde administramos 100 µg de extracto/g de ratón, luego de un ayuno de 6 horas. 24 horas previo al comienzo del experimento, se registró la ingesta de alimento sin encontrarse diferencias basales entre los grupos experimentales (ingesta diaria: 2,25 g y 2.4 g, para los grupos que serán sometidos a mate y agua, respectivamente). Si bien el bajo número de ratones analizado no nos permitió realizar un análisis estadístico, la tendencia observada no muestra diferencias entre los ratones que tomaron una infusión a partir de una preparación de mate liofilizado y aquellos que tomaron agua (Figura 16).

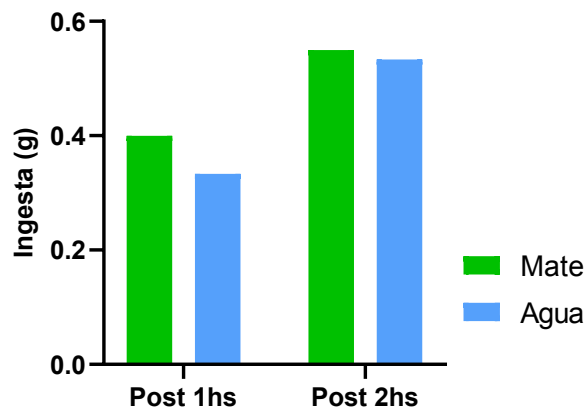


Figura 16. Ingestas de alimento de los grupos experimentales dadas por la administración de mate preparado según el protocolo de *Extracto liofilizado* a una dosis de 100 µg/g de ratón. A fines ilustrativos, se presentan las medias halladas correspondientes a la ingesta de alimento a la hora y 2 horas posterior al experimento, de los animales expuestos al mate de forma aguda respecto del grupo control. Los gráficos de barras se encuentran representados por la media de cada grupo experimental. Muestra: n=3 (Mate) y n=2 (Agua).

Con el objetivo de evaluar si había cambios en la ingesta de alimento al aumentar la dosis de exposición al mate, duplicamos la misma llevándola a 200 µg de extracto de mate/g de ratón (o agua como control), administrado como solución luego de un ayuno de 6 horas. El protocolo se realizó dos veces, invirtiendo el tratamiento que recibió cada ratón en el segundo experimento. Entre la primera y la segunda exposición transcurrieron 13 días; en ese lapso temporal los animales estuvieron expuestos a agua corriente y alimento balanceado *ad libitum*. 24 horas previo al comienzo del experimento, se registró la ingesta de alimento para descartar posibles diferencias basales entre los grupos experimentales y no se encontraron diferencias significativas [Prueba T ($p > 0.05$): Ingesta diaria del Grupo Mate $2,64\text{g} \pm 0,057$ (Media \pm SEM) vs Grupo Agua $2,63\text{g} \pm 0,016$ (Media \pm SEM)].

Como se puede observar en la Figura 17, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la ingesta de alimento luego de tomar agua o mate, en ninguno de los momentos testeados, es decir a 1 h y 2 hs posteriores a la reposición de alimento (Prueba T pareada, $p > 0,05$). A partir de los resultados brindados por estos experimentos, es posible deducir que la exposición aguda a la yerba mate no tendría efectos en la ingesta de alimento, al menos con las condiciones experimentales testeadas en hembras. Los datos preliminares de ingesta de alimento luego de una exposición aguda al Mate en machos tampoco mostraron

diferencias respecto del grupo control, aunque con un número de casos insuficiente para poder ser analizado estadísticamente.

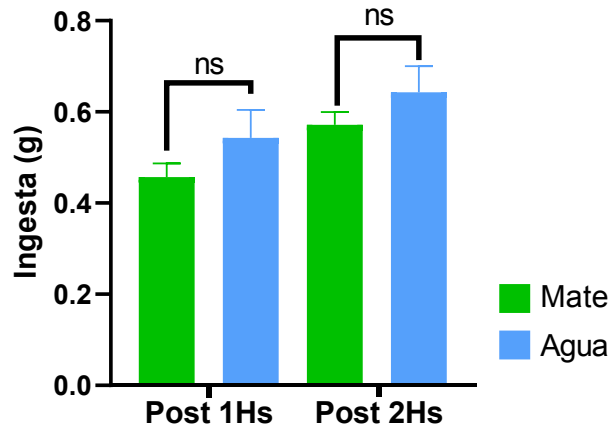


Figura 17. La exposición aguda al mate no cambia la ingesta de alimento en ratones hembra. Las barras representan la media de la ingesta de alimento 1 hora o 2 horas luego de la exposición aguda a Agua o Mate. Las barras de error representan el error estándar de la media. Prueba T para muestras pareadas: ns=no significativo ($p>0,05$). Muestra: $n=7$ en cada grupo.

5.3 Determinación de los efectos de una exposición crónica al mate sobre la tolerancia a la glucosa en hembras

Con el propósito de estudiar si la yerba mate podría potencialmente generar efectos beneficiosos en la diabetes de tipo 2, hemos diseñado un protocolo que nos permite analizar si la exposición crónica al mate mejora la tolerancia a una sobrecarga de glucosa.

Para ello, ratones de 12 semanas de edad han sido aislados y su peso corporal, volumen bebido e ingesta diaria han sido registrados semanalmente. En la semana 14 de edad, los animales fueron separados en los grupos experimentales y se les administró mate preparado mediante el protocolo de *Cebada simulada* o agua filtrada como grupo control, de modo *ad libitum*. En la semana 22 de edad, los animales fueron sometidos a un test de tolerancia a la glucosa (GTT). El mismo consiste en retirar el alimento a las 8 AM a los animales, y dejarlos en ayunas por 6 horas. Se les mide la glucemia basal y se les realiza una inyección intraperitoneal de glucosa, a una dosis de 2g de glucosa/kg de ratón y se les mide su glucemia a los 15, 30, 60 y 120 minutos posteriores a la sobrecarga de glucosa.

Como se ilustra en la Figura 18 hemos observado diferencias en las glucemias basales de los animales a los que se les administró mate de forma crónica con respecto al grupo control (Prueba T, $p < 0,05$).

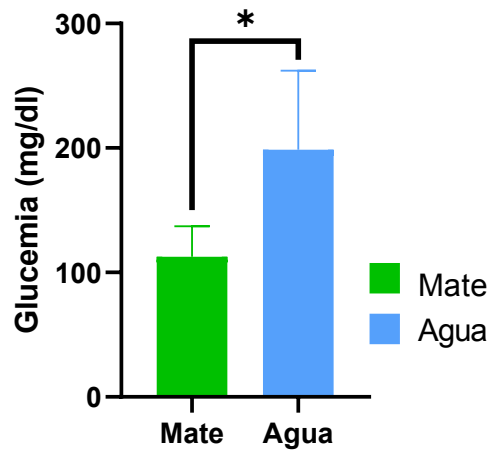


Figura 18. La exposición crónica al mate disminuye la glucemia basal en hembras *salvajes*. Las barras representan el promedio \pm error estándar de la media de las glucemias basales tras 6 hs de ayuno. Prueba T para muestras independientes: $*p < 0,05$. Muestra: $n=5$ (Mate) y $n=4$ (Agua).

A raíz de estos hallazgos, hemos determinado los efectos del mate en la tolerancia a la glucosa. Como se muestra en la Figura 19A, los ratones que tomaron mate en forma crónica mostraron una depuración de glucosa significativamente más rápida que los que tomaron agua (Figura 19A, ANOVA de Medidas Repetidas, $p < 0,05$). Esto indicaría que la yerba mate ha generado una mayor tolerancia a una sobrecarga de glucosa respecto del grupo control, lo que también fue evidenciado por una menor área bajo la curva (Prueba T, $p < 0,01$, Figura 19B).

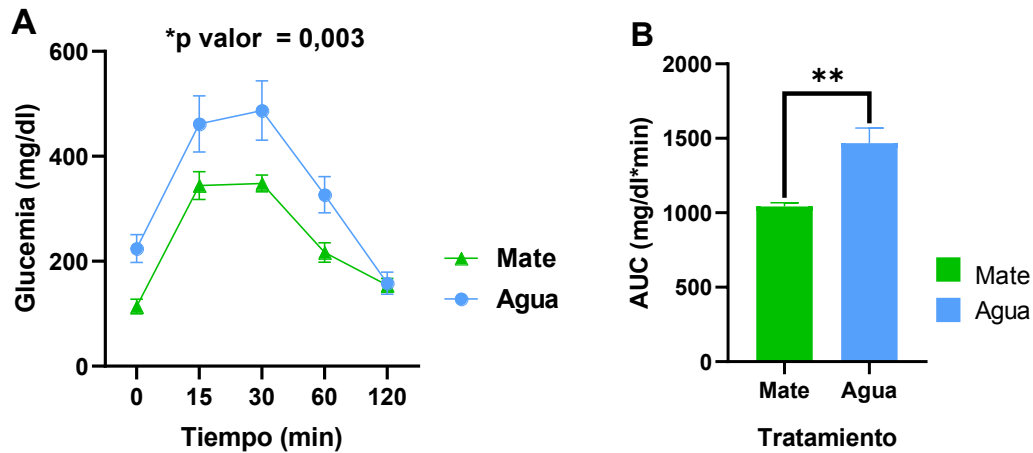


Figura 19. La exposición crónica al mate mejora la tolerancia a la glucosa en hembras. (A) Curva de Tolerancia a la Glucosa en hembras. Los puntos representan la media \pm error estándar de la media de los niveles de glucosa registrados en cada medición a los 0, 15, 30, 60 y 120 minutos. ANOVA de medidas repetidas (factor tratamiento $*p < 0.05$: Mate vs. Agua). (B) Área bajo las curvas graficadas en A. Prueba T para muestras independientes: $**p < 0.01$. Muestra: $n = 4$ (Mate) y $n = 3$ (Agua).

A partir de estos experimentos se deduce que el mate genera efectos beneficiosos en la tolerancia a la glucosa en ratones hembra.

5.4 Determinación de los efectos de una exposición crónica al mate en la ingesta de alimento en ratones

Con el propósito de estudiar los efectos de una exposición crónica al mate en la ingesta de alimento, hemos llevado a cabo un tratamiento crónico con el mismo, detallado en el apartado 3.9.2. Los animales fueron aislados en la semana 12 de edad, y a partir de ese momento se registró la ingesta diaria de los animales semanalmente.

Como se observa en la Figura 20, tanto en el caso de los machos como en el caso de las hembras, no se observaron diferencias significativas en la ingesta de alimento a causa de un tratamiento crónico con mate preparado según el protocolo de *Cebada Simulada*, en comparación con el grupo que tomó agua (ANOVA de Medidas Repetidas, $p > 0,05$). Durante las semanas previas a la exposición (12 y 13 semanas de edad) los ratones presentaron una ingesta acumulada que permaneció estable hasta la semana 16. Estos experimentos fueron

extendidos con un menor número de casos hasta que finalizó el tratamiento en la semana 24 y no hemos notado diferencias en la tendencia.

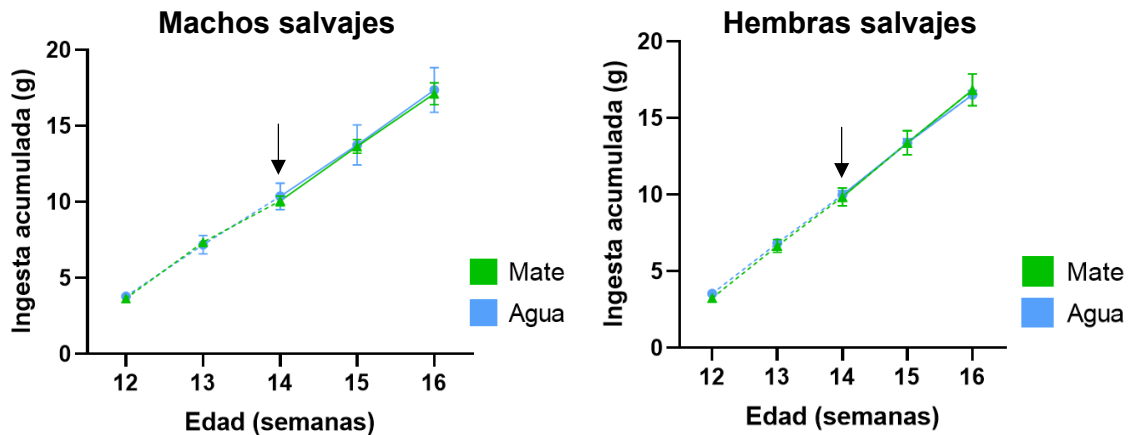


Figura 20. El consumo crónico de mate no altera la ingesta de alimento acumulada en ratones salvajes. Las curvas muestran la ingesta acumulada que resulta de la sumatoria de la ingesta diaria a lo largo de las semanas. Cada punto representa la media de los ratones de cada grupo \pm el error estándar de la media. Las líneas punteadas representan las semanas previas al comienzo de la exposición en las que ambos grupos bebían agua corriente. Las flechas indican la semana en la que comenzó la exposición crónica a mate. Machos: n=4 (Mate) y n=3 (Agua); Hembras: n=5 (Mate) y n=4 (Agua).

Estos experimentos nos permiten deducir que una exposición crónica al mate siguiendo nuestro protocolo de *Cebada Simulada* no generaría efecto alguno en la ingesta de alimento en ratones.

5.5 Determinación de los efectos de una exposición crónica al mate en el peso corporal en ratones

Con el propósito de analizar si una exposición crónica al mate podría generar efectos beneficiosos en el peso corporal, hemos registrado semanalmente los pesos de los ratones tratados con el protocolo de exposición crónica descrito en el apartado 3.9.2.

Como se muestra en la Figura 21, no se han observado diferencias significativas en el peso corporal tanto en machos como en hembras entre la exposición crónica al mate y al agua hasta la semana 16 (ANOVA de medidas repetidas, $p > 0.05$). Estos experimentos fueron extendidos con un menor número de casos hasta que finalizó el tratamiento en la semana 24 observándose la misma tendencia (datos no mostrados).

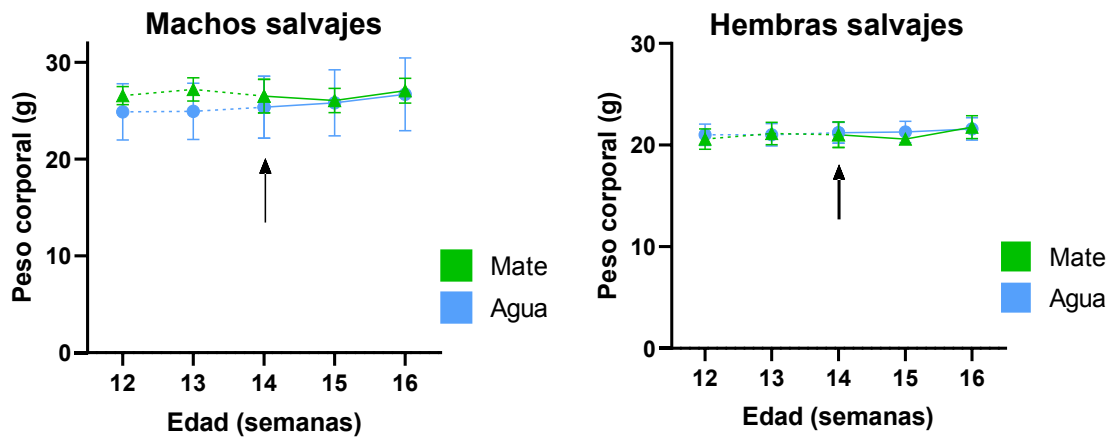


Figura 21. El consumo crónico de mate no altera el peso de los ratones salvajes. Gráficos de curvas de pesos corporales en función de la edad, de animales. Los puntos representan la media \pm error estándar de la media de los pesos corporales registrados semanalmente en cada grupo. Las líneas punteadas representan las semanas previas al comienzo de la exposición en las que los ratones bebían agua corriente. Las flechas indican la semana en la que comenzó la exposición crónica a mate. ANOVA de medidas repetidas ($p > 0.05$). Muestra del grupo Machos: $n=4$ (Mate) y $n=3$ (Agua); Muestra del grupo Hembras: $n=5$ (Mate) y $n=4$ (Agua).

De estos experimentos es posible deducir que el mate no generaría efecto alguno en el peso corporal en ratones, al menos en las condiciones experimentales testeadas.

5.5.1 Evaluación de los cambios en el peso corporal y en la ingesta de alimento en ratones obesos (*arcPomc*^{-/-}) dados por una exposición crónica al mate (resultados preliminares)

Con el fin de analizar si la exposición crónica a la yerba mate tiene algún efecto en la ingesta de alimento y peso corporal de ratones obesos, hemos replicado los experimentos anteriores en ratones deficientes en la expresión de POMC en el núcleo arcuato (*arcPomc*^{-/-}).

Debido a que se ha alcanzado un número insuficiente de casos para analizar los resultados estadísticamente, hemos incluido a modo ilustrativo los gráficos de la ingesta de alimento (Figura 22) y del peso corporal (Figura 23) de los animales *arcPomc*^{-/-} expuestos de forma crónica al mate. Estos experimentos serán replicados en el futuro con el propósito de analizar estadísticamente las diferencias en la ingesta de alimento y en el peso corporal entre los tratamientos, así como también analizar el rol de *Pomc* en los efectos generados por el mate, respecto de los ratones *wt* con expresión hipotalámica de *Pomc* que fueron estudiados en este trabajo.

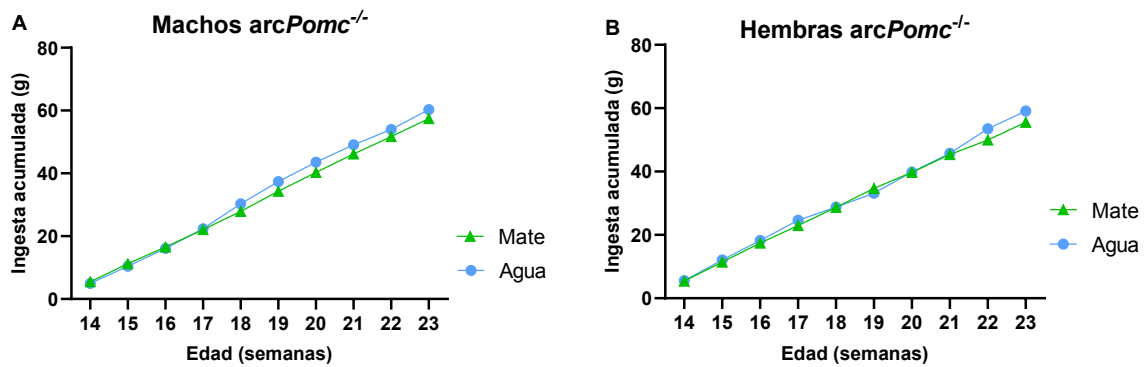


Figura 22. Ingesta de alimento en animales *arcPomc*^{-/-} expuestos crónicamente al mate/agua (resultados preliminares). Se presentan los resultados hallados entre los animales expuestos al mate de forma crónica, respecto del grupo control. Los puntos de las curvas muestran la media de cada grupo experimental para cada semana de edad, en machos (A) y en hembras (B). Muestra del grupo Machos: n=4 (Mate) y n=1 (Agua); Muestra del grupo Hembras: n=2 (Mate) y n=2 (Agua).

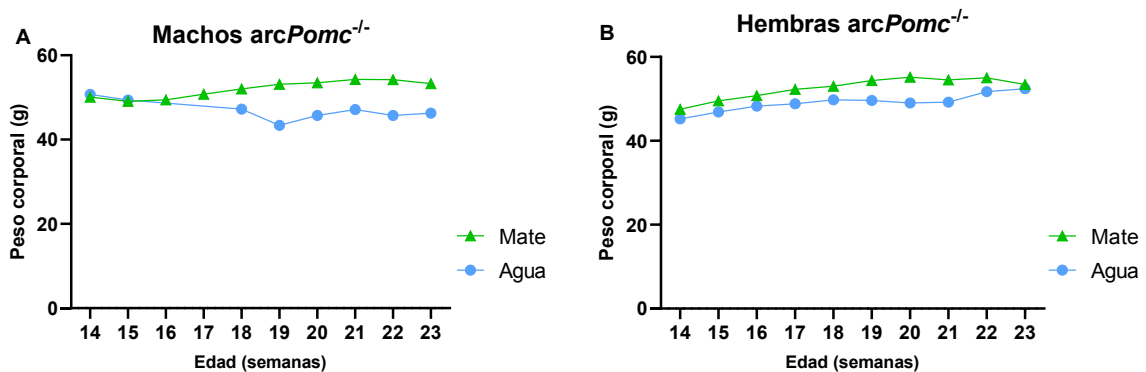


Figura 23. Peso corporal en animales obesos (*arcPomc*^{-/-}) expuestos crónicamente al mate/agua (resultados preliminares). Se muestran los resultados hallados entre los animales expuestos al mate de forma crónica, respecto del grupo control. Los puntos de las curvas muestran la media de cada grupo experimental para cada semana de edad, en machos (A) y en hembras (B). Muestra del grupo Machos: n=4 (Mate) y n=1 (Agua); Muestra del grupo Hembras: n=2 (Mate) y n=2 (Agua).

6. DISCUSIÓN

Nota: La presente tesis de grado se ha enmarcado dentro del comienzo de un proyecto que apunta a dilucidar los mecanismos por los cuales la yerba mate presenta efectos benéficos en el tratamiento de la obesidad y la diabetes a través de los circuitos que involucran a las neuronas de POMC. Por cuestiones coyunturales, en el contexto de la Pandemia por Sars-Cov2, muchos de los experimentos han quedado trancos. Sin embargo, se han dejado una cantidad de muestras biológicas para ser analizadas en un futuro y se han comenzado experimentos con pequeños grupos experimentales que podrán ser completados cuando se puedan retomar las tareas en los laboratorios de investigación (ver apartado 6.1).

En el presente trabajo final hemos hallado que la exposición crónica a un extracto acuoso de yerba mate genera efectos beneficiosos en la glucemia en ratones hembra. Por el contrario, en las condiciones experimentales utilizadas, no hemos encontrado efectos de una exposición aguda a yerba mate sobre la ingesta de alimento en hembras, y tampoco efectos de una exposición crónica a yerba mate sobre el peso corporal o la ingesta de alimento, tanto para ratones macho como para hembras salvajes.

De acuerdo con los resultados alcanzados en este trabajo, hemos podido determinar que una exposición crónica a la yerba mate mejora la tolerancia a la glucosa en ratones hembra, así como también, hemos demostrado que un tratamiento crónico con yerba mate permite disminuir su glucemia basal. Existen diversos estudios que reportan que la planta de la yerba mate genera efectos beneficiosos en la diabetes mediante la disminución de la glucemia. Entre ellos, un trabajo llevado a cabo por Pereira et. al. en el cual evaluaron los efectos de la yerba mate a corto y largo plazo en la homeostasis de la glucosa en ratas, donde han demostrado que la planta de yerba mate ha logrado mejorar significativamente la tolerancia a la glucosa y aumentado la secreción de insulina. Por consecuencia, se ha concluido que la yerba mate tiene efectos anti-hiperglucémicos así como también, un rol potencial en mejorar el estado diabético (Pereira et al., 2012). Además, en un estudio clínico llevado a cabo por Klein y col. en el cual se analizaron los efectos de la yerba mate en los perfiles lipídicos y glucémicos en pacientes con Diabetes Mellitus de tipo 2 se ha comprobado que la yerba mate disminuye significativamente los niveles de glucosa en sangre en ayunas (Klein et al., 2011). Teniendo en cuenta los resultados mencionados y los alcanzados en este proyecto de tesis, es posible deducir que la yerba mate

genera efectos beneficiosos en la tolerancia a la glucosa en ratones. A fines de profundizar sobre los mecanismos subyacentes al efecto de la yerba mate sobre la tolerancia a la glucosa, podría considerarse realizar una prueba de sensibilidad a la insulina y además evaluar si el mate afecta los niveles de insulina circulantes. Además, en un futuro evaluaremos si el mate mejora la glucemia basal y la tolerancia a la glucosa en ratones obesos y si los efectos son dependientes de las neuronas y/o de la expresión de POMC.

En lo que respecta a ingesta de alimento, no hemos observado diferencias significativas en la ingesta de alimento posterior a 1 y 2 horas de una exposición aguda a mate preparado por el protocolo de *Cebada simulada* en ratones hembra. Estos hallazgos difieren de lo observado en diversas investigaciones previas: en un estudio realizado por Yimam y col. en ratas Sprague-Dawley en el cual analizaron los efectos de una exposición aguda de una mezcla de hierbas (Yerba mate, *Morus alba* y *Magnolia officinalis*) en el apetito y en la ingesta de alimento a las 2, 4 y 6 horas posterior a la exposición, han observado reducciones significativas en la ingesta de alimento a partir de las 4 horas posteriores a la provisión de alimento para las ratas administradas con la mezcla de hierbas (Yimam et al., 2016). Similarmente, en un estudio clínico reportado por Harrold y col. en el cual evaluaron los efectos de una exposición aguda a una mezcla de hierbas (en este caso compuesto por Yerba Mate, Guaraná y Damiana) en la ingesta de alimento y en el apetito de mujeres con peso corporal normal y con sobrepeso 15 minutos previos al desayuno y al almuerzo, han observado que la ingesta de alimento de aquellas mujeres a las que se les administró la mezcla de hierbas fue significativamente menor respecto de los controles experimentales (Harrold et al., 2013). Por otro lado, en otro estudio clínico realizado por Alkhatib y Atcheson en mujeres con peso corporal normal en el cual se evaluó el efecto de la yerba mate en el apetito, y en los niveles de saciedad posterior a un ejercicio moderado de 30 minutos, se observó que la combinación del ejercicio con la ingesta de yerba mate mejora los niveles de saciedad y apetito en comparación con el grupo control, donde sólo se realizó ejercicio (Alkhatib & Atcheson, 2017).

Teniendo en cuenta los resultados presentados en estudios anteriores y los alcanzados en este estudio, podemos deducir que en las condiciones experimentales analizadas, una exposición aguda a yerba mate no generaría efectos significativos en la disminución de la ingesta de alimento a la hora y dos horas posterior a la administración del alimento. Estos hallazgos son diferentes a lo esperado según investigaciones anteriores, lo que podría deberse a una diferencia entre los efectos que genera el mate entre diferentes modelos biológicos

(humanos y ratas vs. ratones), a que el efecto observado en las ratas y pacientes se deba a la ingesta de las otras hierbas utilizadas en la mezcla, y/o a una diferencia en el diseño experimental, ya que Yimam y col. han encontrado diferencias significativas sólo a partir de las 4 horas posteriores a la administración de alimento. Dado que en este trabajo no hemos notado diferencias significativas entre los tratamientos a la hora y 2 horas posterior a administración de alimento, proponemos extender el periodo de evaluación a 4 y/o más horas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que una exposición crónica a yerba mate preparado mediante el protocolo de *Cebada simulada*, de una duración de 10 semanas, no genera efectos significativos en el peso corporal y en la ingesta de alimento en ratones *salvajes*. Como se pudo observar en la sección de Resultados, el peso corporal y la ingesta de alimento acumulada son aproximadamente iguales para todos los grupos experimentales a lo largo de las semanas de exposición. En un trabajo realizado por Resende y col. en el cual analizaron el efecto de una exposición crónica a un extracto acuoso de yerba mate en el peso corporal de ratas Wistar machos, durante 30 días, no se ha observado ningún efecto significativo sobre el peso corporal en todos los grupos evaluados (Resende et al., 2012). Estos hallazgos concuerdan con un estudio realizado por Silva y col. en ratas Wistar, en el cual no han encontrado diferencias en el aumento del peso corporal ni en el peso corporal al final del tratamiento, así como tampoco en la ingesta de alimento posterior a una exposición a un extracto acuoso de mate de 30 días de duración (Silva et al., 2011). Del mismo modo, en un estudio realizado por Pamplona Mosimann y col. en conejos, donde evaluaron diferencias en el peso corporal y en la ingesta de alimento frente a una exposición a un extracto acuoso de yerba mate durante 8 semanas, tampoco se han observado diferencias significativas entre los grupos experimentales en el peso corporal y en la ingesta de alimento (Pamplona Mosimann et al., 2006). Resultados similares respecto del peso corporal fueron hallados en una investigación realizada por Holovatty y col. donde evaluaron el consumo de mate habitual en personas jóvenes de peso normal (de 18 a 30 años) y su relación con el IMC, concluyendo que el consumo de mate no afecta al IMC, y que por consecuencia no tendría influencia en el peso corporal (Holovatty et al., 2020). Los trabajos mencionados anteriormente permiten entender que los resultados obtenidos en nuestro trabajo en ratones están alineados con los hallados en ratas y seres humanos en los cuales no se han evidenciado diferencias en el peso corporal e ingesta de alimento en exposiciones prologadas a mate. De cualquier modo, los experimentos realizados en ratones *salvajes* nos han permitido poner a punto las técnicas y protocolos que se aplicarán

en el proyecto. Por el contrario, sí se han evidenciado efectos de la yerba mate en el peso corporal y en la ingesta de alimento en ratones de fenotipo obeso y diabético en otros estudios (Ver apartados “1. Introducción” y “6.1 Perspectivas a futuro”). Como se ha mostrado en el apartado de Resultados, hemos comenzado a replicar estos experimentos en ratones obesos (aunque con un número insuficiente de casos para realizar un análisis estadístico) y no hemos observado ninguna tendencia que permita evidenciar que la yerba mate disminuye el peso corporal y la ingesta de alimento en ratones obesos, lo que podría deberse a que estos ratones son carentes de expresión de *Pomc* hipotalámica y que los efectos generados por la yerba mate en el peso corporal y en la ingesta de alimento hallados por estudios previos se deban a que la yerba mate ejerce estos efectos a través de POMC. Para probar esta hipótesis se evaluará la replicación de estos experimentos en ratones obesos con expresión de *Pomc* hipotalámica.

6.1 Perspectivas a futuro

Resultaría interesante analizar los efectos de una exposición crónica a yerba mate en la ingesta de alimento y en el peso corporal en animales *arcPomc*^{-/-} ya que se han observado diferencias significativas en el peso corporal y en la ingesta de alimento en exposiciones prolongadas a mate en otros modelos biológicos de obesidad en estudios previos. Por ejemplo, Resende et. al. han observado diferencias significativas en el peso corporal de ratas Wistar machos obesos inducidos por la dieta, respecto de los animales con una alimentación estándar (Resende et al., 2012). En otro estudio, realizado por Hussein et. al. en un modelo murino de obesidad, diabetes y síndrome metabólico (denominado TSOD) en el cual analizaron los efectos en el metabolismo energético de una exposición crónica de un extracto acuoso de yerba mate, han observado una disminución significativa en el peso corporal y en la ingesta diaria de alimento durante el período de administración. Además se observó que el tratamiento generó una disminución de la hiperglicemia, reduciendo los niveles de glucosa en sangre en ayunas y aumentando la captación de glucosa mejorando de este modo la tolerancia a la glucosa (Hussein et al., 2011). Resultados similares en la disminución del peso corporal y en la ingesta de alimento fueron observados por Pang et. al. en ratas tratadas con una dieta rica en grasas (Pang et al., 2008). Por último, en un estudio realizado por Choi et. al. se ha comprobado que una exposición de 16 semanas a yerba mate ha mejorado la tolerancia a la glucosa en ratas Wistar alimentadas con una dieta rica en grasas, aunque no han encontrado diferencias significativas en los niveles de glucosa en sangre en ayuno (Choi et al., 2017).

Sin embargo, no existe ninguna investigación hasta la fecha que permita conocer el rol de *Pomc* en los efectos metabólicos generados por la yerba mate. Durante este proyecto hemos sentado las bases y comenzado a medir la ingesta de alimento, el peso corporal y la tolerancia a la glucosa en ratones obesos *arcPomc^{-/-}*, a fines de poder dilucidar si la yerba mate puede ejercer sus efectos a través del gen de *Pomc*. Sin embargo, el número de animales analizados es aún insuficiente para sacar conclusiones.

Además de lo mencionado a lo largo de este apartado, resta por analizar a futuro las diferencias entre los pesos de los tejidos adiposos entre los grupos experimentales con el propósito de evaluar diferencias en cuanto a peso de grasa blanca así como también realizar análisis transcripcionales de la proteína 1 desacoplante o *termogenina* en la grasa parda, a fines de analizar los niveles de activación de la termogénesis. Durante este proyecto hemos registrado los pesos de la grasa inguinal, gonadal e hígado y almacenado la grasa parda con este propósito pero aún no se ha alcanzado un número de ratones suficiente para analizar los resultados. Por otro lado, resta por estudiar los niveles de activación de las neuronas de *Pomc* frente a una exposición crónica a mate mediante la inducción de la expresión de C-FOS. Para ello, en este trabajo hemos almacenado cortes histológicos de ratones de genotipo POMC-EGFP tratados mediante el protocolo de exposición crónica a yerba mate, con el fin de realizar inmunohistoquímica para C-FOS y co-localizar con las neuronas de POMC identificadas por su expresión de EGFP, como se ha realizado previamente en el laboratorio para analizar el nivel de activación de las neuronas de POMC en respuesta a una sobrecarga de glucosa (Alsina et al., 2018). Por último, también resultaría interesante analizar a nivel transcripcional la expresión de *Pomc* en el hipotálamo, posterior a una exposición crónica al mate ya que la activación de la neurona de POMC y la inducción de la expresión del gen serían mecanismos independientes. En este trabajo también hemos almacenado los hipotálamos de ratones *salvajes* y *arcPomc^{-/-}* luego de una exposición crónica al mate. De realizarse estos análisis podría profundizarse el conocimiento acerca de los efectos de la yerba mate en la expresión de *Pomc* así como también, conocer los mecanismos mediante el cual el mate genera los efectos mencionados a lo largo de este trabajo. Estos estudios permitirían potencialmente sentar las bases para un tratamiento de la obesidad y la diabetes de tipo 2 utilizando la yerba mate o alguno de sus componentes, mejorando la calidad de vida de los pacientes afectados por estas enfermedades.

7. CONCLUSIÓN

En el presente trabajo logramos demostrar que:

- La exposición aguda a yerba mate no genera efectos en la ingesta de alimento a corto plazo en hembras *salvajes*, al menos en las condiciones experimentales analizadas.
- La exposición crónica a yerba mate no genera efectos en la ingesta de alimento ni tampoco en el peso corporal a mediano plazo en ratones *salvajes*, al menos en las condiciones experimentales analizadas.
- El consumo crónico de yerba mate disminuye la glucemia basal y aumenta la tolerancia a la glucosa en ratones hembra *salvajes*.

8. ALCANCES DEL PROYECTO FINAL

Durante el trabajo de este proyecto final:

- Hemos logrado poner a punto dos preparaciones diferentes de mate.
- Hemos podido determinar los efectos de la yerba mate en la tolerancia a la glucosa en hembras *salvajes*, en la ingesta de alimento frente a una exposición aguda en hembras *salvajes*, y en el peso corporal y en la ingesta de alimento frente a una exposición crónica al mate en ratones *salvajes*.
- Hemos obtenido cortes histológicos de cerebro a fin de analizar la actividad de las neuronas de *Pomc* de ratones de genotipo POMC-EGFP por electrofisiología frente a una exposición crónica a la yerba mate.
- Hemos almacenado el hipotálamo y la grasa parda (*Brown adipose tissue*) de ratones de genotipo *wt* para *Pomc* y *arcPomc*^{-/-} a fines de realizar análisis transcripcionales de expresión de *Pomc* y de la proteína 1 desacoplante (*termogenina*) respectivamente, a futuro.
- Hemos obtenido los pesos del tejido adiposo de ratones *salvajes* y *arcPomc*^{-/-} (particularmente la grasa gonadal, parda, inguinal e hígado) a fines de analizar diferencias entre los tratamientos.
- Hemos sentado las bases y puesto a punto todos los protocolos utilizados en este trabajo para determinar los efectos de la yerba mate en el metabolismo energético en un modelo biológico murino carente de *Pomc* en el núcleo arcuato (*arcPomc*^{-/-}).

BIBLIOGRAFÍA

- Alkhatib, A., & Atcheson, R. (2017). Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) metabolic, satiety, and mood state effects at rest and during prolonged exercise. *Nutrients*, *9*(8). <https://doi.org/10.3390/nu9080882>
- Alsina, R., Trotta, M., & Bumashny, V. F. (2018). Hypothalamic Proopiomelanocortin Is Necessary for Normal Glucose Homeostasis in Female Mice. *Frontiers in Endocrinology*, *9*(SEP). <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00554>
- American Diabetes Association. (2013). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, *36*(SUPPL.1), 67–74. <https://doi.org/10.2337/dc13-S067>
- Bastos, D. H. M., Saldanha, L. A., Catharino, R. R., Sawaya, A. C., Cunha, I. B. S., Carvalho, P. O., & Eberlin, M. N. (2007). Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex*). *Molecules*, *12*, 423–432.
- Berthoud, H. R., Münzberg, H., & Morrison, C. D. (2017). Blaming the Brain for Obesity: Integration of Hedonic and Homeostatic Mechanisms. *Gastroenterology*, *152*(7), 1728–1738. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.12.050>
- Borré, G. L., Kaiser, S., Pavei, C., Da Silva, F. A., Bassani, V. L., & Ortega, G. G. (2010). Comparison of methylxanthine, phenolics and saponin contents in leaves, branches and unripe fruits from *Ilex paraguariensis* A. ST.-hil (mate). *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, *33*(3), 362–374. <https://doi.org/10.1080/10826070903526055>
- Brasceso, O. E., & Corengia, M. A. (2009). Cirugía bariátrica. *Cirugía Digestiva*, *II-272*, 1–20.
- Bray, G. A., Heisel, W. E., Afshin, A., Jensen, M. D., Dietz, W. H., Long, M., Kushner, R. F., Daniels, S. R., Wadden, T. A., Tsai, A. G., Hu, F. B., Jakicic, J. M., Ryan, D. H., Wolfe, B. M., & Inge, T. H. (2018). The science of obesity management: An endocrine society scientific statement. *Endocrine Reviews*, *39*(2), 79–132. <https://doi.org/10.1210/er.2017-00253>
- Bumashny, V. F., Rubinstein, M., Malcolm, J., Yamashita, M., Casas-cordero, R., & Oterocorchón, V. (2012). Obesity-programmed mice are rescued by early genetic intervention Find the latest version: Obesity-programmed mice are rescued by early genetic intervention. *The Journal of Clinical Investigation*, *122*(11), 4203–4212.

<https://doi.org/10.1172/JCI62543.resumed>

- Coll, A. P., Farooqi, I. S., & O’Rahilly, S. (2007). The Hormonal Control of Food Intake. *Cell*, *129*(2), 251–262. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.001>
- Colpo, A. C., Lima, M. E., Da Rosa, H. S., Leal, A. P., Colares, C. C., Zago, A. C., Salgueiro, A. C. F., Bertelli, P. R., Minetto, L., Moura, S., Mendez, A. S. L., & Folmer, V. (2018). Ilex paraguariensis extracts extend the lifespan of Drosophila melanogaster fed a high-fat diet. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *51*(2), 1–11. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20176784>
- Colpo, Ana C., Rosa, H., Lima, M. E., Pazzini, C. E. F., De Camargo, V. B., Bassante, F. E. M., Puntel, R., Ávila, D. S., Mendez, A., & Folmer, V. (2016). Yerba mate (Ilex paraguariensis St. Hill.)-based beverages: How successive extraction influences the extract composition and its capacity to chelate iron and scavenge free radicals. *Food Chemistry*, *209*, 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.059>
- Conceição, E. P. S., Kaezer, A. R., Peixoto-Silva, N., Felzenszwalb, I., De Oliveira, E., Moura, E. G., & Lisboa, P. C. (2017). Effects of Ilex paraguariensis (yerba mate) on the hypothalamic signalling of insulin and leptin and liver dysfunction in adult rats overfed during lactation. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, *8*(1), 123–132. <https://doi.org/10.1017/S2040174416000519>
- Cowley, M. A., Smart, J. L., Rubinstein, M., Cerdán, M. G., Diano, S., Horvath, T. L., Cone, R. D., & Low, M. J. (2001). Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*, *411*(6836), 480–484. <https://doi.org/10.1038/35078085>
- de Resende, P. E., Kaiser, S., Pittol, V., Hoefel, A. L., D’Agostini Silva, R., Vieira Marques, C., Kucharski, L. C., & Ortega, G. G. (2015). Influence of crude extract and bioactive fractions of Ilex paraguariensis A. St. Hil. (yerba mate) on the Wistar rat lipid metabolism. *Journal of Functional Foods*, *15*, 440–451. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.040>
- de Souza, F. S. J., Santangelo, A. M., Bumashny, V., Avale, M. E., Smart, J. L., Low, M. J., & Rubinstein, M. (2005). Identification of Neuronal Enhancers of the Proopiomelanocortin Gene by Transgenic Mouse Analysis and Phylogenetic Footprinting. *Molecular and Cellular Biology*, *25*(8), 3076–3086. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.8.3076-3086.2005>
- Encinosa, W. E., Bernard, D. M., Chen, C. C., & Steiner, C. A. (2006). Healthcare utilization

- and outcomes after bariatric surgery. *Medical Care*, 44(8), 706–712.
<https://doi.org/10.1097/01.mlr.0000220833.89050.ed>
- Grant, R. W., & Dixit, V. D. (2015). Adipose tissue as an immunological organ. *Obesity*, 23(3), 512–518. <https://doi.org/10.1002/oby.21003>
- Hall, J. E., Da Silva, A. A., Do Carmo, J. M., Dubinion, J., Hamza, S., Munusamy, S., Smith, G., & Stec, D. E. (2010). Obesity-induced hypertension: Role of sympathetic nervous system, leptin, and melanocortins. *Journal of Biological Chemistry*, 285(23), 17271–17276. <https://doi.org/10.1074/jbc.R110.113175>
- Harno, E., Ramamoorthy, T. G., Coll, A. P., & White, A. (2018). POMC: The physiological power of hormone processing. *Physiological Reviews*, 98(4), 2381–2430. <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2017>
- Harrold, J. A., Hughes, G. M., O’Shiel, K., Quinn, E., Boyland, E. J., Williams, N. J., & Halford, J. C. G. (2013). Acute effects of a herb extract formulation and inulin fibre on appetite, energy intake and food choice. *Appetite*, 62, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2012.11.018>
- Heck, C. I., & De Mejia, E. G. (2007). Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *Journal of Food Science*, 72(9). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00535.x>
- Heymsfield, S. B., & Wadden, T. A. (2017). Mechanisms, pathophysiology, and management of obesity. *New England Journal of Medicine*, 376(3), 254–266. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1514009>
- Hill, J. W., Elias, C. F., Fukuda, M., Williams, K. W., Berglund, E. D., Holland, W. L., You-ree Cho, Jen-Chieh Chuang, Yong Xu, Michelle Choi, Danielle Lauzon, Charlotte E. Lee, Roberto Coppari, James A. Richardson, Jeffrey M. Zigman, Streamson Chua, Philipp E. Scherer, Bradford B. Lowell, Jens C. Bruning, Elmquist, J. K. (2010). Direct Insulin and Leptin Action on Pro-opiomelanocortin Neurons Is Required for Normal Glucose Homeostasis and Fertility. *Cell Metabolism*, 11(4), 286–297. [doi:10.1016/j.cmet.2010.03.002](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.03.002)
- Holovatty, S. E., Rascón, M. S. C., Ceballos, B. H., & Blanco, M. N. (2020). YERBA MATE CONSUMPTION IN HEALTHY YOUNG PEOPLE. RELATIONSHIP WITH BODY MASS INDEX AND LIPID PROFILE. Actualización En Nutrición. *Revista SAN*, 21(4), 126–131.

- Hussein, G. M. E., Matsuda, H., Nakamura, S., Akiyama, T., Tamura, K., & Yoshikawa, M. (2011). Protective and ameliorative effects of maté (*Ilex paraguariensis*) on metabolic syndrome in TSOD mice. *Phytomedicine*, *19*(1), 88–97. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.06.036>
- INYM. (2019a). *Yerba Mate: ¿dónde se produce?* <https://yerbamateargentina.org.ar/yerba-mate/donde-se-produce/>
- INYM. (2019b). *Yerba Mate en el mundo*. <https://yerbamateargentina.org.ar/yerba-mate/la-yerba-mate-en-el-mundo/>
- Jensen, M. D., Ryan, D. H., Apovian, C. M., Ard, J. D., Comuzzie, A. G., Donato, K. A., Hu, F. B., Hubbard, V. S., Jakicic, J. M., Kushner, R. F., Loria, C. M., Millen, B. E., Nonas, C. A., Pi-Sunyer, F. X., Stevens, J., Stevens, V. J., Wadden, T. A., Wolfe, B. M., & Yanovski, S. Z. (2014). 2013 AHA/ACC/TOS guideline for the management of overweight and obesity in adults: A report of the American College of cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines and the obesity society. *Circulation*, *129*(25 SUPPL. 1), 102–141. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000437739.71477.ee>
- Kang, Y.-R., Hak-Yong Lee, Jung-Hoon Kim, Dea-In Moon, Min-Young Seo, Sang-Hoon Park, Kwang-Ho Choi, Chang-Ryong Kim, Sang-Hyun Kim, Ji-Hyun Oh, Seong-Wan Cho, Sun-Young Kim, Min-Gul Kim, Soo-Wan Chae, Okjin Kim, Hong-Geun Oh. Anti-obesity and anti-diabetic effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Lab. Anim. Res.* *28*, 23–9 (2012).
- Keith, S. W., Redden, D. T., Katzmarzyk, P. T., Boggiano, M. M., Hanlon, E. C., Benca, R. M., Ruden, D., Pietrobelli, A., Barger, J. L., Fontaine, K. R., Wang, C., Aronne, L. J., Wright, S. M., Baskin, M., Dhurandhar, N. V., Lijoi, M. C., Grilo, C. M., DeLuca, M., Westfall, A. O., & Allison, D. B. (2006). Putative contributors to the secular increase in obesity: Exploring the roads less traveled. *International Journal of Obesity*, *30*(11), 1585–1594. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0803326>
- Klein, G. A., Stefanuto, A., Boaventura, B. C. B., De Moraes, E. C., Da Cavalcante, L. S., De Andrade, F., Wazlawik, E., Di Pietro, P. F., Maraschin, M., & Da Silva, E. L. (2011). Mate Tea (*Ilex paraguariensis*) Improves Glycemic and Lipid Profiles of Type 2 Diabetes and Pre-Diabetes Individuals: A Pilot Study. *Journal of the American College of Nutrition*, *30*(5), 320–332. <https://doi.org/10.1080/07315724.2011.10719975>

- Kopelman, P. G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature*, 404(6778), 635–643. <https://doi.org/10.1038/35007508>
- Krude, H., Biebermann, H., Luck, W., Horn, R., Brahant, G., & Grüthers, A. (1999). Severe Early-Onset Obesity, Adrenal Insufficiency and Red Hair Pigmentation Caused by POMC Mutations in Humans. *Clinical Pediatrics*, 38(4), 251–251. <https://doi.org/10.1177/000992289903800416>
- Lamolet, B., Pulichino, A. M., Lamonerie, T., Gauthier, Y., Brue, T., Enjalbert, A., & Drouin, J. (2001). A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell*, 104(6), 849–859. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00282-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00282-3)
- Lamonerie, T., Tremblay, J. J., Lanctôt, C., & Gauthier, Y. (1996). Transcription Factor Involved in Transcription of the. *Genes & Development*, 1284–1295.
- McAllister, E. J., Dhurandhar, N. V., Keith, S. W., Aronne, L. J., Barger, J., Baskin, M., Benca, R. M., Biggio, J., Boggiano, M. M., Eisenmann, J. C., Elobeid, M., Fontaine, K. R., Gluckman, P., Hanlon, E. C., Katzmarzyk, P., Pietrobelli, A., Redden, D. T., Ruden, D. M., Wang, C., ... Allison, D. B. (2009). Ten putative contributors to the obesity epidemic. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(10), 868–913. <https://doi.org/10.1080/10408390903372599>
- National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. (2018). *Treatment for Overweight & Obesity*. <https://www.niddk.nih.gov/health-information/weight-management/adult-overweight-obesity/treatment>
- Pamplona Mosimann, A. L., Wilhelm-Filho, D., & Da Silva, E. L. (2006). Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *BioFactors*, 26(1), 59–70. <https://doi.org/10.1002/biof.5520260106>
- Pang, J., Choi, Y., & Park, T. (2008). *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: Potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476(2), 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.02.019>
- Parton, L. E., Ye, C. P., Coppari, R., Enriori, P. J., Choi, B., Zhang, C.-Y., Chun Xu, Claudia R. Vianna, Nina Balthasar, Charlotte E. Lee, Joel K. Elmquist, Michael A. Cowley, Lowell, B. B. (2007). Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. *Nature*, 449(7159), 228–232. doi:10.1038/nature06098
- Pereira, D. F., Kappel, V. D., Cazarolli, L. H., Boligon, A. A., Athayde, M. L., Guesser, S. M.,

- Da Silva, E. L., & Silva, F. R. M. B. (2012). Influence of the traditional Brazilian drink *Ilex paraguariensis* tea on glucose homeostasis. *Phytomedicine*, *19*(10), 868–877. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.05.008>
- Pomilio, A. B., Trajtemberg, S., & Vitale, A. A. (2002). High-performance capillary electrophoresis analysis of mate infusions prepared from stems and leaves of *Ilex paraguariensis* using automated micellar electrokinetic capillary chromatography. *Phytochemical Analysis*, *13*(4), 235–241. <https://doi.org/10.1002/pca.647>
- Poulin, G., Turgeon, B., & Drouin, J. (1997). NeuroD1/beta2 contributes to cell-specific transcription of the proopiomelanocortin gene. *Molecular and Cellular Biology*, *17*(11), 6673–6682. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.11.6673>
- Resende, P. E. De, Verza, S. G., Kaiser, S., Gomes, L. F., Kucharski, L. C., & Ortega, G. G. (2012). The activity of mate saponins (*Ilex paraguariensis*) in intra-abdominal and epididymal fat, and glucose oxidation in male Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *144*(3), 735–740. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.023>
- Reusch, J. E. B., & Manson, J. A. E. (2017). Management of type 2 diabetes in 2017 getting to goal. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, *317*(10), 1015–1016. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.0241>
- Rocha, D. S., Casagrande, L., Model, J. F. A., dos Santos, J. T., Hoefel, A. L., & Kucharski, L. C. (2018). Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on the metabolism of diabetic rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *105*(May), 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.132>
- Silva, R. D. A., Bueno, A. L. S., Gallon, C. W., Gomes, L. F., Kaiser, S., Pavei, C., Ortega, G. G., Kucharski, L. C., & Jahn, M. P. (2011). The effect of aqueous extract of gross and commercial yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on intra-abdominal and epididymal fat and glucose levels in male Wistar rats. *Fitoterapia*, *82*(6), 818–826. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.04.011>
- Shen, W., Wang, Z. M., Punyanita, M., Lei, J., Sinav, A., Kral, J. G., Imielinska, C., Ross, R., & Heymsfield, S. B. (2003). Adipose tissue quantification by imaging methods: A proposed classification. *Obesity Research*, *11*(1), 5–16. <https://doi.org/10.1038/oby.2003.3>
- Tchkonja, T., Thomou, T., Zhu, Y., Karagiannides, I., Pothoulakis, C., Jensen, M. D., & Kirkland, J. L. (2013). Mechanisms and metabolic implications of regional differences

among fat depots. *Cell Metabolism*, 17(5), 644–656. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.03.008>

Toda, C., Santoro, A., Kim, J. D., & Diano, S. (2017). POMC Neurons: From Birth to Death. *Annual Review of Physiology*, 79(1), 209–236. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034110>

Tribbia, L. T., Gomez, G., Cura, A. C., Rivero, R. C., Bernardi, M. A., Ferrario, J. E., Coronel, B. B., Gershanik, O. S., Gatto, E. M., & Taravini, I. R. (2018). Yerba mate tea and Parkinson’s disease. Neuroprotective effect on dopaminergic neurons in an animal model. *Sociedad Argentina de Neurociencias*.

WHO. (2020). *Obesity and overweight*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>

Willett, W. C., Detz, W. H., & Colditz, G. A. (1999). Guidelines for Healthy Weight. *The New England Journal of Medicine*, 427–434.

Woods, S. C. (2009). The Control of Food Intake: Behavioral versus Molecular Perspectives. *Cell Metabolism*, 9(6), 489–498. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2009.04.007>

Wright, S. M., & Aronne, L. J. (2012). Causes of obesity. *Abdominal Imaging*, 37(5), 730–732. <https://doi.org/10.1007/s00261-012-9862-x>

Yamada, Y., Nakazato, Y., & Ohga, A. (1989). The mode of action of caffeine on catecholamine release from perfused adrenal glands of cat. *British Journal of Pharmacology*, 98(2), 351–356. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1989.tb12603.x>

Yaswen, L., Diehl, N., Brennan, M. B., & Hochgeschwender, U. (1999). Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nature Medicine*, 5(9), 1066–1070. <https://doi.org/10.1038/12506>

Yimam, M., Jiao, P., Hong, M., Brownell, L., Lee, Y. C., Hyun, E. J., Kim, H. J., Kim, T. W., Nam, J. B., Kim, M. R., & Jia, Q. (2016). Appetite Suppression and Antiobesity Effect of a Botanical Composition Composed of *Morus alba*, Yerba mate, and *Magnolia officinalis*. *Journal of Obesity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4670818>

Young, J. I., Otero, V., Cerdán, M. G., Falzone, T. L., Cheng Chan, E., Low, M. J., & Rubinstein, M. (1998). Authentic cell-specific and developmentally regulated expression of pro-opiomelanocortin genomic fragments in hypothalamic and hindbrain neurons of transgenic mice. *Journal of Neuroscience*, 18(17), 6631–6640. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-17-06631.1998>

Zaporozhets, O. A., Krushynska, O. A., Lipkovska, N. A., & Barvinchenko, V. N. (2004). A New Test Method for the Evaluation of Total Antioxidant Activity of Herbal Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(1), 21–25. <https://doi.org/10.1021/jf0343480>

ANEXOS

Anexo 1. Sistema de marcación de ratones utilizado en el bioterio del Grupo de Neurociencia de Sistemas, Instituto de Fisiología y Biofísica “Bernardo Houssay” (CONICET-UBA).

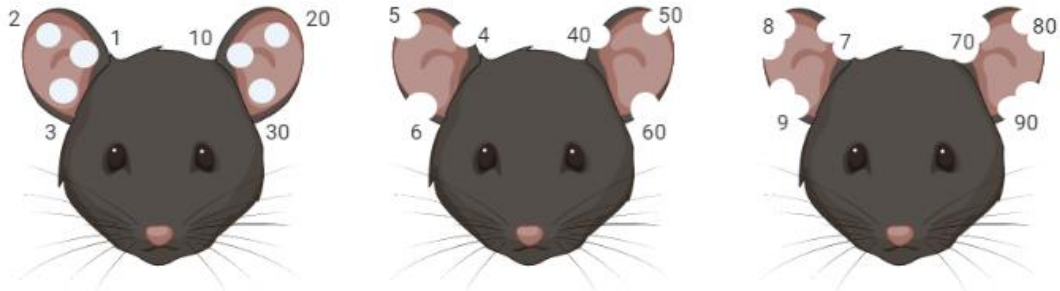
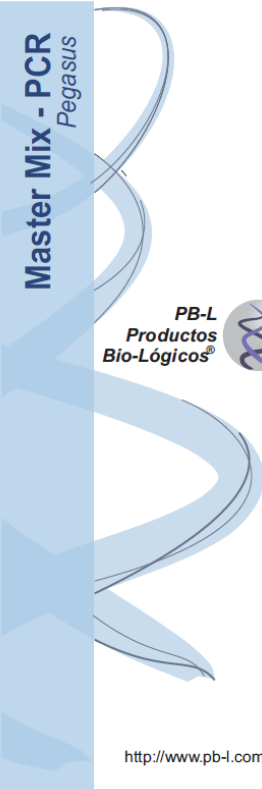


Figura 24. Sistema de marcación de ratones utilizado. Se pueden ver esquematizadas las distintas perforaciones posibles en las orejas de los ratones y sus correspondientes números de identificación asignados, que pueden ser del 1 al 99.

Anexo 2. Ficha técnica de Master Mix – PCR “Pegasus” de *Productos Bio-Lógicos*®.



PB-L
Productos
Bio-Lógicos


<http://www.pb-l.com.ar>

Master mix PCR
Pegasus

CÓDIGO: EA00401 - 1250 µL - 100 REACC. CONCENTRACIÓN: 2X
EA00402 - 6250 µL - 500 REACC. CONCENTRACIÓN: 2X

<p>Descripción</p> <p>Este producto está diseñado para disminuir tiempos en la preparación de la reacción de PCR y evitar contaminaciones en las etapa de pipeteo, permitiendo obtener mayor reproducibilidad en los resultados.</p> <p>La Master mix PCR contiene todos los componentes necesarios para una reacción de PCR. La concentraciones de sus reactivos han sido optimizadas para obtener máxima sensibilidad y especificidad.</p> <p>La mix está lista para agregar los primers y el molde (DNA o cDNA). La adición de Mg solo es necesario en reacciones que utilicen concentración mayor a 1,5mM.</p> <p>Limitaciones de uso</p> <p>Este producto ha sido diseñado, desarrollado y comercializado para su uso exclusivo en el área de investigación. No fue desarrollado para su uso en el área de diagnóstico o desarrollo de drogas, tampoco para su administración en animales o humanos.</p>	<p>Presentación:</p> <p>Master mix PCR-Pegasus</p> <p>1250 ul de mix 2X 6250 ul de mix 2X</p> <p>Agua para PCR:</p> <p>1,5 ml de agua destilada, deproteínada, desionizada, estéril.</p> <p>Características generales</p> <p>Sugerencia de uso</p> <p>Cada reacción debe contener un volumen de master mix PCR (12,5 ul) y un volumen igual de una mezcla de primers y DNA molde (12,5 ul).</p> <p>Conservación</p> <p>Almacenar a -20 °C.</p>	<p>Condiciones de uso</p> <p>Condiciones de reacción estándar:</p> <p>Master mix: 12,5 µl (1Xf) Primers 10 uM: (0,5-1 uM c/u) Molde: 1-5 µl Agua para PCR: _____ Vol. final: 25 µl</p> <p>Condiciones de ciclado estándar:</p> <p>Desnat: 94 °C 5 min. Desnat: 92 °C 15 seg. Anealing: 50-60°C 15 seg. Extensión: 72° 30 seg/500 nt Ciclos: 30-35</p>
---	--	--

Anexo 3. Ficha técnica de marcador de peso molecular *100 bp Plus®* de *Transgen Biotech*.



The **BEST** for
Life Science

100bp Plus DNA Ladder

Cat.No. BM311
Storage: at 2-8°C for six months; at -20°C for two years
Concentration: 0.13 mg/ml

Description
 100bp Plus DNA Ladder is a premixed, ready-to-load molecular weight marker containing eight linear double-stranded DNA fragments. The DNA Ladder is suitable for use as molecular weight standards for agarose gel electrophoresis. The DNA Ladder contains 100 bp -1.5 kb DNA fragments. The 500 bp band (100 ng/5 µl) has doubled intensity than other bands to serve as reference 100 bp-1500 bp.

Highlights

- Ready-to use molecular weight marker for DNA size range of 100 bp to 1.5 bp kb.
- All bands from restriction enzyme digested plasmids.
- Brighter 500 bp reference band

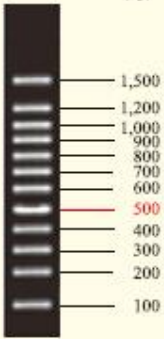
Composition
 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, **500 bp**, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1,000 bp, 1,200 bp, 1,500 bp

Storage Buffer
 10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 10 mM EDTA, 0.02% bromophenol blue, 5% glycerol

Notes

- In general, we recommend to use 1 µl 100bp Plus DNA Ladder per mm of gel lane, or 5 µl per gel lane.
- The 100bp Plus DNA Ladder is not intended for precise quantification of DNA mass but can be used for estimating the molecular weight of linear, double-stranded DNA fragments.
- Do not use the 100bp Plus DNA Ladder with polyacrylamide gels.
- For long term storage, store at -20°C. If stored at -20°C, mix well after thawing.

100bp Plus DNA Ladder (5 µl)
(bp)



2.0% TAE agarose gel stained with GelStain
(loading volume: 5 µl)