

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA**

Camila Scacco Pereira

**Efeitos do chá mate (*Ilex paraguariensis*) na estrutura
óssea de ratas na perimenopausa**

ARAÇATUBA

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA**

Camila Scacco Pereira

**Efeitos do chá mate (*Ilex paraguariensis*) na estrutura
óssea de ratas na perimenopausa**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune

Coorientadora: Profa. Dra. Adriane Belló-Klein

ARAÇATUBA

2015

Catálogo na Publicação (CIP)
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

P436e Pereira, Camila Scacco.
Efeitos do chá mate (*Ilex paraguariensis*) na estrutura óssea de ratas na perimenopausa / Camila Scacco Pereira. - Araçatuba, 2015
96 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune
Coorientadora: Profa. Adriane Belló-Klein

1. *Ilex paraguariensis* 2. Osso e ossos 3. estresse oxidativo
I. T.

CDD 612

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 14.05.1990, Birigui- SP.

Filiação: Tereza de Fátima Scacco Pereira e Francisco Donizete Brás Pereira.

2008/2012: Curso de Graduação em Farmácia - Universidade Estadual de Maringá- UEM.

2013/2015: Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível Mestrado, no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Sociedade Brasileira de Fisiologia - SBFis - na Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP.

DEDICATÓRIA

À minha família, minha base em todos os momentos.

À Deus, pela força para lutar em busca da realização de meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por aumentar minha fé e por me dar forças todos os dias para seguir em frente sempre, mesmo diante dos problemas e momentos difíceis.

Aos meus pais, Francisco e Tereza por serem meus exemplos de vida, pela confiança em mim depositada, pelo zelo, dedicação e amor em todos os momentos. Ao apoio e ajuda principalmente nos momentos mais difíceis, meu amor por vocês é incondicional.

A minha irmã Tatiana, pela amizade, companheirismo e apoio em todos os momentos.

Aos meus familiares pelo apoio e orações.

Aos meus pais de coração Néia e Ismael, sem o apoio de vocês eu não teria concluído a graduação e iniciado a pós-graduação.

Aos meus amigos de todas as horas, Nádia e César, obrigado pelo apoio e por estarem prontos para me auxiliar dando forças nos momentos em que mais precisei.

Aos meus amigos Pablo e Pedro, além da amizade seus conhecimentos em informática foram de grande ajuda, muito obrigado por tudo.

A minha orientadora, professora Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune, pela dedicação, paciência, comprometimento. Seus ensinamentos não formam apenas mestres e sim profissionais preparados para a vida.

A minha coorientadora, professora Adriane Belló-Klein, da UFRGS, pela disposição em ajudar.

Ao professor Antônio Hernandes Chaves Neto, da FOA, pela amizade, ensinamentos e pela disposição em ajudar em todos os momentos.

Ao professor Mário Jefferson Quirino Louzada, da FMVA, pelo auxílio na realização e análise da DMO, pela gentileza em emprestar seu laboratório e seus equipamentos.

Ao professor Edilson Ervolino, da FOA, pelo auxílio na realização e análises das imunoistoquímicas.

Ao professor Marcelo Macedo Crivelini, da FOA, pelo auxílio na realização da histomorfometria, pela gentileza em emprestar seu laboratório e seus equipamentos.

A professora Andréia Machado Leopoldino, e a doutoranda Karina da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, pela ajuda e gentileza em emprestar seu laboratório e equipamentos.

As minhas companheiras de trabalho do Laboratório de Bioquímica, Ariana e Keny, pela amizade, ensinamentos e auxílio durante estes anos, e aos estagiários, Vanessa, Guilherme, Matheus, Estefani pela amizade, companheirismo, ajuda no dia a dia e nos experimentos, sem vocês este trabalho não seria realizado.

Aos meus amigos da FOA, Ângela, Larissa, Camila, Jéssica, Noelle, Giseli e Marcelinho que tanto me ajudaram durante a pós-graduação, dizer muito obrigado é pouco perto de tudo que vocês fizeram por mim.

A todos os colegas do departamento de Ciências Básicas - FOA/UNESP pela assistência diária.

A todos os docentes do departamento de Ciências Básicas da FOA/UNESP, pelos ensinamentos e pela gentileza em emprestar equipamentos.

Aos funcionários da biblioteca da FOA, Ana Cláudia, Ana Paula, Maria Cláudia, Luís e Denise pela colaboração.

A todos os funcionários do Biotério Central, Arnaldo, Camilo, João, Alan, pela disposição em me ajudar.

A UNESP (Universidade Estadual Paulista —Júliode Mesquita Filho”) pela oportunidade da realização deste curso de pós-graduação.

“É exatamente disso que a vida é feita, momentos. Momentos que temos que passar, sendo bons ou não, para o nosso próprio aprendizado. Nunca esquecendo o mais importante: Nada nessa vida é por acaso. Absolutamente nada! Por isso temos que nos preocupar em fazer a nossa parte, da melhor forma possível”.

Chico Xavier

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

PEREIRA, C.S. **Efeitos do chá mate (*Ilex paraguariensis*) na estrutura óssea de ratas na perimenopausa.** 95f - Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Departamento de Ciências Básicas, Laboratório de Fisiologia - Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas-SBFIS. Araçatuba - 2015.

RESUMO

Perimenopausa é um período marcado pela redução da densidade mineral óssea areal (aDMO) associada com um aumento do estresse oxidativo, e antioxidantes naturais têm sido utilizados como uma alternativa para reverter esta situação. Neste contexto, o presente estudo foi realizado com o objetivo de investigar os efeitos do chá mate (CM) (*Ilex paraguariensis*), uma bebida com alta capacidade antioxidante, no osso de ratas naturalmente perimenopausadas. Ratas Wistar perimenopausadas foram tratadas com CM na dose de 20 mg/kg de massa corpórea (m.c) durante quatro semanas e foram comparadas ao grupo não tratado. Grupo de ratas adultas foi investigado também, para confirmar os efeitos da perimenopausa. A atividade das enzimas fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e fosfatase alcalina (FAL) foram investigados no plasma. Densidade mineral óssea areal (aDMO), área ocupada pelos adipócitos (AOA), número de osteócitos (N.Ot), volume ósseo trabecular (VTO) e imuno-histoquímica para superóxido dismutase (SOD2), osteoprotegerina (OPG), TRAP e ligante do receptor ativador do fator nuclear- κ B (RANKL) foram avaliados no colo femoral. Peroxidação lipídica (MDA) e atividade da SOD foram determinadas em homogenato ósseo. O tratamento com CM foi capaz de atenuar a redução da aDMO, melhorar AOA, N.Ot e VTO. Estes resultados foram seguidos de redução de TRAP e de ALP no plasma e de MDA e SOD2 no osso. O CM minimiza o estresse oxidativo e a reabsorção óssea, atenuando assim a osteopenia de ratas na perimenopausa.

Palavras-chave = *Ilex paraguariensis*, perimenopausa, osso, estresse oxidativo

PEREIRA, C.S. **Effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) in the bone structure of perimenopausal rats.** 95f - Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Departamento de Ciências Básicas, Laboratório de Fisiologia - Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas-SBFIS. Araçatuba - 2015.

ABSTRACT

Perimenopause is a period marked by a reduction in areal bone mineral density (aBMD) associated with increased oxidative stress, and natural antioxidants have been used as an alternative to reverse this situation. In this context, the present study was to investigate the effects of mate tea (MT) (*Ilex paraguariensis*), a drink with high antioxidant capacity in the bone naturally perimenopausal rats. Perimenopausal Wistar rats were treated with MC at a dose of 20 mg / kg body mass (mc) for four weeks and compared with the untreated group. Group of adult rats was also investigated to confirm the effects of perimenopause. The activity of the enzyme tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) and alkaline phosphatase (ALP) were investigated in plasma. Areal bone mineral density (aBMD) area occupied by adipocytes (AOA), number of osteocytes (N.Ot), trabecular bone volume (TBV) and immunohistochemistry for superoxide dismutase (SOD2), osteoprotegerin (OPG), TRAP and binder the receptor activator of the nuclear factor-kB (RANKL) were evaluated at the femoral neck. Lipid peroxidation (MDA) and SOD activity were determined in bone homogenates. Treatment with MT was able to attenuate the reduction of aBMD improve AOA N.Ot and TBV. These findings were followed by reduction of TRAP and ALP and plasma MDA and SOD2 in the bone. The MT minimizes oxidative stress and bone resorption, thereby attenuating the osteopenia of perimenopausal rats.

Key words= *Ilex paraguariensis*, perimenopause, bone, oxidative stress

ABREVIATURAS

aDMO= densidade mineral óssea areal

AE= atividade enzimática

AOA= área ocupada por adipócitos

BM-MSC= células tronco mesenquimais derivadas da medula

CAT= catalase

CM= chá mate

DNA=ácido desoxirribonucleico

Cu-Zn-SOD = superóxido dismutase dependente de cobre e zinco

EO = estresse oxidativo

ERO = espécies reativas de oxigênio

FAL= fosfatase alcalina

Fe²⁺ = íon ferroso

Fe³⁺ = íon férrico

FRAP = *Ferric Reducing Antioxidant Power*

FSH= hormônio folículo estimulante

H⁺= hidrogênio

GPx = glutathione peroxidase

H₂O₂ = peróxido de hidrogênio

HCl = ácido clorídrico

KCl= cloreto de potássio

LH= hormônio luteinizante

m.c. = massa corpórea

M-CSF= fator estimulante da colônia de macrófagos

MDA = malonaldeído

MgCl₂= cloreto de magnésio

MgSO₄ = sulfato de magnésio

Mn-SOD = superóxido dismutase dependente de magnésio

MS = espectroscopia de massa

MSn = espectroscopia de massa em múltiplos estágios

N₂ = nitrogênio gasoso

Na₂CO₃ = carbonato de sódio

NaCl = cloreto de sódio

NADH= nicotinamida adenina dinucleotídeo na forma reduzida
NADPH= nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato na forma reduzida
NaOH= hidróxido de sódio
NF- κ B= fator nuclear de transcrição kappa-B
N.Ot = número de osteócitos
O₂ = oxigênio molecular
O₂⁻ = ânion superóxido
OH• = radical hidroxila
OPG= osteoprotegerina
pNPP= *p*-nitrofenil fosfato
RANK= receptor ativador do fator nuclear-kB
RANKL= ligante do receptor ativador do fator nuclear-kB
rpm = rotações por minuto
SOD = superóxido dismutase
SOD2 = superóxido dismutase do tipo 2
TBA = ácido tiobarbitúrico
TBARS = substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA = ácido tricloroacético
TPTZ = 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina
TRAP= fosfatase ácida resistente ao tartarato
UE= unidade enzimática
VTO= volume trabecular ósseo
Zn = zinco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Grupos experimentais, acompanhamento do ciclo estral e tratamento das fêmeas adultas (AD), perimenopausadas (PM) e perimenopausadas tratadas com chá mate (PM+CM).

Figura 2-Corte longitudinal ao longo da cabeça do fêmur. Adaptado de WRONSKY, SHEN (1997).

Figura 3-Duração do ciclo estral de ratas adultas (AD), perimenopausadas (PM) e perimenopausadas tratadas com chá mate (PM+CM). Os valores foram expressos como média \pm erro padrão, n = 12/grupo. *Quando comparado PM com AD. Teste t *Student*. Nível de significância: 5%.

Figura 4-Densidade mineral óssea areal (aDMO-g/cm²) de ratas adultas (AD), perimenopausadas (PM) e perimenopausadas tratadas com chá mate (PM+CM). Os valores foram expressos como média \pm erro padrão, n = 6/grupo. *Quando comparado PM com AD, #quando comparado PM+CM com PM. Teste t *Student*. Nível de significância: 5%.

Figura 5-Histomorfometria bidimensional do colo femoral de ratas adultas (AD), perimenopausadas (PM), perimenopausadas tratadas com chá mate (PM+CM). Coloração do osso trabecular no colo do fêmur por Hematoxilina eosina (5A), Número de osteócitos (N.Ot) (5B), volume trabecular ósseo (VTO) (5C) e a área ocupada pelos adipócitos (AOA) (5D). Ampliação original: 40x. Barras de escala: 8 μ M. Valores nos

gráficos expressos como média \pm erro padrão, n = 12 grupo. *Quando comparado PM com AD; #quando comparado PM+CM com PM. Teste t *Student*. Nível de significância: 5%.

Figura 6- Padrão de imunomarcção para TRAP (A, B, C), RANKL (D, E, F) e OPG (G, H, I) no colo femoral do grupo adulto (AD) (A, D e G), perimenopausada (PM) (B, C e H) e perimenopausada tratada com chá mate (PM + CM) (C, F e I). Tecido ósseo (TO); setas indicam células imunorreativas. Ampliação original: A-C: 400x; D-E, 200x. Barras de escala: A-C, 80 μ m; D-I, 160 μ m. Contracoloração: hematoxilina de Harris.

Figura 7- Capacidade antioxidante plasmática (FRAP-nmol/L) de ratas adultas (AD), perimenopausadas (PM) e perimenopausadas tratadas com chá mate (PM+CM). Os valores foram expressos como média \pm erro padrão, n = 12/grupo. *Quando comparado PM com AD, #quando comparado PM+CM com PM. Teste t *Student*. Nível de significância: 5%.

Figura 8-(A) superóxido dismutase (SOD) e (B) níveis de malonaldeído (MDA) em homogenato de fêmur de ratas adultas (AD), perimenopausadas (PM) e perimenopausadas tratadas com chá mate (PM+CM). Os valores foram expressos como média \pm erro padrão, n = 6/grupo. *Quando comparado PM com AD, #quando comparado PM+CM com PM. Teste t *Student*. Nível de significância: 5%.

Figura 9-Fotomicrofotografias que mostram o padrão de imunomarcção para SOD2 no osso trabeculado do colo

do fêmur de ratas adultas (AD), perimenopausadas (PM) e perimenopausadas tratadas com chá mate (PM+CM). Padrão de imunomarcção para SOD2 no colo femoral do grupo AD, PM e PM+ CM; setas indicam células imunorreativas. Ampliação original: 100X. Barras de escala:20 um. Contracoloração: Hematoxilina de Meyer

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-Consumo de ração (g/animal/dia), de água (mL/animal/dia) e massa corpórea de ratas adultas (AD), perimenopausadas (PM) e perimenopausadas tratadas com chá mate (PM+CM). Os valores foram expressos como média \pm erro padrão, n = 12/grupo. Teste t *Student*. Nível de significância: 5%.

Tabela 2- TRAP (UE / mg de proteína) e FAL (UE/mg proteína) em ratas adultas (AD), perimenopausadas (PM), perimenopausadas tratadas com chá mate (PM+CM). Os valores foram expressos como média \pm erro padrão, n = 12/grupo. *Quando comparado PM com AD, #quando comparado PM+CM com PM. Teste t *Student*. Nível de significância: 5%.

Tabela 3- TRAP, RANKL, OPG e SOD2 em ratas adultas (AD), perimenopausadas (PM), perimenopausadas tratadas com chá mate (PM+CM). Os valores foram expressos em mediana e primeiro e terceiro quartil, n = 12/grupo. *Quando comparado PM com AD, #quando comparado PM+CM com PM. Teste de Mann-Whitney. Nível de significância: 5%.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivos gerais.....	22
2.2 Objetivos específicos	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 Comitê de ética em experimentação animal.....	23
3.2 Preparo e análises no chá mate.....	24
3.2.1 Conteúdo total de polifenóis do chá mate.....	24
3.2.2 Capacidade antioxidante total do chá mate (método FRAP).....	24
3.2.3 Espectrometria de massa do chá mate.....	24
3.3 Animais e modelo experimental	25
3.4 Análises no plasma sanguíneo.....	27
3.4.1 Obtenção do plasma	27
3.4.2 Capacidade antioxidante plasmática (método FRAP)	27
3.4.3 Atividade de fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP).....	27
3.4.4 Atividade de fosfatase alcalina (FAL)	27
3.5 Análises da estrutura óssea	27
3.5.1 Preparo ósseo	29
3.5.2 Análise histológica.....	29
3.5.3 Imunoistoquímica	29
3.5.4 Densitometria óssea areal (aDMO)	31
3.6 Análises no homogenato de osso.....	32
3.6.1 Preparo do homogenato do osso.....	32
3.6.2 Determinação de malonaldeído (MDA)	33
3.6.3 Atividade de superóxido dismutase (SOD).....	33
3.7 Determinação da concentração de proteínas.....	33
3.8 Análise estatística.....	33
4. RESULTADOS	34
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÃO.....	46

7. REFERÊNCIAS.....	47
ANEXOS	62

1. INTRODUÇÃO

A menopausa natural é caracterizada pela cessação permanente da atividade folicular ovariana e conseqüente amenorreia, por período superior a 12 meses, na ausência de indução cirúrgica ou hormonal (MISHRA, KUH, 2011). Elevadas concentrações plasmáticas dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), reduzidas concentrações de estrógeno e progesterona marcam esse período (SOULES et al., 2001; DJAHANBAKHCH et al., 2007), que ocorre normalmente entre os 45-55 anos de idade (SULLIVAN et al., 2015). As alterações hormonais que acompanham a menopausa, principalmente as reduções de estrógeno e progesterona, podem impactar de forma negativa na vida da mulher, resultando no desenvolvimento de resistência à ação da insulina, síndrome metabólica e conseqüentemente maior risco de doenças cardiovasculares (DJAHANBAKHCH et al., 2007), além de redução da massa óssea e osteoporose (MISHRA, KUH, 2011).

A perimenopausa é o período que precede a menopausa, e tem início anos antes da última menstruação (VICTORIN et al., 2013). Esse período, considerado uma fase de transição para o final da vida reprodutiva, é marcado por progressivo declínio nas concentrações de estradiol e flutuações nos níveis de FSH (SOULES et al., 2001), que parecem ser as responsáveis pelas alterações somatovegetativas e psicossociais comuns nessa fase da vida, como mudanças de humor, suores noturnos, palpitações, nervosismo, depressão, distúrbios do sono, secura vaginal e dificuldades sexuais (THURSTON, JOFFE, 2011; ZITŇANOVÁ et al., 2011). Além disso, assim como na menopausa, já ocorre nessa fase uma maior predisposição para doenças cardiovasculares (GAST et al., 2011; WOODARD et al., 2011), acentuada perda de massa óssea e osteoporose (GALLAGHER et al., 2008).

A osteoporose é uma doença degenerativa do esqueleto, caracterizada por redução da massa óssea, ou osteopenia, deterioração da microarquitetura e maior predisposição às fraturas (JAMA, 2001). Dentre as fraturas ocasionadas pela fragilidade óssea, as de quadril são consideradas as mais graves, comprometendo muitas vezes a capacidade de realizar atividades diárias, reduzindo a qualidade de

vida e aumentando o risco de comorbidades (HOLROYD et al., 2008). Atualmente, com o envelhecimento da população mundial e o aumento da expectativa de vida, a osteoporose surge como um grave problema de saúde pública em muitos países (HOLROYD et al., 2008; BOONEN et al., 2008). Nos Estados Unidos, estima-se que em 2020 haverá 0,61 milhões de mulheres e homens com idades acima dos 50 anos afetadas pela osteoporose (BOONEN et al., 2008). Em 2025, o custo das despesas relacionadas com a osteoporose nesse país deve aumentar para 25,3 bilhões de dólares (BURGE et al., 2007). No Brasil, uma a cada quatro mulheres com mais de 50 anos desenvolve a doença, e a cada ano ocorrem cerca de 2,4 milhões de fraturas decorrentes da osteoporose, sendo que 200 mil pessoas morrem ao ano, em decorrência destas fraturas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA, 2014).

Modificações na massa óssea resultam de alterações no ciclo de remodelação do osso, um tecido conectivo especializado formado principalmente por osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e matriz extracelular calcificada (DATTA et al., 2008). A remodelação é um processo fisiológico constante, que mantém a integridade do esqueleto por meio da remoção de osso já existente e substituição por uma nova matriz mineralizada. Esse processo tem início quando células do tecido hematopoiético, precursoras dos osteoclastos, são recrutadas e guiadas para a superfície do osso que será reabsorvida. Essas células fundem-se e dão origem aos osteoclastos multinucleados, que secretam enzimas hidrolíticas que degradarão a matriz orgânica rica em colágeno (HENRIKSEN, 2011; RUCCI, 2008). Uma das enzimas secretadas pelos osteoclastos é a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), um marcador da reabsorção óssea que reflete o número de osteoclastos (BLUMSOHN, EASTELL, 1997). O processo de remodelação prossegue, com a ação de células mononucleadas da linhagem de macrófagos e monócitos, que serão responsáveis por preparar a superfície na qual os osteoblastos vão se aderir para iniciar a formação da nova matriz óssea, já os osteoblastos originam-se de células tronco mesenquimais derivadas da medula (BM-MSC), que podem se diferenciar também em adipócitos (BOYCE et al, 2012). Quando maduros, os osteoblastos sintetizam e secretam colágeno tipo I, que representa a maior parte da matriz orgânica óssea extracelular, completando assim a cavidade formada na reabsorção. Além de colágeno, proteínas não colagenosas que participam da regulação da atividade de células ósseas, do controle da

deposição mineral, da manutenção da força, estabilidade e integridade da estrutura, são produzidas por essas células (ROSENBERG, 2012). Uma proteína com atividade enzimática secretada pelos osteoblastos, a fosfatase alcalina, é um dos biomarcadores sanguíneos mais utilizados do processo de formação óssea (REAME, 1997; SANTORO et al., 1996).

Além dos osteoclastos e dos osteoblastos, a remodelação envolve também os osteócitos, que têm papel central na manutenção da estrutura óssea (ZHAO et al., 2002). Essas células são formadas quando os osteoblastos são envolvidos pela matriz por eles produzida e constituem mais de 90% das células ósseas (KNOTHE-TATE, 2004). Os osteócitos ficam dispersos na matriz e comunicam-se entre si, e com outras células, por meio de prolongamentos dendríticos localizados dentro dos canálculos de lacunas (KAMIOKA et al., 2001; ZHAO et al., 2002).

O processo de remodelação é modulado por diferentes citocinas, dentre as quais destacam-se o fator estimulante da colônia de macrófagos (M-CSF), que é essencial para proliferação das células progenitoras dos osteoclastos e o ligante do receptor ativador do fator nuclear- κ B (RANKL). RANKL é uma proteína transmembrânica expressa por osteoblastos, que se liga ao receptor ativador do fator nuclear- κ B (RANK) presente na superfície de precursores de osteoclastos e de osteoclastos maduros, estimulando a diferenciação e a ativação de osteoclastos, e inibindo a apoptose dessas células. Participa também do controle desse processo a osteoprotegerina (OPG), uma proteína solúvel expressa por osteoblastos, que se liga com elevada afinidade a RANKL, bloqueando sua ligação a RANK e regulando negativamente a população funcional de osteoclastos e a osteoclastogênese (BURGESS et al., 1999; SCHOPPET et al., 2002). Dessa forma, a manutenção da massa óssea é influenciada pelo cociente OPG/RANKL (AMADEI et al., 2006) e modificações do mesmo têm sido demonstradas no envelhecimento (PORTAL NÚÑEZ et al., 2012), na menopausa e na pós-menopausa (RAHNAMA et al., 2012; XU et al., 2013).

A remodelação óssea na perimenopausa e na pós-menopausa ocorre com a reabsorção óssea sendo privilegiada em detrimento à formação, o que resulta em redução do volume trabecular ósseo (VTO) e do número de osteócitos (N.Ot). Além disso, em mulheres com osteoporose uma maior diferenciação das BM-MSCs em adipócitos, e conseqüentemente menor formação de osteoblastos, tem sido descrita (PINO et al., 2010). Todas essas alterações contribuem para a redução da

densidade de massa óssea (DMO), aumento da fragilidade da estrutura e do risco de fraturas (WHO, 1996).

A osteoporose na pós-menopausa está relacionada ao estresse oxidativo e a uma redução da defesa antioxidante (ALTINDAG et al., 2008; NIKI et al., 2005) e na perimenopausa um aumento do estresse oxidativo tem sido demonstrado (KOLESNIKOVA et al., 2015). O estresse oxidativo é um processo dinâmico ocasionado por uma alteração do estado redox, com prevalência do estado oxidativo e pode ser causado por uma maior formação de espécies reativas de oxigênio e/ou redução das defesas antioxidantes (BERRA et al., 2006; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ et al., 2007). A persistência desse estado oxidativo pode levar a danos nos sistemas biológicos e morte celular (SCHRINER et al., 2005; BARREIROS et al., 2006; GALLI et al., 2011).

Espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas durante o metabolismo celular normal, como produtos secundários da redução do oxigênio molecular (O_2). São espécies altamente reativas e instáveis, classificadas em radiculares, quando possuem elétrons desemparelhados nos orbitais externos, ou não radiculares, quando apresentam elevada facilidade de prover a troca de elétrons (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é o primeiro intermediário na redução monovalente do O_2 até água na mitocôndria, onde pode também ser originado na oxidação da semiquinona, com ou sem a participação de NADH desidrogenase. No retículo endoplasmático, essa espécie radicalar pode ser formada a partir da citocromo P_{450} e a partir da flavoproteína NADPH-citocromo P_{450} redutase. No citosol a formação de $O_2^{\cdot-}$ é dependente da xantina oxidase (BELLÓ-KLEIN, 2002). Por dismutação do $O_2^{\cdot-}$ ocorre a formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos peroxissomos, mitocôndrias e membranas celulares. Essa espécie não radicalar transpõe membranas com facilidade podendo alterar a expressão gênica e também causar danos ao DNA (STEINBECK et al., 1994). Embora potencialmente nocivo o H_2O_2 participa como segundo mensageiro, da ativação do fator nuclear de transcrição kappa-B (NF- κ B), importante mediador de processos inflamatórios (SIES et al., 2014). Por reação do H_2O_2 com metais de transição forma-se o radical hidroxila (OH^{\cdot}), a mais deletéria das ERO (VASCONCELOS et al., 2007). O OH^{\cdot} tem meia vida curta, mas elevada capacidade de atacar a cadeia lateral de diversos aminoácidos e proteínas, por meio da inclusão de um radical ou remoção de H^+ (BARREIROS, DAVID, 2006), o

que resulta em perda da atividade enzimática e morte celular (FERREIRA, MATSUBARA, 1997). Esse radical é considerado a principal espécie iniciadora do processo de peroxidação lipídica, que está relacionado ao envelhecimento, ao surgimento do câncer e ao aumento da toxicidade de xenobióticos (SHAN et al., 1990). O aumento das ERO estimula a diferenciação de osteoclastos e a reabsorção óssea (LEAN et al., 2013; FRASER et al., 1996), por modular positivamente a expressão de RANKL. Além disso, a apoptose de osteoblastos e osteócitos é aumentada frente ao excesso dessas espécies (BAI et al., 2004).

A defesa antioxidante é composta por enzimas, moléculas endógenas como glutathiona (GSH) e ácido úrico, e por substâncias que podem ser obtidas a partir da dieta, como ácido ascórbico, β -carotenos, tocoferóis e flavonoides (VERGANI et al., 2004). Dentre as enzimas antioxidantes, a superóxido dismutase - EC 1.15.1.1 (SOD) compreende metaloenzimas que catalisam a dismutação do $O_2^{\cdot -}$ a H_2O_2 , (BOWLER et al, 1992), atuando assim como a primeira linha de defesa contra ERO. A expressão de isoforma dependente de manganês (Mn-SOD, SOD2) é induzida pelo estresse oxidativo (DENG et al., 2011) e tem se mostrado elevada em mulheres com redução da DMO e com osteoporose (DENG et al., 2011; GUO et al., 2015). O H_2O_2 gerado por ação da SOD pode ser degradado pela enzima glutathiona peroxidase (GPx) ou pela catalase (CAT). A GPx (EC 1.11.1.9) tem como grupo prostético o selênio, e também atua na degradação de hidroperóxidos produzidos a partir da oxidação de lipídeos de membranas (NIKI et al., 2005). No plasma, redução da atividade dessa enzima tem sido relatada na pós-menopausa (SONTAKKE, TARE, 2002; MAGGIO et al., 2003; NIKI et al., 2005). Em osteoblastos, menor expressão de GPx interfere na função dos osteoblastos aumentando a perda óssea e a osteoporose (DREHER et al., 1998). A CAT (EC 1.11.1.6) por sua vez é uma heme proteína presente principalmente no peroxissomo, principal organela responsável pela desintoxicação celular (VASCONCELOS et al., 2007).

A prevalência do estado oxidante que caracteriza o estresse oxidativo pode resultar em danos aos lipídeos, carboidratos, proteínas e DNA, alterando vias de sinalização, transcrição (FONCEA et al., 2000), o controle da proliferação celular e da apoptose (SCHRINER et al., 2005; BARREIROS et al., 2006; GALLI et al., 2011). O ataque de ERO aos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares dá início a uma sequência de reações, formando radicais lipídicos, que

por decomposição originam aldeídos altamente tóxicos, que alteram a função e permeabilidade seletiva das membranas e interagem de forma negativa com fatores osteogênicos (BRODEUR et al., 2008; HUANG et al., 2007). Além disso, os produtos da peroxidação lipídica estimulam a proliferação de células adiposas na medula óssea e conseqüentemente a osteopenia (BRODEUR et al., 2008; HUANG et al., 2007). O malonaldeído (MDA) é um dos aldeídos que resultam da peroxidação lipídica, e um dos parâmetros mais utilizados para a comprovação da prevalência do estado oxidante (FERREIRA, MATSUBARA, 1997). O acúmulo de MDA contribui para a osteopenia, por privilegiar a reabsorção óssea (HUANG et al., 2007). Aumento das concentrações de MDA tem sido demonstrado no sangue de mulheres na perimenopausa e pós-menopausa (OGUNRO et al., 2014).

Uma vez que o estresse oxidativo tem papel central na redução da DMO e na osteoporose, e que de acordo com Halliwell (2004) —“as defesas antioxidantes são inadequadas em prevenir por completo danos oxidativos”, alguns produtos naturais com atividade antioxidante vêm sendo testados e utilizados, para minimizar a perda óssea. Dentre os mais estudados encontra-se o chá verde, preparado a partir da *Camellia sinensis*. Diversos estudos comprovam que esse chá melhora a qualidade óssea de fêmeas e machos senis (SHEN et al., 2011; SHEN et al., 2013). O chá mate (CM) produzido por infusão da erva mate (*Ilex paraguariensis*), bebida altamente consumida em algumas regiões da América do Sul (FILIP et al., 2000) mostrou-se eficaz em aumentar a DMO de mulheres na pós-menopausa, quando consumido cronicamente (CONFORTI et al., 2012). A capacidade do CM em reduzir os danos lipídicos em outros tecidos é bem conhecida e atribuída não só a capacidade de neutralizar ERO *in vivo* e *in vitro* (Da SILVA et al., 2008, SCHINELLA et al., 2000 MATSUMOTO et al, 2009; PERALTA et al, 2012), como também à indução da expressão gênica de enzimas antioxidantes (YEH, YEN, 2006). Trabalhos recentes de nosso laboratório demonstraram que o CM reduz o estresse oxidativo em hemácias, fígado e pâncreas de ratas fêmeas naturalmente perimenopausadas, tratadas por duas, quatro, seis (TIRAPELI, 2014) e oito semanas (PEREIRA, 2013), porém não haviam sido investigados ainda os efeitos na estrutura óssea.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito do tratamento com CM durante quatro semanas na estrutura óssea de ratas naturalmente perimenopausadas.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar no plasma de fêmeas perimenopausadas, após o tratamento com CM na dose de 20 mg/kg de m.c, durante quatro semanas, a capacidade antioxidante e as atividades das enzimas fosfatase ácida resistente ao tartarato e fosfatase alcalina (FAL), marcadoras do metabolismo ósseo;
- Avaliar se o tratamento com CM foi capaz de reduzir o dano oxidativo aos lipídeos, por meio da determinação da MDA no fêmur das ratas;
- Verificar as alterações na atividade da enzima SOD no osso, durante a perimenopausa e também após o tratamento com CM;
- Investigar a capacidade do CM em reverter a perda de DMO, bem como as alterações estruturais, por meio da densitometria óssea e de avaliações bidimensionais do N.Ot, VTO e área ocupada por adipócito (AOA);
- Analisar, por meio da imunomarcção no fêmur das ratas, os marcadores do metabolismo ósseo TRAP, FAL, OPG/RANKL, assim como a enzima antioxidante SOD2.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Foi realizado um estudo observacional transversal para comparar a qualidade óssea de ratas naturalmente perimenopausadas tratadas ou não com CM. Este estudo foi realizado de acordo com as recomendações descritas no Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do National Institutes of Health. O Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP Universidade Estadual de São Paulo aprovou o protocolo experimental (número de permissão: 00462-2013). Os ratos foram anestesiados

com pentobarbital de sódio intraperitoneal (50 mg / kg de peso corporal) e sacrificados por exsanguinação através da punção cardíaca no final do experimento, foram realizados todos os esforços para minimizar o sofrimento dos animais.

3.2 Preparo e análises no CM

O chá em pó instantâneo (Leão Jr. ®, Curitiba, PR, Brasil) foi obtido em supermercado local e o mesmo lote (7891098000088) foi utilizado durante todo o experimento. O CM foi preparado em água deionizada (0,05 g/mL) à temperatura ambiente (MARTINS et al., 2009) para determinação subsequente dos polifenóis totais e da capacidade antioxidante.

Para o tratamento dos animais o CM foi preparado diariamente por dissolução do pó instantâneo em água deionizada na concentração de 8 mg/mL (PEREIRA, 2013; TIRAPELI, 2014), com auxílio de homogeneizador (MARTINS et al., 2009) imediatamente antes da administração.

3.2.1 Conteúdo total de polifenóis do CM

O conteúdo total de polifenóis do CM foi estimado utilizando o método de Folin-Ciocalteu, conforme Taga et al., (1984). A uma solução de Na₂CO₃ a 2% (m/v) foram adicionados 20 µL do CM e após 2 minutos, o reagente de Folin Ciocauteu 1:1 (v/v). O período de incubação foi de 30 minutos e a absorvância foi determinada em 750 nm (leitorna Power Wave 340, Biotek). A concentração total de polifenóis foi expressa em mg/g de pó instantâneo, utilizando uma curva padrão de ácido clorogênico.

3.2.2 Capacidade antioxidante total do CM (método FRAP)

O método FRAP quantifica o poder antioxidante redutor total, baseado na redução do complexo Fe³⁺-TPTZ (2,4,6-Tripyridil-s-triazine), de cor amarelada. Esse complexo na presença de um antioxidante origina Fe²⁺-TPTZ, de coloração azul intensa. A reação ocorre em baixo valor de pH (3,6), com o intuito de manter a solubilidade do ferro e pode ser monitorada em comprimento de onda de 595 nm

(BENZIE, STRAIN, 1996). Para a avaliação da FRAP do CM uma alíquota da amostra (18 µL) foi adicionada ao meio contendo tampão acetato (300 mmol/L, pH 3,6), TPTZ (10 mmol/L) em HCl (40 mmol/L) e FeCl₃.6H₂O (20 mmol/L) (10:1:1, respectivamente). As leituras das absorvâncias foram feitas em leitora Power Wave 340, Biotek e os resultados expressos em nmol/L, utilizando-se curva padrão de sulfato ferroso.

3.3 Seleção dos animais e grupos experimentais

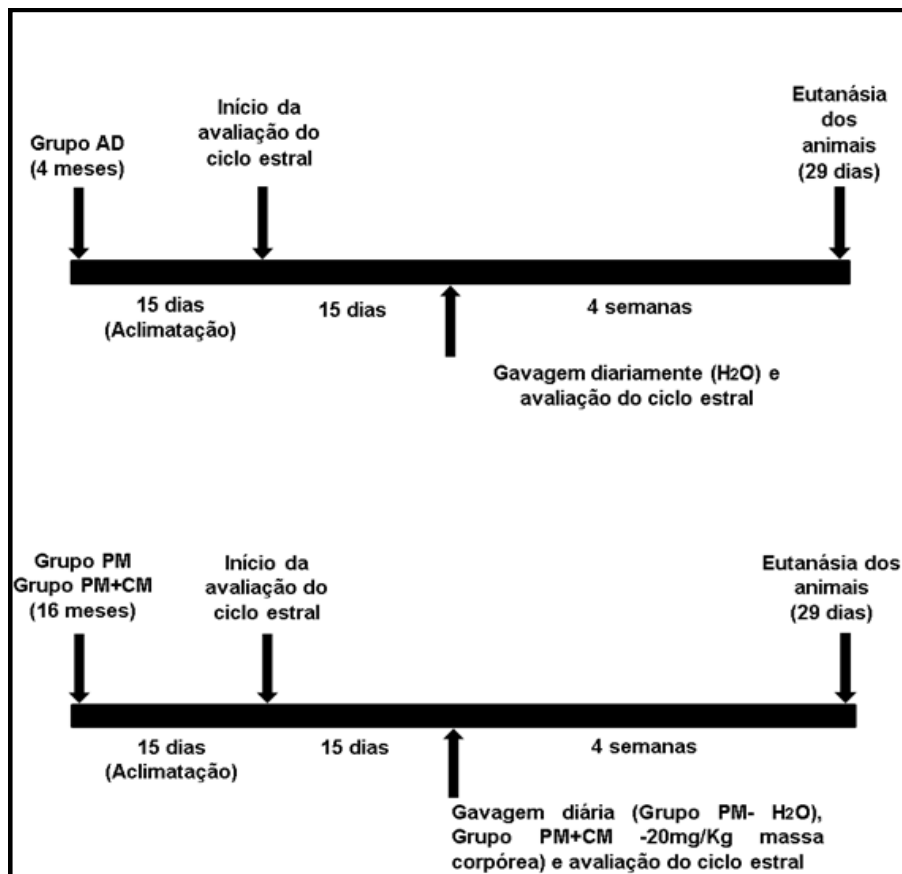
Neste trabalho foram utilizadas apenas fêmeas adultas com ciclo estral regular e fêmeas na perimenopausa com ciclo mais longo e irregular. Para garantir que as fêmeas em cada grupo estavam na mesma fase reprodutiva, a duração do ciclo foi monitorada diariamente após o período de aclimação e durante todo o experimento, através da análise citológica do esfregaço da secreção vaginal (LE FEVRE, MCCLINTOCK, 1988). A coleta da secreção vaginal foi feita com pipeta de plástico descartável, após a instilação de 10 µL de NaCl 0,9% (m/v). Foram adotados cuidados para não haver estimulação da cérvix uterina durante o procedimento e assim que retirado, o material foi colocado sobre lâmina para realização de análise citológica.

O ciclo reprodutivo de roedores, denominado ciclo estral, tem duração média de quatro ou cinco dias e apresenta quatro fases denominadas proestro, estro, metaestro e diestro. As fases podem ser diferenciadas pelos tipos celulares observados no esfregaço vaginal (LE FEVRE, MCCLINTOCK, 1988). Na fase de proestro há predominância de células epiteliais nucleadas; no estro de células anucleadas disformes; no metaestro ocorrem proporções equivalentes de leucócitos, células disformes e células epiteliais nucleadas enquanto que o diestro é caracterizado pela predominância de leucócitos (LONG, EVANS, 1922; MARCONDES et al., 2002).

As fêmeas de *Rattus novogicus albinus*, variedade Wistar de quatro e 16 meses de idade. Os animais foram alojados em sala ventilada, com temperatura controlada (22 ° ± 2C), umidade relativa entre 55 ± 10% e ciclo claro-escuro de 12h/12h. O período de aclimação foi de 15 dias (Figura 1). Dieta padrão para roedores (Labina, Purina Brasil) e água estavam disponíveis *ad libitum* durante todo o experimento.

Após o período de aclimação as ratas adultas com ciclo estral normal foram alocadas no grupo adulta (AD) receberam água (0,5 mL) por sonda orogástrica, diariamente, durante quatro semanas. As ratas perimenopausadas foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos: perimenopausadas (PM) e perimenopausadas tratadas com CM (PM+CM). O grupo PM+CM recebeu CM (20 mg/kg mc/dia, volume máximo de 0,5 mL) por meio da sonda orogástrica diariamente, durante quatro semanas e o grupo PM recebeu água (0,5 mL) durante o mesmo período (Figura 1). O número final de animais em cada grupo foi de 12. A massa corpórea das ratas foi acompanhada semanalmente e o consumo de água e ração diariamente.

Figura 1. Grupos experimentais, acompanhamento do ciclo estral e tratamento das fêmeas adultas (AD), perimenopausadas (PM) e perimenopausadas tratadas com CM (PM+CM).



3.4 Análises no plasma sanguíneo

3.4.1 Obtenção do plasma

Ao término do tratamento os animais foram anestesiados com pentobarbital (50 mg/Kg m.c.) para a realização da punção cardíaca. O sangue obtido (8 mL) durante o dessangramento dos animais foi transferido para tubos heparinizados e centrifugado a 1000 x g durante 15 min, a 4°C (rotor de centrífuga 5810R- S- 4-104, Eppendorf, EUA). O plasma foi removido por aspiração e em seguida congelado a -80°C, com proteção da luz, durante dois meses até à realização das análises da FRAP, FAL e TRAP.

3.4.2 Capacidade antioxidante plasmática (método FRAP)

A Capacidade antioxidante plasmática foi avaliada de acordo com Benzie e Strain, (1996) como descrito anteriormente para o CM, utilizando 18 µL de plasma.

3.4.3 Atividade de fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP)

Para a avaliação da atividade específica da TRAP no plasma, utilizou-se um meio de reação contendo tampão acetato (1 mol/L) pH 5,0; os inibidores tartarato (100 mmol/L) e pHMB (10 mol/L) além de água, em volume final de 450 µL (GRANJEIRO et al., 2004). Uma alíquota da amostra (25 µL) foi adicionada no meio e a reação iniciada após a adição do substrato pNPP (*p*-nitrofenil fosfato 100 mmol/L, 25 µL). Após uma hora de incubação na temperatura de 37° C a reação foi paralisada adicionando-se 450 µL de NaOH 0,5 mol/L. A leitura da absorvância foi mensurada a 400nm (espectrofotômetro Hitachi U-1100). Uma unidade de atividade enzimática (UE) foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 µmol de pNPP por min a 37° C. Os resultados foram expressos como atividade enzimática (AE), que reflete a quantidade UE/mg de proteínas.

3.4.4 Atividade de fosfatase alcalina plasmática (FAL)

A atividade de fosfatase alcalina (FAL) é tempo dependente da formação do *p*-nitrofenolato a partir do substrato pNPP. Neste trabalho foi utilizado o protocolo adaptado por Zhang et al. (2012) a partir de Granjeiro et al. (1997) O plasma (25 µL

μL) foi incubado durante uma hora a 37°C , com $2,5\text{ mmol/L}$ de $p\text{NPP}$, em tampão glicina 25 mmol/L , $\text{pH } 9,4$ contendo 2 mol/L de MgCl_2 . Após a incubação foi adicionado NaOH ($0,5\text{ mol/L}$) para finalizar a reação e a absorvância foi feita em 405 nm , com o intuito de detectar a formação do produto p -nitrofenolato ($p\text{PNP}$). Tubos controle, sem enzima, foram incluídos em cada ensaio para ajustar a hidrólise não-enzimática de $p\text{NPP}$. Uma unidade de atividade enzimática (UE) foi definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar $1\ \mu\text{mol}$ de $p\text{NPP}$ por min a 37°C e os resultados expressos como atividade enzimática (AE), que reflete a quantidade UE/mg de proteínas.

3.5 Análises da estrutura óssea

3.5.1 Obtenção e preparo das amostras

Ambos os fêmures foram removidos imediatamente após a morte dos animais e os tecidos moles aderidos foram retirados. Os fêmures esquerdos foram mantidos em NaCl ($0,9\% \text{ m/v}$) a -20°C , até a realização da análise da DMO ($n=6$) ou armazenados em freezer -80°C ($n=6$) até o preparo do homogenato para as determinações de SOD e MDA.

Os fêmures direitos foram descalcificados em solução de Plank-Rychlo (PLANK, RYCHLO, 1952) (cloreto de alumínio $0,3\text{ mol/L}$, HCl a $3\% \text{ m/v}$, ácido fórmico a $5\% \text{ m/v}$, ácido tricloroacético a $5\% \text{ m/v}$, em água destilada) durante 8 a 9 dias. Após a descalcificação as estruturas foram cortadas em dois fragmentos, na região no eixo transversal (PARFFIT et al., 1984). Posteriormente, o fragmento contendo a cabeça femoral sofreu corte longitudinal entre a cabeça femoral e o trocânter maior, obtendo-se assim a região do colo do fêmur (RAFFI et al., 1997), como pode ser visualizado na Figura 2. As estruturas foram então incluídas em parafina. Com os blocos obtidos foram realizados cortes longitudinais semi-seriados, com três μm de espessura, destinados à coloração com hematoxilina-eosina (HE) ou à imunoistoquímica.



3.5.2 Análise histológica

Nos cortes as amostras osseas obtidas foram corados com HE, na região indicada na Figura 2, em área de $100 \mu\text{m}^2$ foram avaliados o número de osteócitos (N.Ot), o volume trabecular ósseo (VTO, %) e a área ocupada pelos adipócitos (AOA, %) como descrito em Raffi et al. (1997). A captação das imagens foi feita com o auxílio de um microscópio óptico LEICA DM4000B em ampliação de 100x. Para VTO e AOA adotou-se um Grid Mask contendo 121 pontos e os valores finais foram obtidos aplicando-se as fórmulas apresentadas a seguir:

$$\text{VTO} = \text{n}^\circ \text{ pontos sobre o osso trabecular} \times 100 / \text{n}^\circ \text{ total de pontos}$$

$$\text{AOA} = \text{n}^\circ \text{ pontos sobre o adipócito} \times 100 / \text{n}^\circ \text{ total de pontos}$$

Para a obtenção do N.Ot foi utilizado-se ferramenta para contagem manual do software LAS V4.2 (Leica Application Suite).

3.5.3 Imunoistoquímica

Os cortes histológicos destinados para análise imunoistoquímica foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100° - 90° -

70° GL). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão Diva Decloaker® (Biocare Medical, CA, USA), em câmara pressurizada Decloaking Chamber® (Biocare Medical, CA, USA), a 95°C, por 10 minutos. No final de cada etapa da reação imunoistoquímica, as lâminas histológicas foram lavadas em salina tamponada (PBS) 0,1 mol/L; pH 7,4. Posteriormente, as lâminas foram imersas em 3% (v/v) de peróxido de hidrogênio por uma hora e 1% (m/v) de albumina de soro bovino, por 12 horas para bloqueio da peroxidase endógena e bloqueio dos sítios inespecíficos, respectivamente.

As lâminas contendo amostras de cada grupo experimental foram divididas em quatro lotes, dos quais três foram incubados com um dos seguintes anticorpos primários: anti-TRAP do rato gerado em cabra (SC-30833, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), anti-RANKL do rato gerado em cabra (SC-7628, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e anti-OPG do rato gerado em cabra (SC-8468, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado por duas horas e subsequentemente tratados com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte - HRP por uma hora (Universal Dako Labeled HRP Streptavidin-Biotin Kit®, Dako Laboratories, CA, EUA). A revelação foi realizada utilizando como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, EUA). Para a contracoloração empregou-se a hematoxilina de Harris. Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização dos anticorpos primários.

As secções histológicas foram analisadas sob iluminação de campo claro em microscópio óptico (Optiphot-2, Nikon, Japão) por um investigador que desconhecia os grupos experimentais que estavam sendo analisados. A região analisada foi a mesma escolhida para a contagem dos osteócitos. Para RANKL e OPG a imunomarcção foi definida como coloração acastanhada confinada no citosol das células imunorreativas e na matriz extracelular. De cada animal foram analisadas seis secções histológicas do colo femoral, com um aumento de 400x. Efetuou-se uma análise semi-quantitativa e o critério para o estabelecimento dos escores, descrito abaixo, foi baseado em Theodoro et al. (2014):

- ESCORE 0: padrão de imunomarcacão nulo (ausência total de células-imunorreativas (IR) por campo microscópico e ausência de marcação na matriz extracelular (MEC).
- ESCORE 1: baixo padrão de imunomarcacão ($\geq 1/4$ das células-IR por campo microscópico e fraca marcação na MEC).
- ESCORE 2: moderado padrão de imunomarcacão ($\geq 1/2$ das células-IR por campo microscópico e moderada marcação na MEC).
- ESCORE 3: alto padrão de imunomarcacão ($\geq 3/4$ das células-IR por campo microscópico e moderada marcação na MEC).

A imunomarcacão da TRAP foi definida como coloração acastanhada presente exclusivamente no citosol das células imunorreativas, quantificadas apenas as células multinucleadas TRAP-positivas. Em cada animal foi analisada uma secção histológica do colo femoral com um aumento de 250x. A quantidade de células multinucleadas TRAP-positivas foram distribuídas nos seguintes escores:

- ESCORE 0: padrão de imunomarcacão nulo (ausência total de células-IR por campo microscópico);
- ESCORE 1: baixo padrão de imunomarcacão (até 5 células-IR por campo microscópico);
- ESCORE 2: moderado padrão de imunomarcacão (entre 5 e 10 células-IR por campo microscópico);
- ESCORE 3: alto padrão de imunomarcacão (mais de 10 células-IR por campo microscópico). Esse padrão de imunomarcacão foi comparado entre os grupos experimentais.

Para a imunomarcacão para SOD2 a recuperaçao de antígenos foi realizada com tampão de pH 6,0 e o bloqueio da atividade de peroxidase endógena foi realizada com 3% de peróxido de hidrogênio; como anticorpo primário foi usado SOD2 anti- (Abcam, código ab13534,) com uma diluição de 1:1000 e como anticorpo secundário foi utilizado o anticorpo biotinilado link Universal e estreptavidina-HRP (Dako, LSAB + System-HRP, código K069011- 2). Para a contracoloração empregou-se a hematoxilina de Mayer. Efetuou-se uma análise

semi-quantitativa, a quantificação dos escores foi baseada em Theodoro et al. (2014):

- ESCORE 0: padrão de imunomarcção nulo (ausência total de células-imunorreativas (IR) por campo microscópico e ausência de marcação na matriz extracelular (MEC);
- ESCORE 1: baixo padrão de imunomarcção ($\geq 1/4$ das células-IR por campo microscópico e fraca marcação na MEC);
- ESCORE 2: moderado padrão de imunomarcção ($\geq 1/2$ das células-IR por campo microscópico e moderada marcação na MEC);
- ESCORE 3: alto padrão de imunomarcção ($\geq 3/4$ das células-IR por campo microscópico e moderada marcação na MEC).

3.5.4 Densitometria óssea areal (aDMO)

A DMO óssea areal (aDMO) foi analisada em todo o fêmur esquerdo nas seis estruturas ósseas e foi expressa em g/cm^2 (BIERING-SORENSEN et. al., 1988 e DEMIREL et al., 1998), utilizando-se um densitômetro de dupla emissão de raios-X (DEXA), modelo Lunar DPX Alpha (Madison – USA), com software especial para pequenos animais.

3.6 Análises no homogenato de osso

3.6.1 Preparo do homogenato do osso

Fêmures esquerdos ($n = 6$) foram triturados individualmente em KCl 150 mmol/L na proporção de 1:10 m/v, com auxílio de gral, pistilo e N_2 . O material foi então incubado a 37°C , sob constante agitação vigorosa. Posteriormente esse homogenato foi centrifugado a $3.700 \times g$ na temperatura de 4°C durante 15 min (MANIAM et al., 2008). O sobrenadante foi imediatamente coletado e mantido em gelo para determinação de MDA, proteínas e da atividade de SOD.

3.6.2 Determinação de Malonaldeído

O MDA foi quantificado no sobrenadante do homogenato pelo método TBARS (Thiobarbituric acid-reactive substances), como descrito em Buege e Aust (1978), por meio da reação dos produtos da lipoperoxidação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Uma alíquota de 250 μL da amostra foi adicionada ao ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v) e após centrifugação (1000 x g, 3 min) o sobrenadante foi coletado e misturado a TBA 0,67% (m/v). A mistura foi incubada em 100°C, durante 15 minutos. A absorvância verificada em 535 nm, após resfriamento com gelo até temperatura ambiente. O coeficiente de absorção molar utilizado para estimar a concentração de MDA foi de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em nmol/g de proteínas.

3.6.3 Atividade de superóxido dismutase (SOD)

A SOD no homogenato do osso foi estimada como descrito em Maniam et al. (2008), no sobrenadante do homogenato de osso. Foi preparado um meio de reação contendo 750 μL de amostra, 2 mL de tampão Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 8,2 e 750 μL de água destilada. A reação foi iniciada pela adição de 0,5 mL de pirogalol (2 mmol/L) e monitorada por cinco minutos, em 420 nm. A quantidade de enzima necessária para inibir 50% da auto-oxidação do pirogalol foi considerada como uma unidade de atividade da enzima (UE), expressa em função da concentração de proteínas.

3.7 Determinação da concentração de proteínas

Para expressar a atividade enzimática e MDA, a concentração total de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (1951), utilizando-se albumina bovina como padrão. As absorvâncias foram determinadas em 625 nm e os resultados, expressos em mg/mL ou g/mL.

3.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados (média \pm erro padrão da média) foram analisados com auxílio do programa GraphPad Prism, versão 5.0. A normalidade foi confirmada pelo teste KS (Kolmogorov-Smirnov). Teste *t Student* não pareado foi aplicado para comparação

entre os grupos AD e PM ou PM e PM+CM. Não foram estabelecidas comparações diretas entre AD e PM+CM. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

4. RESULTADOS

Caracterização do chá mate

O mate em pó solúvel da marca comercial utilizada neste trabalho já havia sido caracterizado anteriormente por outros autores (ARÇARI et al., 2009) e também em trabalho prévio de nosso grupo (PEREIRA, 2013), porém buscou-se confirmar a presença de polifenóis e a capacidade antioxidante, antes de ser iniciado o tratamento dos animais. A análise do total de polifenóis mostrou 113,37 mg/g de pó e a FRAP foi estimada em 534,67 mmol/L.

Validação dos grupos experimentais utilizados no experimento

O tratamento com CM durante quatro semanas não alterou os consumos de água e ração nem a massa corpórea dos animais (Tabela 1). Estes resultados são muito importantes, pois indicam que a redução do dano oxidativo observado em fêmeas na perimenopausa, não foi causada por restrição calórica ou redução de massa corpórea.

Tabela 1. Consumo de ração, de água e peso de ratas adultas (AD), perimenopausadas (PM) e perimenopausadas tratadas com chá mate (PM+CM)

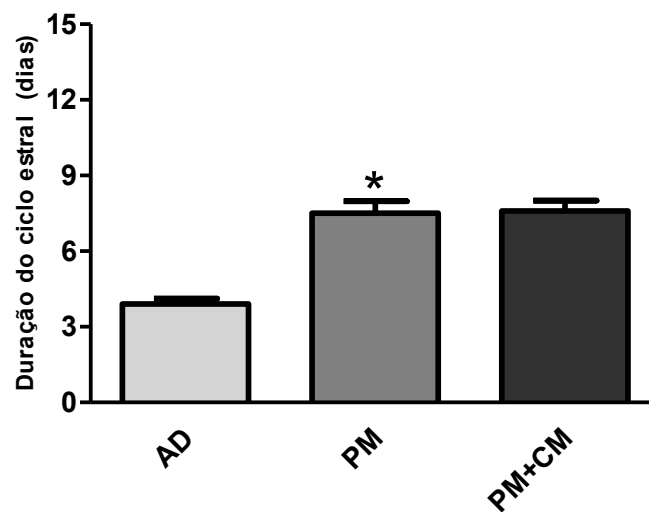
Grupos	Consumo de ração (g/animal/dia)	Consumo de água (mL/animal/dia)	Peso inicial (g)	Peso final (g)
AD	14,60 ± 1,10	26,20 ± 1,30	345,9 ± 11,38	346,8 ± 11,20
PM	14,75 ± 1,12	25,09 ± 1,25	341,5 ± 11,30	340,6 ± 10,50
PM+CM	14,99 ± 1,24	28,17 ± 1,52	361,2 ± 14,58	359,4 ± 9,38

Valores expressos como média ± erro padrão, n = 12/grupo.

O acompanhamento do ciclo estral foi fundamental para assegurar que em cada grupo experimental todos os animais estavam na mesma fase da vida

reprodutiva. A figura 3 mostra que no grupo AD o ciclo foi regular, com duração de ($3,90 \pm 0,21$ dias), enquanto que no grupo PM o ciclo foi significativamente prolongado, além de apresentar-se irregular ($7,50 \pm 0,47$ dias), como esperado para ratas na perimenopausa (CHEN et al., 2013; FRYE et al., 2012). O tratamento com CM não promoveu mudanças significante nesse parâmetro (PM+CM: $7,60 \pm 0,40$ dias).

Figura 3. Duração do ciclo estral de ratas adultas (AD), perimenopausadas (PM) e perimenopausadas tratadas com CM (PM+CM).

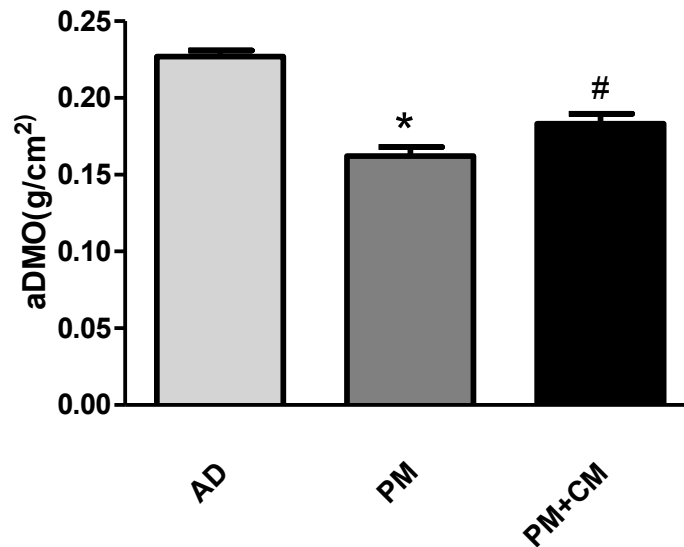


Valores expressos como média \pm erro padrão, n = 12/grupo. *Quando comparado PM com AD. Teste t Student, $p < 0,05$.

Efeito do CM na perda de massa óssea nas ratas perimenopausadas

O tratamento com CM atenuou a redução da aDMO em fêmeas na perimenopausa (Figura 4). Os valores de aDMO, reduzidos em 28,5% ($p < 0,05$) com a perimenopausa (PM: $0,1623 \pm 0,0057$; AD: $0,2270 \pm 0,0039$), foram elevados em 11,4% ($p < 0,05$) após o tratamento com CM (PM+CM: $0,1833 \pm 0,0064$).

Figura 4. Densidade mineral óssea areal (aDMO-g/cm²) em ratas adultas (AD), perimenopausadas (PM) e perimenopausadas tratadas com CM (PM+CM).

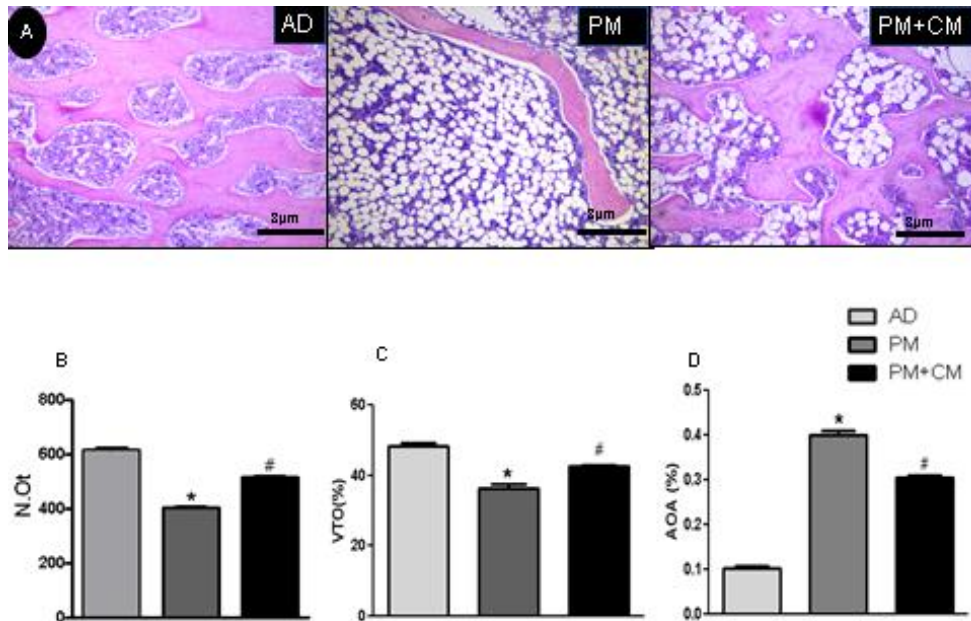


Valores expressos como média \pm erro padrão, n = 6/grupo. *Quando comparado PM com AD, # quando comparado PM+CM com PM. Teste t *Student*, $p < 0,05$.

Efeito do CM sobre o volume trabecular ósseo, o número de osteócitos e a massa área ocupada por adipócitos

A análise histomorfométrica bidimensional do colo femoral (Figura 5A) confirmou que a arquitetura óssea foi modificada de forma adversa pela perimenopausa, e que o tratamento com CM foi capaz de reverter essas alterações. O N.Ot (Figura 5B) foi de 34,81% ($p < 0,05$) menor no grupo PM ($401,3 \pm 3,91$) em comparação ao grupo AD ($615,6 \pm 5,21$) e o tratamento com CM, por quatro semanas, aumentou em 28,08% ($p < 0,05$) os valores de N.Ot (PM+CM: $514,0 \pm 3,64$). A porcentagem de osso trabecular (Figura 5C), reduziu em 24,97% ($p < 0,05$) no grupo PM ($36,34 \pm 1,22$) comparado ao grupo AD ($48,44 \pm 0,84$) mostrou-se 14,67% ($p < 0,05$) maior nas fêmeas perimenopausadas ($42,59 \pm 0,45$) que receberam o CM. A porcentagem de área ocupada por adipócito (Figura 5D), aumentou em 74,53% ($p < 0,05$) no grupo PM ($0,3998 \pm 0,01$) em relação as ratas adultas ($0,1018 \pm 0,05$), e foi 23,61% ($p < 0,05$) menor nas fêmeas perimenopausadas ($0,3054 \pm 0,04$) tratadas com CM.

Figura 5. Histomorfometria bidimensional do colo femoral de ratas adultas (AD), perimenopausadas (PM) e perimenopausadas tratadas com chá mate (PM+CM). Coloração do osso trabecular no colo do fêmur por Hematoxilina eosina (5A), Número de osteócitos (N.Ot) (5B), volume trabecular ósseo (VTO) (5C) e a área ocupada pelos adipócitos (AOA) (5D)



Ampliação original: 40x. Barras de escala: 8 μm. Valores nos gráficos expressos como média ± erro padrão, n = 12/grupo. *Quando comparado PM com AD; #quando comparado PM+CM com PM. Teste *t Student*, $p < 0,05$.

Efeitos do CM nos marcadores plasmáticos e teciduais do metabolismo ósseo nas ratas perimenopausadas

A TRAP é um marcador de osteoclastos que quando monitorado no plasma reflete a atividade de reabsorção (KOH et al., 2006). FAL é um marcador plasmático da formação óssea (PATRICK et al., 2000; ZHANG et al., 2015). Na perimenopausa ocorreu um aumento significativo da TRAP plasmática, que foi revertido pelo tratamento com CM. TRAP (UE/mg proteína) mostrou-se 9,60% ($p < 0,05$) maior no grupo PM ($278,30 \pm 2,89$) em comparação ao grupo AD ($254,40 \pm 6,50$). O tratamento com CM reduziu em 8,80% ($p < 0,05$) os valores de TRAP ($253,80 \pm 5,39$) em comparação com o grupo PM (Tabela 2).

A FAL plasmática (Tabela 2) foi 17,7% ($p < 0,05$) maior no grupo PM ($507,40 \pm 28,72$) em comparação com o grupo AD ($431,10 \pm 8,93$) e o tratamento com CM

(PM+CM: $416,6 \pm 11,41$) foi eficaz em reduzir em 17,9% ($p < 0,05$) a atividade específica dessa enzima.

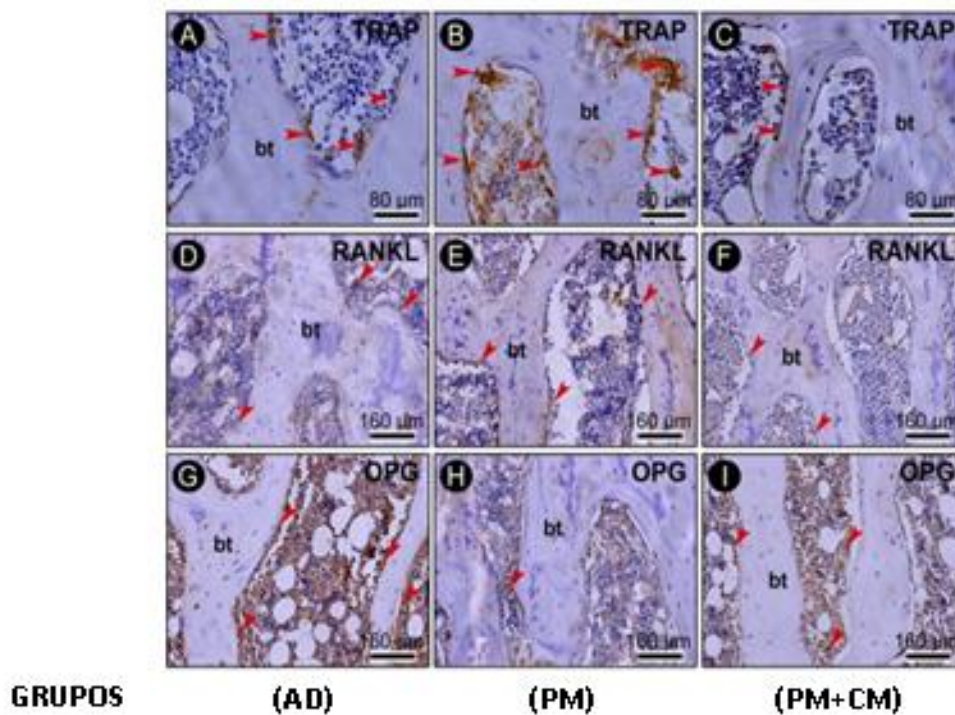
Tabela 2. TRAP (UE / mg de proteína) e FAL (UE/mg proteína) em ratas adultas (AD), perimenopausadas (PM) e perimenopausadas tratadas com CM (PM+CM).

Grupos	TRAP (UE/mg proteína)	FAL (UE/mg proteína)
AD	$254,4 \pm 6,50$	$431,10 \pm 8,93$
PM	$278,3 \pm 2,89^*$	$507,40 \pm 28,72^*$
PM+CM	$253,8 \pm 5,39^\#$	$416,6 \pm 11,41^\#$

Valores expressos como média \pm erro padrão, $n = 12$ /grupo. ^{*}Quando comparado PM com AD; [#]quando comparado PM+CM com PM. Teste *t Student*, $p < 0,05$.

Na TRAP no osso (Figura 6A, 6B e 6C) o grupo PM+CM apresentou um padrão moderado (escore 2) enquanto o grupo PM apresentou um alto padrão de imunomarcacão (escore 3). A TRAP nao diferiu entre os grupos AD e PM (Tabela 3). RANKL é um fator osteoclastogênico, que estimula a reabsorção óssea. Por sua vez a OPG modula negativamente a ação de RANKL e consequentemene a reaborção. Ao comparar RANKL no grupo AD (Figura 6D) com com grupo PM (Figura 6E), as ratas perimenopausadas apresentaram um padrão moderado de imunomarcacão (escore 2), enquanto no grupo AD prevaleceu um baixo padrão de imunomarcacão (escore 1). Após o tratamento com CM um baixo padrão de imunomarcacão (escore 1) foi observada em ratas perimenopausadas (Tabela 3). A diminuição da OPG (escore 1) no grupo PM (Figura 6H) foi revertida pelo tratamento com CM (Figura 6I, Tabela 3).

Figura 6. Padrão de imunomarcção para TRAP (A, B, C), RANKL (D, E, F) e OPG (G, H, I) no colo femoral do grupo adulto (AD) (A, D e G), perimenopausada (PM) (B, C e H) e perimenopausada tratada com chá mate (PM + MT) (C, F e I).



Tecido ósseo (TO); setas indicam células imunorreativas. Ampliação original: A-C: 400x; D-Eu, 200x. Barras de escala: A-C, 80 mm; D-I, 160 mm. Contracoloração: hematoxilina de Harris.

Tabela 3- TRAP, RANKL, OPG e SOD2 em ratas adultas (AD), perimenopausadas (PM), perimenopausadas tratadas com CM (PM+CM).

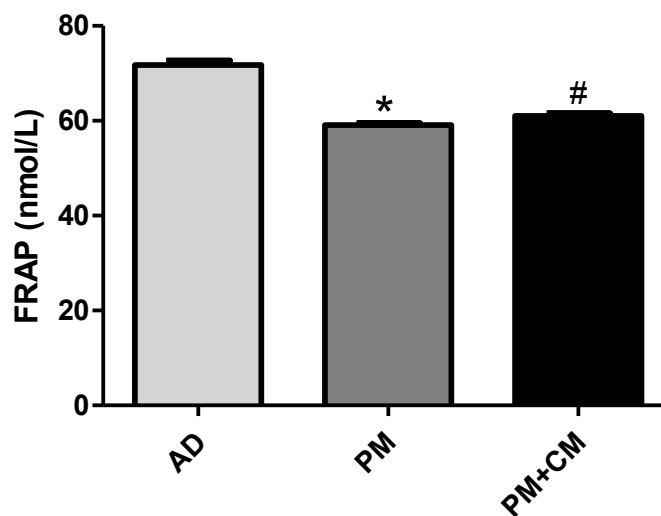
Grupos	TRAP	RANKL	OPG	SOD2
AD	3(2-3)	1(1-1,25)	2(1-2)	1(1-1)
PM	3(2,75-3)	*2(1-2)	*1(1-1,25)	*3(2-3)
PM+CM	#2(1-2)	#1(1-1)	#2(1-2)	#2(1-2)

Valores expressos em mediana e primeiro e terceiro quartil, n = 12 / grupo. * Quando comparado PM com AD, # quando comparado PM+CM com PM. Teste de Mann-Whitney, p<0,05.

Efeito do CM nos marcadores do estresse oxidativo

Observando-se os valores de FRAP (Figura 7) nos grupos PM ($59,13 \pm 0,39$) e AD ($71,80 \pm 0,88$), pôde-se verificar que no período da perimenopausa ocorreu uma diminuição de 18% ($p < 0,05$) neste parâmetro. O tratamento com CM durante quatro semanas culminou em pequena (3,1%), porém estatisticamente significativa ($p < 0,05$) elevação da FRAP.

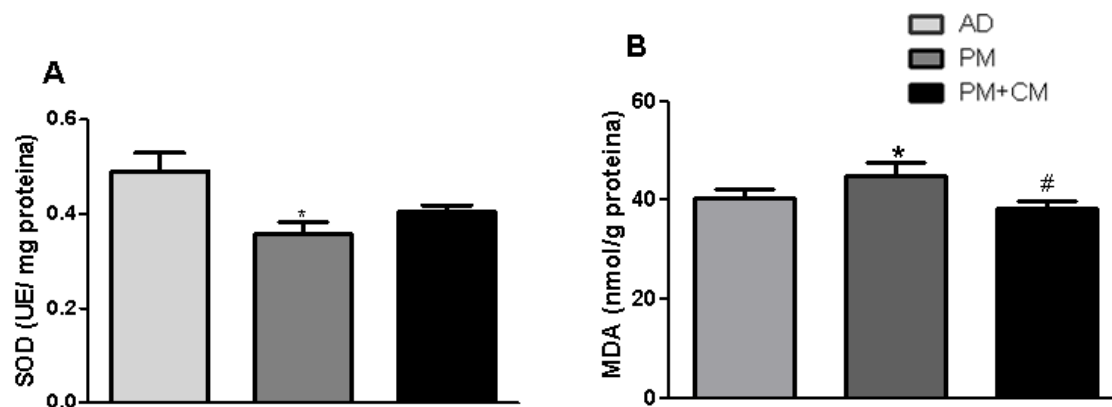
Figura 7. Capacidade antioxidante plasmática (FRAP) em ratas adultas (AD), perimenopausadas (PM) e perimenopausadas tratadas com CM (PM+CM).



Valores expressos como média \pm erro padrão, $n = 12$ /grupo. *Quando comparado PM com AD, #quando comparado PM+CM com PM. Teste t *Student*, $p < 0,05$.

A atividade enzimática de SOD no homogenato do osso (Figura 8A) foi 27,2% ($p < 0,05$) menor no grupo PM ($0,2597 \pm 0,02$) em comparação com o grupo AD ($0,4617 \pm 0,19$). O tratamento com CM não se mostrou eficaz em reverter a alteração resultante da perimenopausa. Já o dano oxidativo lipídico, avaliado pela concentração de MDA (Figura 8B) foi 21,4% ($p < 0,05$) maior no grupo PM ($44,98 \pm 2,73$) em comparação ao grupo AD ($40,34 \pm 1,72$) e reduziu 14,9% ($p < 0,05$) após o tratamento com CM ($38,27 \pm 1,64$).

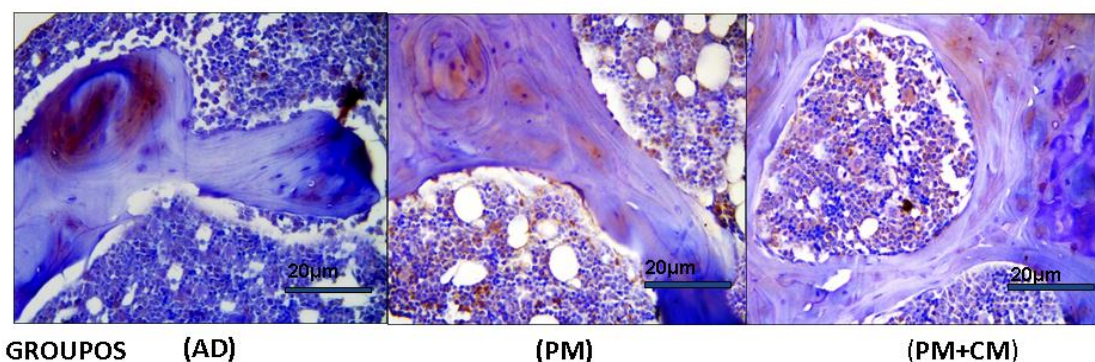
Figura 8. (A) Atividade de superóxido dismutase (SOD) e (B) concentração de malonaldeído 41 (MDA) em homogenato de fêmur de ratas adultas (AD), perimenopausadas (PM) e perimenopausadas tratadas com CM (PM+CM).



Valores expressos como média \pm erro padrão, $n = 6/\text{grupo}$. Quando comparado PM com AD, #quando comparado PM+CM com PM. Teste t *Student*, $p < 0,05$.

Apesar da atividade total de SOD ser menor no homogenato das ratas perimenopausadas (Figura 8). A proteína SOD2 (Figura 9) aumentou no grupo PM (escore 3) em comparação com o grupo AD (escore 1) e o grupo PM+CM apresentou um padrão moderado de imunomarcagem (escore 2).

Figura 9. Fotomicrofotografias que mostram o padrão de imunomarcagem para SOD2 no osso trabeculado do colo do fêmur de ratas adultas (AD), perimenopausadas (PM) e perimenopausadas tratadas com CM (PM+CM).



Padrão de imunomarcagem para SOD2 no colo femoral do grupo AD, PM e PM+ CM; setas indicam células imunorreativas. Ampliação original: 100X. Barras de escala: 20 μm . Contracoloração: Hematoxilina de Meyer.

5. DISCUSSÃO

O CM minimiza o estresse oxidativo e a reabsorção óssea, atenuando assim a osteopenia de ratas na perimenopausa.

A perimenopausa é um período de transição na vida reprodutiva das fêmeas, marcado por profundas mudanças hormonais e metabólicas, com alterações no ciclo menstrual em mulheres e no ciclo estral em roedores (ZITŇANOVÁ et al., 2011; BURGER, 2008; PRIOR, HITCHCOCK, 2011; FREEMAN et al., 2004; KERMATH, GORE, 2012). Fêmeas de ratas Wistar naturalmente perimenopausadas têm sido usadas como modelo experimental para elucidar os mecanismos envolvidos nas alterações somatovegetativas e psicossociais que caracterizam essa fase da vida reprodutiva, porém como animais com a mesma idade cronológica podem apresentar-se em diferentes estágios da vida reprodutiva. A validação foi realizada por meio do monitoramento da duração e da ritmicidade do ciclo do ciclo estral (CHEN et al., 2013; SU et al., 2013). Corroborando a literatura (CHEN et al., 2013; SU et al., 2013, KERMATH, GORE, 2012) as fêmeas perimenopausadas apresentaram ciclo estral irregular, com duração superior a cinco dias, padrão que foi mantido durante todo o período experimental, mesmo no grupo tratado com CM.

O CM, assim como o chimarrão e o tereré, são bebidas altamente consumidas na América do Sul, preparadas com as folhas da *Ilex paraguariensis*, espécie nativa dessa região. Diferentes formas comerciais das folhas da erva-mate torrada podem ser utilizadas para o preparo do CM, tais como folhas trituradas, folhas trituradas embaladas em sachês e o pó instantâneo solúvel, obtido pela atomização do extrato aquoso das folhas torradas. A forma escolhida para realização deste trabalho foi o pó instantâneo solúvel (Leão Jr. ®, Curitiba, PR, Brasil), já caracterizado fitoquimicamente (PEREIRA, 2013). Estima-se que cerca de 30% da população sul-americana consuma em torno de um litro por dia de qualquer uma das bebidas produzidas a partir da erva mate (FILIP et al., 2000). No Brasil, considerado o segundo maior produtor mundial de erva mate (SIDRA 2009) o consumo per capita gira em torno de 1,2 Kg/ano (HECK, MEJLA, 2012).

Com uma grande variedade de nutrientes, o CM é rico em flavonoides e ácidos polifenólicos, como o clorogênico e seus derivados, principais responsáveis pela elevada capacidade antioxidante dessa bebida (DA SILVA et al., 2008, ARÇARI et al., 2009). O teor de polifenóis observado no presente estudo (113,37 mg/g de pó) foi menor do que o descrito por ARÇARI et al. (2009) (348,80 mg/g de pó) para a mesma forma comercial, provavelmente em função das diferenças nos métodos analíticos e no composto utilizado como padrão, ácidos gálico e

clorogênico, respectivamente. Apesar dessa variação, a presença de atividade antioxidante no pó instantâneo foi verificada pelo ensaio da FRAP, mesmo método utilizado em estudo para a análise do CM preparado a partir da infusão das folhas tostadas e trituradas (BRACESCO et al., 2011), o que dificulta a comparação dos valores.

Diversos trabalhos têm utilizado o CM solúvel para reduzir o estresse oxidativo, porém há grande divergência nas doses escolhidas. O CM solúvel mostrou-se eficaz em melhorar a defesa antioxidante plasmática e reduzir o estresse oxidativo em machos e fêmeas de roedores, tratados por diferentes períodos, com doses diárias entre 500 e 2.000 mg/kg de m.c. (MARTINS et al., 2009; ARÇARI et al., 2009; PRZYGODDA et al., 2010). Em seres humanos esses efeitos do CM foram verificados quando utilizados de 2,5 a 5,0 g/dia/indivíduo (BOAVENTURA et al., 2012). A dose utilizada neste estudo (20 mg/kg de m.c.) equivale ao consumo humano de 300 mL ou 1 ½ xícara brasileira de CM solúvel por dia, preparado de acordo com as instruções do fabricante. Essa dose mostrou-se pouco eficaz em aumentar a defesa antioxidante não enzimática plasmática (3,1 % de aumento FRAP), reduzida na perimeopausa. Esses resultados corroboram estudo anterior de nosso grupo, que demonstra ser o efeito do CM sobre a FRAP dependente do tempo de tratamento. Utilizando o mesmo modelo animal e a mesma dose de CM, foram verificados aumentos de 7,75% após seis semanas (TIRAPELI, 2014) e 54,02% após oito semanas (PEREIRA, 2013). Quando avaliados os efeitos da perimenopausa sobre a capacidade antioxidante plasmática das ratas (redução de 18% em relação ao grupo AD), os dados corroboram os achados em fêmeas de roedores (ISHII et al., 2014) e em mulheres na pós-menopausa (CERVELLATI et al., 2014). Contrariando esses achados, elevação na capacidade antioxidante plasmática foi descrita em mulheres na perimenopausa (ZITŇANOVÁ et al., 2011) e na pós-menopausa (RAMIREZ-EXPÓSTIO et al., 2014). Esse aumento foi justificado pelos autores como uma possível tentativa de compensação do organismo ao aumento do estresse oxidativo.

A produção de ERO e a defesa antioxidante podem ser alteradas por variações na ingestão calórica e na massa corpórea (YU et al., 1992; ARÇARI et al., 2009). Menor m.c. foi observada em ratos machos adultos obesos, que receberam durante oito semanas uma dose de 1g/kg de m.c. de CM (BOAVENTURA et al., 2012), e em fêmeas adultas tratadas durante 60 dias (5 g/kg

de peso corporal) (PRZYGODDA et al., 2010). No presente estudo porém, pode-se afirmar que nenhum dos resultados obtidos foi influenciado por esses fatores, uma vez que não foram verificadas diferenças na ingestão de ração, água ou m.c. das fêmeas tratadas com o CM. Diferentes modelos experimentais, tempo de tratamento e principalmente dose de CM explicam essas discrepâncias. Trabalhos anteriores de nosso grupo já haviam demonstrado que a dose de 20 mg/kg m.c. administrada por seis (TIRAPELI, 2014) ou oito semanas (PEREIRA, 2013) para fêmeas adultas e perimenopausadas não modifica nenhum dos parâmetros citados.

A osteoporose e a osteopenia são as patologias ósseas de maior incidência mundial (MA et al., 2013). Modelos animais reproduzem a osteopenia em humanos, e sabidamente a redução da massa óssea é um preditor da susceptibilidade à osteoporose (MA et al., 2013). O monitoramento da DMO é, portanto essencial para diagnóstico e acompanhamento da osteopenia e da osteoporose (CUMMINGS, 2012). Semelhante ao observado por outros autores em ratas (TANTIKANLAYAPORN et al., 2013; CHATUPHONPRASERT et al., 2013) e mulheres na perimenopausa (SOWERS et al., 2012; VICTORIN et al., 2013) neste estudo a aDMO foi reduzida em 28,5% no grupo PM, e o CM mostrou-se eficaz em minimizar essa redução. Até então a capacidade do CM em minimizar a osteopenia havia sido demonstrada apenas em mulheres na pós-menopausa, que consumiram diariamente pelo menos 1 L /dia de erva mate (CONFORTI et al., 2012), durante quatro anos ou mais. Os autores embora não tenham estudado os mecanismos envolvidos atribuíram aos polifenóis os efeitos benéficos do CM no osso. Outros produtos naturais como a *Pueraria mirifica* (TANTIKANLAYAPORN et al., 2013) e a *Curcuma comosa Roxb* (CHATUPHONPRASERT et al., 2013) mostraram-se eficazes em minimizar a osteoporose em ratas na pós-menopausa induzida cirurgicamente. Os efeitos benéficos desses produtos sobre a estrutura óssea foram atribuídos aos fitoestrógenos contidos nos mesmos. Sabe-se que na ausência ou redução de estrógeno a reabsorção óssea é privilegiada em detrimento à formação, uma vez que ocorre redução na atividade de osteoblastos e estímulo à osteoclastogênese (MODY et al., 2001) e também podem ocorrer alterações no padrão do ciclo estral (UDOMSUK et al., 2012). Os efeitos do CM observados neste estudo parecem não estar associados a esse fator, uma vez que a dose utilizada não promoveu alteração no padrão de ciclo estral das ratas na perimenopausa. O mesmo já havia sido observado em ratas adultas e em ratas

perimenopausadas tratadas por duas, seis (TIRAPELI, 2014) e oito semanas (PEREIRA, 2013), com a mesma dose de 20 mg/kg m.c. O tratamento por oito semanas além de não promover modificações no padrão do ciclo estral não modificou de forma significativa a concentração plasmática de estrógeno (PEREIRA, 2013).

A redução da aDMO na perimenopausa foi acompanhada de um aumento de células adiposas, corroborando achados anteriores que demonstraram maior adipogênese em detrimento da osteogênese, na osteoporose e na osteopenia (MOERMAN et al., 2004). A capacidade do CM em regular a expressão de genes relacionados à adipogênese no tecido adiposo seja conhecida (ARÇARI et al., 2013), este é provavelmente o primeiro relato desse possível efeito na estrutura óssea. Assim como esperado, e de forma semelhante ao observado em modelo de ratas cirurgicamente menopausadas (TANTIKANLAYAPORN et al., 2013), a diminuição de massa óssea no grupo PM foi também acompanhada de redução do VTO e N.Ot, o que foi revertido pelo tratamento com CM. A manutenção da massa óssea é dependente de uma adequada modulação do processo de remodelação, que por sua vez deriva da atividade de osteoblastos, para a formação da nova matriz e dos osteoclastos, envolvidos na reabsorção óssea (GUO et al., 2015; DATTA et al., 2008). A redução do número de osteócitos, células derivadas de osteoblastos e responsáveis pela manutenção da estrutura óssea (KNOTHE TATE et al., 2004) associada ao aumento da atividade plasmática de TRAP, reflete o aumento do número de osteoclastos (BLUMSOHN, EASTELL, 1997) e a maior expressão de TRAP no osso, expressam uma maior atividade de reabsorção nas ratas perimenopausadas, como já observado em ratas (LIU et al., 2015) e mulheres (BARRETT CONNOR et al., 2015) na pós-menopausa. A maior atividade plasmática de FAL, um marcador da função osteoblástica, aumenta no plasma após a menopausa, como resultado de um mecanismo compensatório para perda óssea (PATRICK et al., 2000; ZHANG et al., 2015). Como observado para o CM, outros produtos naturais como a *Curcuma comosa Roxb* (CHATUPHONPRASERT et al., 2013) e o chá verde derivado da *Camellia sinensis* (SHEN et al., 2013), foi eficiente em reduzir a atividade osteoclástica.

Sabe-se que o processo de remodelação e conseqüentemente a massa óssea, são modulados pelo cociente OPG/RANKL, e que a redução desse cociente na deficiência de estrógeno é um dos mecanismos que explicam a perda óssea na

pós-menopausa (RAHMAN et al., 2009; FAHMY et al., 2015). O CM atenua a expressão da proteína RANKL, um fator chave para a diferenciação e ativação de osteoclastos, aumentada durante a perimenopausa, além de aumentar a expressão de OPG, um receptor chamariz para o RANKL que modula positivamente a massa óssea (BAI et al., 2005). Desta forma, a redução em OPG/RANKL, constatada nas ratas perimenopausadas, foi atenuada pelo CM. Tomados em conjunto, os dados deste trabalho indicam que o CM atenua a perda de massa óssea, reduzindo a reabsorção, ao menos em parte, por inibição da osteoclastogênese via RANKL.

O estresse oxidativo tem papel chave na osteopenia e na osteoporose (BAI et al., 2004; DENG et al., 2011; GUO et al., 2015). A melhora na aDMO no osso de ratas perimenopausadas após o tratamento com CM pode ser associada à redução do estresse oxidativo. A maior concentração de MDA no fêmur das ratas na perimenopausa indica aumento do estado oxidativo, reduzido pelo tratamento com CM. Aumento do MDA no osso foi anteriormente descrito em ratas ovariectomizadas e associado a osteopenia (CHEN et al., 2013), sendo minimizado pelo uso do chá verde, rico em polifenóis e com elevada ação antioxidante (SHEN et al., 2011; SHEN et al., 2013). Nesse contexto, e reforçando que a redução do estresse oxidativo vem acompanhada com a atenuação da osteopenia em ratas perimenopausadas tratadas com CM, não se pode desconsiderar o fato da expressão de RANKL ser modulada positivamente por ERO (BAI et al., 2005).

O aumento do dano oxidativo pode resultar de uma diminuição na defesa antioxidante enzimática (BERRA et al., 2006; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ et al., 2007) e ratas naturalmente perimenopausadas apresentam redução de SOD no fígado, hemácias e pâncreas (PEREIRA, 2013; TIRAPELI, 2014). Embora o tratamento com CM tenha amenizado essa queda nos tecidos anteriormente estudados, o mesmo não foi constatado no osso. Redução na atividade de SOD no osso já havia sido descrita em ratos machos em resposta ao envelhecimento (MANIAM, 2012) e associada à osteopenia.

O protocolo utilizado para a determinação de SOD neste trabalho mensurou inicialmente todas as isoenzimas da superóxido dismutase. Recentemente, um aumento da isoforma 2 (SOD2) foi demonstrado em monócitos de mulheres osteoporóticas (DENG et al., 2011) e esse aumento foi também observado quando

avaliada expressão de SOD2 no osso das ratas fêmeas na perimenopausa. Essa isoforma da SOD é necessária para a diferenciação e função dos osteoclastos (GUO et al., 2015) e conseqüentemente para o processo de reabsorção. O CM reduziu a expressão da proteína SOD2 nesta investigação, reforçando a ideia de que a melhora na estrutura óssea após o seu uso resulta, mesmo que parcialmente, de uma diminuição na atividade osteoclástica e na reabsorção.

6. CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, os resultados do presente estudo demonstraram que a utilização do CM na perimenopausa pode auxiliar na manutenção da estrutura óssea e, assim, melhorar a qualidade de vida em fêmeas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Altindag O, Erel O, Soran N, Celik H, Selek S. Total oxidative/anti-oxidative status and relation to bone mineral density in osteoporosis. *Rheumatol Int.* 2008;28(4):317-21.

Amadei SU, Silveira VAS, Pereira AC, Carvalho YR, Rocha RF. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. *J Bras Patol Med Lab.* 2006;42(1):5-12.

Arçari DP, Bartchewsky W, dos Santos TW, Oliveira KA, Funck A, Pedrazzoli J, de Souza MF, Saad MJ, Bastos DH, Gambero A, Carvalho Pde O, Ribeiro ML. Antiobesity effects of yerba maté extract (*ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. *Obesity.* 2009;17(12):2127-33.

Arçari DP, Bartchewsky Jr W, Dos SantosTW, Oliveira KA, DeOliveira CC, Gotardo EM, Pedrazzoli Jr J, Gambero A, Ferraz LFC, Carvalho PO, Ribeiro ML. Anti-inflammatory effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) ameliorate insulin resistance in mice with high fat diet-induced obesity. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;335(2):110–5.

Arçari DP, Santos JC, Gambero A, Ribeiro ML. The in vitro and in vivo effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on adipogenesis. Food Chem. 2013;141:809-15.

Baek KH, Oh KW, Lee WY, Lee SS, Kim MK, Kwon HS, Rhee EJ, Han JH, Song KH, Cha BY. Association of oxidative stress with postmenopausal osteoporosis and the effects of hydrogen peroxide on osteoclast formation in human bone marrow cell cultures. Calcif Tissue Int. 2010;87:226-35.

Bai XC, Lu D, Bai J, Zheng H, Ke ZY, Li XM, Luo SQ. Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF-kappaB. Biochem Biophys Res Commun 2004;314:197-207.

Bai XC, Lu D, Liu AL, et al. Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF-kappaB ligand expression in osteoblast. J Biol Chem. 2005; 280:17497-506.

Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. Quim Nova. 2006;29(1):113-23.

Barrett Connor E, Wade SW, Downs RW, Ganiats T, Hochberg M, Recker RR, Stolshek BS. Self-reported calcium use in a cohort of postmenopausal women receiving osteoporosis therapy: results from possible us. Osteoporos Int. 2015. [Epub ahead of print].

Belló-klein A. Dano Oxidativo e Regulação Biológica pelos Radicais Livres. . Porto Alegre : Editora da Ulbra, 2002.

Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. Anal Biochem. 1996;239(1):70-6.

Berra CM, Menck CFM, Di Mascio P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. Quim Nova. 2006;29(6):1340-44.

Blumsohn A, Eastell R. The performance and utility of biochemical markers of bone turnover: do we know enough to use them in clinical practice? Am Clin Biochem 1997;34:449-59.

Boaventura BCB, Di Pietro PF, Stefanuto A, Klein GA, de Moraes EC, Andrade F, Wazlawik E, da Silva EL. Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. *Nutrition*. 2012;28(6):657-64.

Boonen S, Dejaeger E, Vanderschueren D, Venken K, Bogaerts A, Verschueren S, Milisen K. Osteoporosis and osteoporotic fracture occurrence and prevention in the elderly: a geriatric perspective. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008;22:765-85.

Bowler C, Montagu MV, Inze D Superoxide dismutase and stress tolerance *Annu. Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1992; 43:83-116

Boyce BF, Rosenberg E, de Papp AE, Duong le T. The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease. *Eur J Clin Invest* 2012;42(12), 1332-41.

Bracesco N, Sanchez, AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *J Ethnopharmacol*. 2011;136(3):378-84.

Brodeur MR, Brissette L, Falstraalt L, Ouellet P, Moreau R. Influence of oxidized low-density lipoproteins (LDL) on the viability of osteoblastic cells. *Free Radic Biol Med*. 2008;44:506-17.

Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*.1978;52:302-10.

Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, Wong JB, King A, Tosteson A. Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025. *J Bone Miner Res* 2007;22:465-75.

Burger H. The menopausal transition endocrinology. *J SexMed*. 2008;5:2266-73.

Burgess TL, Qian Y, Kaufman S, Ring BD, Van G, Capparelli C, et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol*. 1999;145(3):527-38.

- Cervellati C, Bonaccorsi G, Cremonini E, Romani A, Fila E, Castaldini MC, Ferrazzini S, Giganti M, Massari L. Oxidative stress and bone resorption interplay as a possible trigger for postmenopausal osteoporosis. *Biomed Res Int.* 2014;1-8.
- Chatuphonprasert W, Udomsuk L, Monthakantirat O, Churikhit Y, Putalun W, Jarukamjorn K. Effects of *Pueraria mirifica* and miroestrol on the antioxidation-related enzymes in ovariectomized mice. *J Pharm Pharmacol.* 2013;3: 447-56.
- Chen S, Asakawa T, Ding S, Liao L, Zhang L, Shen, J, Yu J, Sugiyama K. Chaihu-Shugan-San administration ameliorates perimenopausal anxiety and depression in rats. *Plos One.* 2013;8(8):e72428.
- Conforti AS, Gallo ME, Saraví FD. Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) consumption is associated with higher bone mineral density in postmenopausal women. *Bone.* 2012;50: 9-13.
- Cummings SR. How drugs decrease fracture risk: lessons from trials. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2002;2: 198-200.
- Da Silva HS, de Lima AMM, Galhardoni R. Envelhecimento bem-sucedido e vulnerabilidade em saúde: aproximações e perspectivas. *Interface Com Saúde Educ.* 2010;14(35):867-77.
- Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol.* 2008 May;61(5):577-87.
- Deng FY, Lei SF, Chen XD, Tan LJ, Zhu XZ, Deng HW. An integrative study ascertained SOD2 as a susceptibility gene for osteoporosis in Chinese. *J Bone Miner Res.* 2011; 26:2695-2701.
- Djahanbakhch O, Ezzati M, Zosmer A. Reproductive ageing in women. *J Pathol* 2007;211:219-3.
- Dreher I, Schütze N, Baur A, Hesse K, Schneider D, Köhrle J, Jakob F. Selenoproteins Are Expressed in Fetal Human Osteoblast-like Cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;245(1):101-7

Fahmy SR, Soliman AM, Sayed AA, Marzouk M. Possible antiosteoporotic mechanism of *Cicer arietinum* extract in ovariectomized rats. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(4):3477-90.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil*. 1997; 43(1): 61-8.

Filip R, Lopez P, Giberti G, Coussio J, Ferraro G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia*. 2001;72(7):774-8.

Foncea R, Carvajal C, Almarza C, Leighton F. Endothelial cell oxidative stress and signal transduction. *Biol Res*. 2000;33(2):89-96.

Fraser JH, Helfrich MH, Wallace HM, Ralston SH. Hydrogen peroxide, but not superoxide, stimulates bone resorption in mouse calvariae. *Bone*. 1996;19(3):223-6.

Freeman EW, Sammel MD, Liu L, Gracia CR, Nelson DB, Hollander L. Hormones and menopausal status as predictors of depression in women in transition to menopause. *Arch Gen Psychiatry*. 2004;61:62-70.

Frye JB, Lukefahr AL, Wright LE, Marion SL, Hoyer PB, Funk JL. Modeling perimenopause in Sprague-Dawley rats by chemical manipulation of the transition to ovarian failure. *Comp Med*. 2012;62:193-202.

Gallagher CM, Kovach JS, Meliker JR. Urinary cadmium and osteoporosis in U.S. Women \geq 50 years of age: NHANES 1988-1994 and 1999-2004. *Environ Health Perspect*. 2008;116(10):1338-43.

Galli F, Battistoni A, Gambari R, Pompella A, Bragonzi A, Pilolli F, Iuliano L, Piroddi M, Dehecchi MC, Cabrini G. Oxidative stress and antioxidant therapy in cystic fibrosis. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822(5):690-713

Garcia VG, Longo M, Gualberto Júnior EC, Bosco AF, Nagata MJ, Ervolino E, Theodoro LH. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res*. 2014;49: 584-94.

Gast GC, Pop VJ, Samsioe GN, Grobbee DE, Nilsson PM, Keyzer JJ, Wijnands-van Gent CJ, van der Schouw YT. Hormone therapy and coronary heart disease risk by vasomotor menopausal symptoms. *Maturitas*. 2011; 70(4):373-8.

Granjeiro JM, Miranda MA, da Glória S T Maia M, Ferreira CV, Taga EM, Aoyama H. Effect of homologous series of n-alkyl sulfates and n-alkyl trimethylammonium bromides on low molecular mass protein tyrosine phosphatase activity. *Mol Cell Biochem*. 2004:133-40.

Granjeiro JM, Taga EM, Aoyama H. Purification and characterization of a low-molecular-weight bovine kidney acid phosphatase. *An Acad Bras Cienc*. 1997;69(4):451-60.

Guo T, Zhang L, Konermann A, Zhou H, Jin F, Liu W. Manganese superoxide dismutase *is* required to maintain osteoclast differentiation and function under static force. *Sci Rep*. 2015;26:8016.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radical in biology and medicine*. 2nd ed. Oxford: University Press; 1989.

Halliwell. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem*. 1992;59:1609–23.

Harman, D. Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 2006;1067:10–21.

Heck CI, de Mejia EG. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food Sci*. 2007;72(9):138-51.

Henriksen K, Bollerslev J, Everts V, Karsdal MA. Osteoclast activity and subtypes as a function of physiology and pathology-implications for future treatments of osteoporosis. *Endocr Rev*. 2011;32(1):31-63.

Holroyd C, Cooper C, Dennison E. Epidemiology of osteoporosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008;22:671-85.

Huang J, Wang X, Zhang TL, Wang K. Alterations of ovariectomized rat bone and impact of non-collagenous proteins on mineralization. *Joint Bone Spine*. 2009;76(2):176-83.

Huang MS, Morony S, Lu J, Zhang Z, Bezouglaia O, Tseng W, et al. Atherogenic phospholipids attenuate osteogenic signaling by BMP-2 and parathyroid hormone in osteoblasts. *J Biol Chem*. 2007;282:21237-43.

Ishii S, Miyao M, Mizuno Y, Tanaka-Ishikawa M, Akishita M, Ouchi Y. Association between serum uric acid and lumbar spine bone mineral density in peri- and postmenopausal Japanese women. *Osteoporos Int*. 2014;25: 1099-105.

Kamioka H, Honjo T, Takano-Yamamoto T. A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy. *Bone* 2001;28:145-9.

Kermath BA, Gore AC. Neuroendocrine control of the transition to reproductive senescence: lessons learned from the female rodent model. *Neuroendocrinology*. 2012;96(1):1-12.

Knothe Tate ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. The osteocyte. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Jan;36(1):1-8.

Koh JM, Lee YS, Kim YS, Kim DJ, Kim HH, Park JY et al. Homocysteine enhances bone resorption by stimulation of osteoclast formation and activity through increased intracellular ROS generation. *J. Bone Miner Res*. 2006; 21: 1003-11.

Kolesnikova L, Semenova N, Madaeva I, Suturina L, Solodova E, Grebenkina L, Darenskaya M. Antioxidant status in peri- and postmenopausal women. *Maturitas*. 2015;81(1):83-7.

Lane NE. Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;194: 3-11.

Le Fevre JJ, McClintock MK. Reproductive senescence in female rats: a longitudinal study of individual differences in estrous cycles and behavior. *Biol Reprod*. 1988;38:780-89

Lean JM, Davies JT, Fuller K, Jagger CJ, Kirstein B, Partington GA, Chambers TJ. A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss. *J. Clin. Investig.* 2003;112(6):915-23.

Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med.* 2008 ;58:424-30.

Liu CC, Hu S, Chen G, Georgiou J, Arns S, Kumar NS, Young RN, Grynepas MD. Novel EP4 Receptor Agonist-Bisphosphonate Conjugate Drug (C1) Promotes Bone Formation and Improves Vertebral Mechanical Properties in the Ovariectomized Rat Model of Postmenopausal Bone Loss. *J Bone Miner Res.* 2015; 30:670-80.

Liu W, Wang T, Yang C, Darvell BW, Wu J, Lin K, Chang J, Pan H, Lu WW. Alkaline biodegradable implants for osteoporotic bone defects-importance of microenvironment pH *Osteoporose Int.* 2015 Jul 2. [Epub ahead of print].

Long JA, Evans HM. The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. Berkely: *Memoirs of the University of California*;1922.

Lowry OH, Rosebrough AL, Farr AL, Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.

Lukacs JL, Reame NE. Concentrations of Follicle-Stimulating Hormone Correlate with Alkaline Phosphatase and a Marker for Vitamin K Status in the Perimenopause. *J Womens Health Gend Based Med.* 2000; 9(7):731-9.

Ma J, Granton PV, Holdsworth DW, Turley EA. Oral administration of hyaluronan reduces bone turnover in ovariectomized rats. *J Agric Food Chem.* 2013;16;61(2):339-45.

Maggio D, Barabani M, Pierandrei M, Polidori MC, Catani M, Mecocci P, Senin U, Pacifici R, Cherubini A. Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: results of a cross-sectional study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(4):1523-7.

- Maklund S. Pyrogallol autooxidation. In Greenwald RA (ed) Handbook of Methods for Oxygen Radical Research CRC, Press Boca Raton, FL. 1985:243-47.
- Maniam S, Mohamed N, Shuid AN, Soelaiman IN. Palm Tocotrienol Exerted Better Antioxidant Activities in Bone than-Tocopherol. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2008;103(1):55-60
- Manske SL, Lorincz CR, Zernicke RF. Bone health: part 2, physical activity. Sports Health. 2009;1(4):341-6.
- Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. Braz J Biol. 2002;62(4a):609-14.
- Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. Eur J Biochem. 1974 Sep 16; 47(3):469-74.
- Martins F, Suzan AJ, Cerutti SM, Arçari DP, Ribeiro ML, Bastos DH. Consumption of mate tea (*Ilex paraguariensis*) decreases the oxidation of unsaturated fatty acids in mouse liver. Br J Nutr. 2009;101: 527-32.
- Masi L, Brandi ML. Physiopathological basis of bone turnover. Q J Nucl Med. 2001;45: 2-6.
- Matsumoto RL, Bastos DH, Mendonça S, Nunes VS, Bartchewsky W, Ribeiro ML, Oliveira Carvalho P. Effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation and total antioxidant status in healthy young women. J Agric Food Chem. 2009;57(5):1775-80.
- Mesali L, Tupkovi E, Kendi S, Bali D. Correlation between hormonal and lipid status in women in menopause. Bosn J Basic Med Sci. 2008;8: 188-92.
- Mishra GD, Kuh D. Health symptoms during mid-life in relation to menopausal transition: British prospective cohort study. BMJ .2011;344:402.
- Mody N, Parhami F, Sarafian TA, Demer LL. Oxidative stress modulates osteoblastic differentiation of vascular and bone cells. Free Radical Biology and Medicine. 2001;31(4):509-19.

Moerman EJ, Teng K, Lipschitz DA, Lecka- Czernik B. Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways. *Aging Cell*. 2004;3: 379-89.

NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy. Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA*. 2001;285:785-95.

Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 9;338(1):668-76.

Noble BS. The osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys*. 2008;473(2):106-11.

Nuttall M. E., Gimble J. M. Is there a therapeutic opportunity to either prevent or treat osteopenic disorders by inhibiting marrow adipogenesis? *Bone*. 2000;27(2):177-84.

Ogunro PS, Bolarinde AA, Owa OO, Salawu AA, Oshodi AA. Antioxidant status and reproductive hormones in women during reproductive, perimenopausal and postmenopausal phase of life. *Afr J Med Med Sci*. 2014 Mar;43(1):49-57.

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *Bone Miner Res*. 1987;2: 595-10.

Patrick G., Sornay-Rendu E., Claustrat B., Delmas P. D. Biochemical markers of bone turnover, endogenous hormones and the risk of fractures in postmenopausal women: the OFELY study. *J Bone Miner Res*. 2000;15(8):1526-36.

Peralta IN, Cogoi L, Filip R, Anesini C. Prevention of hydrogen peroxide-induced red blood cells lysis by *Ilex paraguariensis* aqueous extract: participation of phenolic and xanthine compounds. *Phytother Res*. 2012;27(2):192-8.

Pereira AAF. Chá mate (*Ilex paraguariensis*) melhora a defesa antioxidante e diminui o dano oxidativo em fêmeas Wistar senis [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba; 2013.

Pino AM, Ríos S, Astudillo P, Fernández M, Figueroa P, Seitz G, Rodríguez JP. Concentration of adipogenic and proinflammatory cytokines in the bone marrow supernatant fluid of osteoporotic women. *Bone Miner Res.* 2010;25(3):492-8.

Plank J, Rychlo A. A method for quick decalcification. *Zentralbl Allg Pathol.* 1952; 89:252-54.

Portal Núñez S, Lozano D, Fuente MDL, Esbrit P. Fisiopatología del envejecimiento ósseo. *Revista Española de Geriatria y Gerontología.* 2012,47(3):125-31.

Prior JC, Hitchcock CL. The endocrinology of perimenopause: need for a paradigm shift. *Front Biosci (Schol Ed).* 2011;3:474- 86.

Przygodda F, Martins ZN, Castaldelli APA, Minella TV, Vieira LP, Cantelli K, Fronza J, Padoin M J. Effect of erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) on serum cholesterol, triacylglycerides and glucose in Wistar rats fed a diet supplemented with fat and sugar. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2010;20(6):956-61.

Raffi M.B., Méndez M.C. & Riet-Correa F. Histomorphometric and histological evaluations of the bone lesions caused by fluoride in chickens. *Pesq. Vet. Bras.* 1997;17: 69-76.

Rahman MM, Bhattacharya A, Banu J, Kang JX, Fernandes G. Endogenous n-3 fatty acids protect ovariectomy induced bone loss by attenuating osteoclastogenesis. *J Cell Mol Med.* 2009;13:1833-44.

Rahnama M, Jastrzębska-Jamrogiewicz I, Jamrogiewicz R, Nogalski A, Jagielak M. Influence of hormone replacement therapy on osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand concentrations in menopausal women. *Interferon Cytokine Res.* 2013;33(9):485-92.

Ramírez-Expósito MJ, Sánchez-López E, Cueto-Ureña C, Dueñas B, Carrera-González P, Navarro-Cecilia J, Mayas MD, Arias de Saavedra JM, Sánchez-Agosta R, Martínez-Martos JM. Circulating oxidative stress parameters in pre- and post-

menopausal healthy women and in women suffering from breast cancer treated or not with neoadjuvant chemotherapy. *Exp Gerontol.* 2014;58:34-42.

Reame NE. Gonadotropin changes in the perimenopause. In: Lobo RA, ed. *Perimenopause*. New York: Springer-Verlag, 1997:157.

Research on the menopause in the 1990s. Report of a WHO Scientific Group. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 1996;866: 1-107.

Rosenberg N, Rosenberg O, Soudry M. Osteoblasts in Bone Physiology—Mini Review. *Rambam Maimonides Med J.* 2012;3(2):e0013.

Rucci N. Molecular biology of bone remodelling. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism.* 2008;5(1):49-56.

Sánchez-Rodríguez MA, Ruiz-Ramos M, Correa-Muñoz E, Mendoza-Núñez VM. Oxidative stress as a risk factor for osteoporosis in elderly mexicans as characterized by antioxidant enzymes. *BMC Musculoskelet Disord.* 2007;8:124.

Santoro N, Brown JR, Adel T, Skurnick JH. Characterization of reproductive hormonal dynamics in the perimenopause. *J Clin Endocrinol Metabol* 1996;81: 1495.

Schinella GR, Troiani G, Dávila V, de Buschiazzo PM, Tournier HA. Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;269(2):357-60.

Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(4):549-53.

Schriner SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, Remmen HV, Wallace DC, Rabinovitch PS. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science.* 2005;308(5730):1909-11.

Shan XQ, Aw TY, Jones DP. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol Ther.* 1990;47(1):61-71.

Shang M, Lin L, Cui H. Association of genetic polymorphisms of RANK, RANKL and OPG with bone mineral density in Chinese peri- and postmenopausal women. *Clin Biochem*. 2013;46(15):1493-501.

Shen CL, Yeh JK, Cao JJ, Chyu MC, Wang JS. Green tea and bone health: Evidence from laboratory studies. *Pharmacol Res*. 2011;64: 155-61.

Shen CL, Chyu MC, Wang JS. Tea and bone health: steps forward in translational nutrition. *Am J Clin Nutr*. 2013;98: 1694-9.

Sies H. Role of metabolic H₂O₂ generation: redox signaling and oxidative stress. *J Biol Chem*. 2014;28(13):8735-41.

Sociedade Brasileira de endocrinologia [homepage na internet]. 10 coisas que você precisa-saber-sobre osteoporose [acesso em 17 jul 2015]. Disponível em <http://www.endocrino.org.br/osteoporose>.

Sontakke AN, Tare RS. A duality in the roles of reactive oxygen species with respect to bone metabolism *Clin Chim Acta*. 2002;318(1-2):145-8.

Soules MR, Sherman S, Parrott E, Rebar R, Santoro N, Utian W, et al. Executive summary: Stages of reproductive aging workshop (STRAW) Fertility and Sterility. 2001;76(5):874-78.

Sowers MR, Zheng H, Jannausch ML, McConnell D, Nan B, Harlow S, Randolph JF. Amount of bone loss in relation to time e around the final menstrual period and follicle-stimulating hormone staging of the transmenopause. *J Clin Endocrinol Metab* .2010;95: 2155-62.

Steinbeck MJ, AppelJr WH, Verhoeven AJ, Karnovsky MJ. NADPH-oxidase expression and in situ production of superoxide by osteoclasts actively resorbing bone. *J Cell Biol*. 1994; 126:765-72.

Sugimoto E, Yamaguchi M. Stimulatory effect of Daidzein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochem Pharmacol* .2000; 59: 471-75.

Sullivan SD, Lehman A, Thomas F, Johnson KC, Jackson R, Wactawski-Wende J, Ko M, Chen Z, Curb JD, Howard BV. Effects of self-reported age at nonsurgical

menopause on time to first fracture and bone mineral density in the Women's Health Initiative Observational Study. *Menopause*. 2015 [Epub ahead of print].

Syed FA, Ng AC. The pathophysiology of the aging skeleton. *Curr Osteoporos Rep* 2010;8:235–40.

Taga M, Miller EE, Pratt DE. Chia Seeds as a Source of Natural Lipid Antioxidants. *JAOCS*. 1984;61:928-31

Tantikanlayaporn D, Wichit P, Weerachayaphorn J, Chairoungdua A, Chuncharunee A, Suksamrarn A, Piyachaturawat P. Bone sparing effect of a novel phytoestrogen diarylheptanoid from *Curcuma comosa Roxb.* in ovariectomized rats. *PLoS One*. 2013 Nov 11;8: e78739.

Tarbell JM, Weinbaum S, Kamm RD. Cellular fluid mechanics and mechanotransduction. *Ann Biomed Eng* 33:1719-23.

Theodoro LH, Caiado RC, Longo M, Novaes VC, Zanini NA, Ervolino E, de Almeida JM, Garcia VG. Effectiveness of the diode laser in the treatment of ligature-induced periodontitis in rats: a histopathological, histometric, and immunohistochemical study. *Lasers Med Sci*. 2015 ;30(4):1209-18.

Thurston RC, Joffe H. Vasomotor symptoms and menopause: findings from the Study of Women's Health across the Nation. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2011 ;38(3):489-01.

Tirapeli KG. Alterações em marcadores do estresse oxidativo ocasionadas por diferentes tempos de tratamento com chá mate (*Ilex paraguariensis*) no processo de envelhecimento [dissertação]. Araçatuba: Faculdade de Odontologia de Araçatuba; 2014.

Udomsuk L, Chatuphonprasert W, Monthakantirat O, Churikhit Y, Jarukamjorn K. Impact of *Pueraria candollei* var. *mirifica* and its potent phytoestrogen miroestrol on expression of bone-specific genes in ovariectomized mice. *Fitoterapia*. 2012 ;83(8):1687-92.

Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano

oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova*. 2007;30(5):1323-38.

Vergani L, Floreani MAR, Ceccon M, Napoli E, Cabrelle A, Valente L, Bragantini F, Leger B, Dabbeni F. Antioxidant defences and homeostasis of reactive oxygen species in different human mitochondrial DNA-depleted cell lines. *Eur J. Biochem*. 2004;271(18):3646-56.

Victorin VJ, Panis C, Campos FC, Cayres RC, Colado-Simão AN, Oliveira SR, et al. Decreased oxidant profile and increased antioxidant capacity in naturally postmenopausal women. *Age*. 2013;35:1411-21.

Villanueva C, Kross RD. Antioxidant-induced stress. *Int. J. Mol. Sci*. 2012;13(2):2091-109.

Woodard GA, Mehta VG, Mackey RH, Tepper P, Kelsey SF, Newman AB, Sutton-Tyrrell K. C-reactive protein is associated with aortic stiffness in a cohort of African American and white women transitioning through menopause. *Menopause*. 2011;18(12):1291-7.

Xu XJ, Shen L, Yang YP, Zhu R, Shuai B, Li CG, Wu MX. Serum β -Catenin Levels Associated with the Ratio of RANKL/OPG in Patients with Postmenopausal Osteoporosis *Int J Endocrinol*. 2013; 2013: 534352.

Yeh CT, Yen GC. Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistance-associated protein 3 mRNA expression. *J Nutr*. 2006;136(1):11-5.

Yu BP, Suescun EA, Yang SY. Effect of age-related lipid peroxidation on membrane fluidity and phospholipase A2: modulation by dietary restriction. *Mech Ageing Dev*. 1992;65(1):17-33.

Zhang J, Lazarenko OP, Wu X, Tong Y, Blackburn ML, Gomez-Acevedo H, Shankar K, Badger TM, Ronis MJ, Chen JR. Differential effects of short term feeding of a soy protein isolate diet and estrogen treatment on bone in the pre-pubertal rat. *PLoS One*. 2012;7(4):e35736.

Zhang DW, Deng H, Qi W, Zhao GY, Cao XR. Osteoprotective effect of cordycepin on estrogen deficiency-induced osteoporosis in vitro and in vivo. *Biomed Res Int*. 2015 :423869.

Zhang J, Lazarenko OP, Wu X, Tong Y, Blackburn ML, Gomez-Acevedo H, Shankar K, Badger TM, Ronis MJ, Chen JR. Differential effects of short term feeding of a soy protein isolate diet and estrogen treatment on bone in the pre-pubertal rat. *PLoS One*. 2012;7(4):e35736.

Zhao S, Zhang YK, Harris S, et al. MLO-Y4 osteocyte-like cells support osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res* 2002;17:2068-79.

Zitňanová I, Rakovan M, Paduchová Z, Dvořáková M, Andrezálová L, Muchová. Oxidative stress in women with perimenopausal symptoms. *Menopause*. 2011;18(11):1249-55.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Alterações em marcadores teciduais e sanguíneos de estresse oxidativo" sob responsabilidade da Pesquisadora ANA CLÁUDIA DE MELO STEVANATO NAKAMUNE e colaboração de Keny Gonçalves Tirapeli, Adriane Belló Klein, Susana Francisca Llesuy, Rita Cássia Menegati Dornelles e Camila Scacó Pereira está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo FOA-00462-2013.

CERTIFICATE

We certify that the research "Changes in tissue and blood markers of oxidative stress, induced by different mate tea (*Ilex paraguariensis*) treatments", process number FOA-00462-2013, under responsibility of ANA CLÁUDIA DE MELO STEVANATO NAKAMUNE and with collaboration of Keny Gonçalves Tirapeli, Adriane Belló Klein, Susana Francisca Llesuy, Rita Cássia Menegati Dornelles and Camila Scacó Pereira agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. EDILSON ERVOLINO
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

Anexo 2. Artigo submetido para a revista científica PLoS One

Title

Low dose of mate tea (*Ilex paraguariensis*) minimized oxidative damage and improved bone quality in perimenopausal female rats

Authors

Camila Scacco Pereira¹, Camila Tami Stringhetta Garcia¹, Antonio Hernandes Chaves Neto¹, Karina Stringhetta Padovani², Keny Gonçalves Tirapeli¹, Ariana Aparecida Ferreira Pereira¹, Giselli Mitsuy Kayahara³, Mário Jefferson Quirino Louzada⁴, Edilson Ervolino¹, Marcelo Macedo Crivelini³, Andréia Machado Leopoldino², Adriane Belló-Klein⁵, Susana Francisca Llesuy⁶, Rita Cássia Menegati Dornelles¹, Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune¹

Affiliations

¹Department of Basic Sciences, Programa Multicêntrico de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, Univ Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, SP, Brazil

²Department of Clinical Analysis, Toxicological and Bromatological college of pharmaceutical sciences of Ribeirão Preto, Univ Sao Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil

³Departament of Pathology and Clinical Propaedeutics, Univ Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, SP, Brazil

⁴Departament of Support, Animal Production and Health, Univ Estadual Paulista (UNESP), Aracatuba, SP, Brazil

⁵Department of Physiology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

⁶Department of Analytical Chemistry and Physical Chemistry -School of Pharmacy and Biochemistry, University of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

* Corresponding author

E-mail: anacmsn@foa.unesp.br

Abstract

One of the most important manifestations of perimenopause is osteoporosis, a chronic and progressive disease that affects approximately 200 million women worldwide and is a health and social huge problem. This degenerative skeletal disorder is characterized by low bone mass (osteopenia) and bone architectural deterioration, and have been associated to oxidative stress. Based in MT effectiveness in reducing oxidative damage and modify enzymatic e non enzymatic defense in different tissues of natural perimenopausal rats, we investigated for the first time, the effect of mate tea treatment (20 mg/ kg mc / day), during four weeks, on femur of this animal model. Females Wistar rats, allocated in adult group (AD, six months), perimenopausal group (PE, 18 months) and perimenopausal treated with MT (PM+MT, 18 months) were investigated. After treatment, total antioxidant capacity and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) were investigated in plasma. Bone mineral density (BMD), area occupied by adipocyte (AOA), osteocyt number (N.Ot), trabecular bone volume (TBV) and immunohistochemistry (TRAP, OPG, RANKL, SOD2) were investigated in neck femur. Lipid oxidative damage (MDA) was investigated in bone homogenate. MT reverts BMD decrease and this results are associated with improves on bone architecture, reduced osteoclasts activity and decrease in oxidative damage. Taken together, the results of this investigation indicate that the use of MT in perimenopause can assist in maintaining the bone structure and thus the quality of life in females.

Introduction

Natural menopause is defined a period with 12 months of amenorrhea followed by reduced ovarian hormone activity in the absence of surgical or hormonal induction. This period is preceded by perimenopause that may start years before final menstrual [1] and is characterized by hormonal, somatovegetative and psychosocial changes, that include hot flashes, night sweats, heart palpitation, nervousness, depression, sleep disturbance [2]. One of the most important manifestations of perimenopause is osteoporosis [3] a chronic and progressive disease that affects approximately 200 million women worldwide and is a health and social huge problem [4].

Osteoporosis is a degenerative skeletal disorders characterized by low bone mass (osteopenia) and microarchitectural deterioration and results of disruption of bone turnover, comprising bone resorption and formation, process that involve osteoclasts and osteoblasts activities respectively [5]. Those metabolic changes culminate in reduced bone mineral density (BMD), deterioration of bone microarchitecture with a decrease in the trabecular bone volume (TBV) and reduction of osteocytes number (N.Ot) that culminate on decrease in resistance and increased risk of bone fragility and fracture [3]. Oxidative stress, defined as an imbalance between the cellular productions of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defenses [6], plays a key role in the osteoporosis [7]. During both periods of menopause, post-menopause and perimenopause, there is an increment of the oxidative stress [1] as result of increased generation of ROS and decreased in antioxidant defenses. The accumulation of this species leads to overexpression of RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, NF- κ B) which enhance

osteoclasts function and induce bone loss [8]. Furthermore, the intracellular generation of ROS enhanced levels of osteoclast differentiation and activities supported by increase of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) positive multinucleated cells [9]. Accumulation of lipid peroxidation products, like malondialdehyde (MDA) is another effect of the oxidative stress that privileges bone absorption and change in the osteoprotegerin (OPG)/RANKL, one of the factors that regulate bone mass [10].

Several natural products with antioxidant activity have been used in an attempt to minimize bone loss associated with aging, menopause and oxidative stress. Among the most studied is *Camellia sinensis*, from which green tea is prepared [11]. Recently a chronic consumption of mate tea (MT) was associated with increased BMD in postmenopausal women, however the mechanisms involved in this effect was not investigate [12]. MT is a beverage prepared by infusion of *Ilex paraguariensis* also known as Mate or Yerba Mate. This specie is native from countries in South America such as Argentina, Paraguay, Uruguay and Brazil and stands out for its high antioxidant power [13]. MT reduces oxidative damage in different tissues [14] and preliminary studies conducted in our laboratory demonstrated ability of this tea to decrease MDA in erythrocytes, liver and pancreas of the natural perimenopausal rats [15,16]. The increases in activity and/or expression of antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD EC 1.15.1.1) have been appointed at least in part, as the cause of this [6]. SOD comprises a family of enzymes that removes superoxide ($O_2^{\cdot-}$) and catalyzes the production of hydrogen peroxide (H_2O_2). These enzymes are considered the first line of defense against the damaging effects of ROS [17]. While reducing the activity and / or total SOD expression in response to aging and menopause has been widely described and associated with increased oxidative damage, it is known that expression of protein SOD2 (Mn-SOD) is increased in osteoporosis specimens

characterized by BMD reduction [17,18]. SOD2 is an isoform responsible for the dismutation of $O_2^{\cdot -}$ produced in the mitochondrial electron transport chain. SOD2 gene is highly inducible, responsive to oxidative stress, inflammatory cytokines, neurotrophic factors and hormones. Recently increases in expression of this gene have been associated with osteoporosis in women [17]. The major transcriptional inducers of this gene are NF- κ B (nuclear factor kappa B), SP-1 (family of Sp/KLF transcription factors), CREB (cAMP responsive Element Binding protein), and FoxOs (family of O transcription factors), important in the generation of ROS [19].

Non enzymatic plasma antioxidant defense represents low molecular weight molecules, and can be determined by FRAP assay. Natural perimenopausal rats have a reduction in plasma FRAP [15, 16], and loss of BMD has been associated with decrease in plasma antioxidant in aging [20] and postmenopausal females [21, 22].

Considering that BMD losses are accentuated in perimenopause and osteoporosis increases substantially after this period, adopt strategies that can preserve bone health during perimenopause would result in improved quality of life for women. Based in MT effectiveness in reducing oxidative damage and modify enzymatic e non enzymatic defense in different tissues of natural perimenopausal rats; in ability of this tea in improving BMD in post-menopause by unknown mechanisms, the aim of this study was to investigate MT effects in bone of natural perimenopausal rats.

Materials and Methods

Ethics Statement

This study proceeded in strict accordance with the recommendations described in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of

Health. The Committee for the Ethics of Animal Experiments at School of Dentistry of Araçatuba, UNESP- State University of São Paulo approved the experimental protocol (Permit Number: 00462-2013). The rats were anesthetized with intraperitoneal pentobarbital sodium (50 mg/kg body weight) and sacrificed by exsanguination from the heart puncture at the end of the experiment, and all efforts were made to minimize suffering.

Preparation of MT

The instant tea powder (Leão Jr. ®, Curitiba, PR, and Brazil) was obtained in the local market and the same batch (7891098000088) was used during the whole experiment. To MT analysis, the tea was prepared in pure water (0.05 g/mL) at room temperature [24] to subsequent determination of total polyphenol, antioxidant capacity and mass spectrometry assay. To animals treatment MT was prepared daily by dissolving instant MT powder in pure water (8 mg/mL) using a homogenizer [24], immediately before the administration.

Total polyphenol content of MT

The total polyphenol content of MT was estimated using the method of Folin-Ciocalteu, as described in Taga and collaborators [25]. This method consists in adding 20 μ L of MT to a solution of Na_2CO_3 2% (w/v) and, after 2 minutes, added Folin 1:1 (v/v). The incubation period was 30 minutes and absorbance was determined at 750 nm. The total polyphenol concentration was expressed in mg/g instant MT powder, using a standard curve of gallic acid.

Total antioxidant capacity of MT (FRAP assay)

Total antioxidant capacity of MT was assessed according to Benzie and Strain [26], method based on reducing the ferric complex tripyridil triazine (Fe^{3+} -TPTZ) to form Fe^{2+} in acidic medium. The absorbance was estimated at 595 nm, using a standard curve of ferrous sulfate.

Mass Spectrometry of MT

MT was analyzed by electrospray ionization (ESI) and multistage fragmentation held in an interface-type ion-trap (IT). The negative mode was chosen. For generation and analysis of first-order mass spectra (MS) and for the remaining experiments in multiple stages (MS_n), the subsequent parameters were followed: capillary voltage of -4 V, spray voltage of -5 kV, capillary temperature 280°C, carrier gas (N_2) flow 60 (random units). The track acquisition was m/z 150-1500, with two or more events performed simultaneously. The first event was a full scan spectrum of masses to collect data on ions in the range m/z established. The remaining events were MS_n experiments conducted from data for the first scan pre-selected precursor ions with collision energy between 20 and 30% of the total energy of the instrument. The Xcalibur (Thermo Scientific ®) software was used for collection and processing of spectral data. Mass Spectrometry analysis were realized in Department of Organic Chemistry, Chemical Institute, Univ Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, SP, Brazil.

Animals and experimental design

In this investigation were used adults females with regular estrous cycle and perimenopausal females with longer and irregular cycle. To confirm that rats used in this approach have the characteristics described was realized the monitoring of

estrous cycle of animals from the beginning to the end of the experiment. The stages and duration of the estrous cycle were monitored by microscopic examination of vaginal smears as described by Le Fevre and McClintock [27]. In female rodents, the estrous cycle lasts an average of four to five days and is divided in phases, named proestrus, estrus, metaestrus and diestrus. The proportion of cornified epithelial cells, nucleated epithelial cell and leukocytes was used to set the phase of the estrous cycle [27]. Regular cycles in rats have four to five-day while irregular cycles have six days or more [28]. The longer and irregular cycle with more than 75% of days in the epithelial phase (proestrus or estrus) characterized perimenopausal period [28, 29].

In this investigation four and 16 months aged female of *Rattus novogicus albinus*, variety Wistar were obtained from the biotherium of Araçatuba Dental School, Univ. Estadual Paulista – UNESP. The animals were housed in a sanitary ventilated animal room under a controlled temperature ($22^{\circ} \pm 2C$) relative humidity between $55 \pm 10\%$ and a 12 h/ 12 h light-dark cycle. The rats were acclimated during 15 days to the environment (Figure 1). Diet of rodent chow standard (Labina, Purina Brazil) and water were available *ad libitum* during all experiment.

Adult females with regular estrous cycle were allocated in Adult group (AD) that received water (0.5 mL) by gavage, daily, during four weeks. Perimenopausal rats were randomly distributed into two groups: Perimenopausal (PM) and Perimenopausal treated group with MT (PM+MT). PM+MT group received MT (20 mg / kg mc / day, maximum volume 0.5 mL) by gavage, daily, during four weeks and PM group received water (0.5 mL) during the same period (Figure 1). The MT was prepared according to the manufacturer's instructions. The body mass was accompanied weekly and the consumption of water and food daily.

Plasma obtaining

Blood obtained by cardiac puncture (8 mL), during exsanguination of the animals was transferred to heparinized tubes and centrifuged at 1,000 x g for 15 min at 4 °C (Centrifuge 5810R- rotor S-4-104, Eppendorf, USA). Plasma was removed by aspiration and then frozen at -80 °C until realization the analysis of plasma antioxidant capacity and plasma TRAP.

Plasma antioxidant capacity (FRAP assay)

Plasma antioxidant capacity was assessed according to Benzie and Strain [26] as described above, using a plasma aliquot (18 µL).

Plasma tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity

Plasma tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity, a bone resorption marker, was determined using *p*-nitrophenylphosphate (*p*-NPP) as the substrate [30]. Plasma was incubated for one hour at 37^o C with 100 mmol / L, *p*-NPP in 100 mmol/L sodium acetate buffer (pH 5.0), containing 1mol / L sodium tartrate. After incubation period NaOH (0.5 mol / L) was added to stop the reaction and the absorbance was monitored (400 nm) to detect product formation, 4-nitrophenyl (4-NPP). The results were expressed as units of enzyme activity per milligram of protein (UE/mg). The protein concentration was determined by the biuret method using the Total Protein Kit Bioclin® (Minas Gerais, Brazil), following the manufacturer's instructions.

Analysis of bone structure

Bone preparation

Both femurs were removed immediately after animals' death and cleaned of adhering soft tissues. Left femurs were kept in NaCl (0.9% w/v) at -20 ° C, until realization the analysis of BMD and MDA in bone homogenate.

The right femurs were decalcified in Plank-Rychlo solution (aluminum chloride 0.3 M, HCl 3% w/v, formic acid 5% w/v, trichloroacetic acid 5% w/v , in distilled water) [31] for eight to nine days and subjected to conventional histologic process. After decalcification the structures were cut into two fragments, the first of the transverse shaft region, as suggested by Parffit and collaborators [32] and the second longitudinal fragment between the femoral head and the greater trochanter, thereby observing the region femoral neck (Figure 2) [33]. The specimens were embedded in paraffin by routine technique, practiced in the Pathology Laboratory, Department of Pathology and Clinical Propedeutics of the School of Dentistry of Araçatuba, UNESP- State University of São Paulo. The obtained blocks were made longitudinal semi series with three micrometers thick. Sections were stained with hematoxylin-eosin or submitted to immunochemistry.

Histologic analyses

Histologic analysis was realized in sections that were stained with hematoxylin-eosin and it was conducted by using the following parameters: number of osteocytes (N.Ot), trabecular bone volume (TBV) and area occupied by adipocytes (AOA) expressed in percent, according to Raffi and collaborators [33]. The capture of images of the slides for histologic analyses was performed with the aid of an optical microscope LEICA DM4000B in 100x magnification and analyzed in an area of 100 square microns, just below the growth line. In the same region it was realized the measurements of TBV using a Grid Mask containing 121 points and realized a count

of the number of osteocytes (N.Ot), obtaining with the aid of a manual count LAS V4.2 software tool (Leica Application Suite).

Immunocytochemistry

Immunocytochemistry was realized in femoral neck of left femur using an indirect immunoperoxidase technique for the primary goat anti-TRAP (SC 30832), anti RANKL (SC 12A380) and anti OPG (SC 8468) both of Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), diluted 1:100 in PBS containing 0.3% Triton X-100, for 24 h in a humid chamber at 4°C. After several washes in PBS, the sections were incubated at room temperature with biotinylated anti-goat IgG (Dako Laboratories, Carpinteria, CA, USA) for 1 h. Subsequently, they were washed in PBS and placed for 1 h in Streptavidin-HRP complex (Universal Dako Labeled -HR, Streptavidin-Biotin Kit®, Dako Laboratories). Peroxidase activity was revealed by 3, 3-diamino benzidine tetrachloride (DAB chromogen Kit, Dako Laboratories). After rinses in PBS the sections were counter-stained with Harris-Haematoxylin. In each animal were analyzed six histologic sections of the femoral neck, with an increase of 400 times. A semi-quantitative analysis was realized in the histological sections under bright field illumination optical microscope (Optiphot-2, Nikon, Japan) by a trained investigator blinded to the experimental groups that were being analyzed. The criteria for the establishment of scores were based on Garcia and collaborators [34], as follows: score 0, no immunolabeling (total absence of immunoreactivity [IR] in cells); 1, low immunolabeling (IR in $\approx 1/4$ of cells per area); 2, medium immunolabeling (IR in $\approx 1/2$ of cells per area); and 3, high immunolabeling (IR) in $\approx 3/4$ of cells per area).

A similar procedure was used for determination of SOD2 with some modifications. Antigen retrieval was performed with buffer pH 6.0, the blocking of the

activity endogenous peroxidase activity was carried out with 3% hydrogen peroxide, as the primary antibody was used anti- SOD2 (Abcam, código ab13534,) with a dilution of 1:1000 overnight and as secondary antibody it was used Biotinylated Link Universal and Streptavidin-HRP (Dako, LSAB+System-HRP, código K069011-2), sections were counter-staining with Mayer- Haematoxylin.

Areal bone mineral density (BMD)

Areal BMD (g/cm^2), a property is strongly correlated with fracture risk [35], of the entire left femur was measured by Dual-Energy Absorptiometry using a Lunar DPX Alpha, WI, USA, with special software for small animals practiced in the laboratory of biophysics, Department of Biophysics of the college of veterinary medicine of Araçatuba, UNESP- State University of São Paulo .

Measurement of malondialdehyde (MDA) in bone homogenate

Immediately after the analysis of BMD, the entire left femur was used to prepared homogenate (10%, w/v) using potassium chloride (150 mmol/L) [36] .The bone homogenate was centrifuged (1,000 x g, 10 min, 4 °C, Centrifuge 5810R- rotor S-4-104, Eppendorf, USA) and supernatant was taken for MDA analysis. MDA was determined as described by Buege and Aust [37]. Trichloroacetic acid (10% w/v) was added to the sample to precipitate proteins and to acidify the medium. This mixture was then centrifuged (1,000 x g, 3 min) and thiobarbituric acid (0.67% w/v) was added to the reaction medium. The sample was placed in a water bath (100 °C, 15 min). Absorbance was read at 535 nm, the molar absorption coefficient used was $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. The results were expressed as protein concentration that was determined by the biuret method.

Statistical analysis

All Data (means \pm standard deviation) were analyzed using the GraphPad Prism, version 5.0. Normality was confirmed by the KS test (Kolmogorov-Smirnov). Unpaired Student *t* test was used to compare PM to AD groups, PM and PM+MT groups. The level of significance was set with $p < 0.05$.

Results

Characterization of mate tea

The phytochemistry of this commercial product (Figure 3) had been characterized [38] and we confirmed in the batch used in our experiment the presence of *cis* 3-CQA, 5-*p*-CoQA, CeQA, 4C,5 *p*CoQA and *cis*, 4,5-diCQA, the main chlorogenic acids of MT. The analysis of total polyphenols showed 113.37 mg/g powder, and FRAP was estimated in 534.67 mmol/L.

Validation of the rats group used in this study

The duration of the estrous cycle (Figure 4) was significantly prolonged in PM and PM+MT compared to AD group which characterizes the perimenopause in rats. We also identified a regular estrous cycle in AD group and a disturbed cycle in the PM group, during all experimental period. These changes in estrous cycle of perimenopausal rats were not affected by MT treatment

Mate does not alter the feed intake, water consumption and body weight

Treatment with MT during four weeks did not change the water consumption, feed intake and body weight. (Table 1). These results are very important because they

indicate that the reduction of oxidative damage observed in females in perimenopause it is not caused by caloric restriction and is not associated to loss of body mass.

MT attenuates bone deterioration in perimenopausal rats

Figure 5 show that MT attenuates reduction of BMD in perimenopausal females. PM group showed decline of 28.5% ($p < 0.05$) in BMD compared to AD group, treatment with MT for four weeks resulted in a significant increase by 11.4 % ($p < 0.05$) in BMD.

MT increases trabecular bone volume, number of osteocytes and decreases area occupied by adipocytes

Two-dimensional histomorphometric analysis of the femur neck (Figure 6 A) shows that bone architecture was modified adversely by perimenopausal and MT reverted those bone alterations. When PM group was compared to AD, decrease in N.Ot (60%, $p < 0.05$) and TBV (24.9%, $p < 0.05$) followed by increase in AOA (40 %, $p < 0.05$) were observed (Figure 6 A). MT improved N.Ot (61.7%, $p < 0.05$) and TBV (14.6%, $p < 0.05$) but reduces AOA.

Mate tea ameliorates the pattern of immunostaining of bone metabolism markers and the plasma TRAP

TRAP is a marker of osteoclast which when monitored in the plasma reflects the activity of the bone reabsorption. Perimenopause resulted in increased of the plasma TRAP, which was reversed by the MT treatment. The treatment also reduced TRAP immunostaining in bone. Plasma TRAP (Figure 7) was found to be 8.3% higher ($p < 0.05$) in the PM group compared to the AD group, the treatment with MT reduced by

11.6% ($p < 0.05$) amounts of TRAP. In the AD (Figure 8A) and PM groups (Figure 8B) prevailed a high standard of immunostaining (score 3) to TRAP, while a moderate pattern (score 2) was observed in females receiving MT (Figure 8C).

MT treatment also ameliorated RANKL and OPG, two mediators of osteoclastogenic differentiation. RANKL in AD (Figure 8D) and PM (Figure 8E) groups showed a pattern of moderate immunostaining (score 1 and score 2 respectively), while in the PM+MT (Figure 8F) prevailed a low standard of immunostaining (score 1), OPG in the AD group (Figure 8G) showed a moderate pattern of immunostaining (score 2), in the PM group (Figure 8H) lower standard immunostaining (score 1) and in the PM+MT (Figure 8I) prevailed a pattern of moderate immunostaining (score 2).

Results related to the oxidative state: FRAP, MDA and SOD2 in bone

Figure 9 shows MT ameliorated plasmatic non enzymatic defense (A) and lipid oxidative damage in bone homogenate (B) of perimenopausal rats. PM group showed values 18 % lower in FRAP and compared with AD group, treatment with MT for four weeks resulted in a small but statistically significant increases by 3.1% ($p < 0.05$) in FRAP (PM+MT group). MDA showed 21.4% ($p < 0.05$) higher in the PM group compared to the AD group. After MT treatment there was an increase of 14, 9% ($p < 0.05$) in the PM+MT compared to PM group. In relation of immunostaining for SOD2 (Figure 10) PM+MT group showed a moderate pattern of immunostaining (score 2), AD group lower pattern (score 1) and PM a high pattern of immunostaining (score 3).

Discussion

The aim of this study was to investigate the MT effects in bone of natural perimenopausal rats. Low dose of MT during four weeks reverts BMD decrease. This results are associated with improves on bone architecture, reduced osteoclasts activity and decrease in oxidative damage.

These results reinforce the idea that the improvement in bone structure following treatment with MT results from a lower osteoclast activity

There are different commercial forms of the Yerba Mate for the preparation of MT such as roasted leaves, individual tea bags and instant MT powder, obtained by aqueous extract of the roasted leaves atomization. We chose to instant MT tea powder (Leão Jr. ®, Curitiba, PR, Brazil) that has been used in studies conducted with different animal models, daily doses between 500 and 2,000 mg / kg bw [14, 38], and that showed to be effective in improving the antioxidant defense [14, 38]. A similar effect was verified in humans, with daily amounts between 2.5 to 5.0 g [40] in volumes from 200 to 500 ml respectively. We opted for a low dose (20 mg / kg bw), equivalent to human consumption of 300 ml (1½ Brazilian cup) per day of MT, since previous studies from our laboratory have shown that this dose was effective in decrease oxidative stress in erythrocytes, liver and pancreas of the same animal models, during different treatment times [15, 16].

MT has a high polyphenol content, mainly chlorogenic acids, which an elevated antioxidant capacity [38]. The polyphenol content observed for us (113.37 mg/g of powder) in this report was less than that described by Arçari et al., 2009 (348.80 mg/g of powder). This difference must result to standard solution, acid galic or chlorogenic respectively, and analytics methods. The chlorogenic acids cis 3-CQA, 5-p-CoQA, CeQA, 4C,5-pCoQA and cis, 4,5-diCQA described by other authors [38] in soluble MT powder were confirmed in this work. To prove antioxidant activity of MT used in this

work, it performed the FRAP assay. There are no information about antioxidant capacity of instant MT powder, estimated by FRAP assay, but this methods was validated in roasted mate tea [40].

The MT dose (20 mg / kg bw) used in this report did not affect body weight, corroborating Tirapeli [16] and Pereira [15], those used the same dose during two, four, six and eight weeks. Another authors reported the ability of the MT in reduced body weight, when male obese adult rats was treated for eight weeks (1 g/ kg bw) [38] and female adult rodents, 60 days (5 g/ kg bw) [41]. In this context, our results are very important once reduced oxidative stress is associated with lower caloric intake or body mass reduction [38].

Decrease in BMD is a major characteristic of the osteoporosis, and monitoring this parameter is essential for diagnosis and treatment of these conditions [35]. In postmenopausal period this reduction is very well defined [42]. In perimenopausal period, the BMD decrease has been observed in rats [43, 44] and humans [1, 42]. Corroborant the literature, in natural perimenopausal model used in this investigation, BMD decrease 28.5% compared to adult rats and dose of MT used in this investigation proved effective in minimizing the loss of BMD. There is only study that demonstrated MT ability in increase BMD in postmenopausal women, after consume of at least 1 L of Yerba Mate per day, but have not identified the mechanisms involved in the process [12]. Natural teas such as green tea, black tea and white tea, derived from *Camellia sinensis*, have been used to improve BMD in postmenopausal females. These teas have active components that scavenging ROS and its consumption decreased the bone absorption [11, 13]. Others natural products, like *Pueraria mirifica*, *Curcuma comosa Roxb* [43,44] have been used to minimize osteoporosis in postmenopausal period in animal surgical model, and the effects of them were attributed in parts to

phytoestrogen activity [44]. The effect of MT used in this work does not seem to be associated with this activity, since the no alteration on pattern of the estrous cycle of rats in perimenopause was observed. These findings reinforce previous studies from our laboratory using the same dose of MT for periods of two, four and six weeks [15] and eight weeks [16]. In the last investigation, plasma levels estrogen was quantified and no difference was observed after MT treatment.

Decline on BMD observed in osteoporosis and osteopenia is accompanied by an increase in marrow fat [46], as resulted of the imbalance between osteogenesis and adipogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. In these situations the differentiation process favors adipocyte lineage and may result in inadequate bone formation and excessive fat production [46]. It had been observed that MT reduced the AOA that it was higher in PE group. The ability of MT in modulates adipogenesis, by regulating the gene expression levels of pro-adipogenic transcription factors [47], in vivo and in vitro had already been demonstrated [47], but this is the first time that the MT action is reported in the bone. The BMD alteration in postmenopausal rats is followed by decrease in TBV and the N.Ot, as observed by Tantikanlayaporn and collaborators (2013) using a chirurgical model of ovariectomized rats. In perimenopausal rats this bone alterations softened by MT. This MT action resulted to decrease in osteoclastic activity, proven by TRAP in plasma and TRAP protein expression in bone homogenate. Bone BMD is influenced by the rate of bone turnover [45] that may be monitoring by plasma biochemical markers, like TRAP, a tartrate-resistant acid phosphatase phosphatase acid isoenzyme, a typical marker of osteoclasts function [49]. These data support the observed in postmenopausal rats [50] and humans [51]. Green tea [48] and *Curcuma comosa Roxb* [43] ameliorated

TBV and N.Ot in postmenopause, and this results were attributed to reduced osteoclastic activity [43, 48] associated with oxidative stress decrease [48].

To prove that MT effects on BMD was associate to reduced osteoclasts activity, we investigated RANKL, a key factor for osteoclast differentiation and activation, which expression is activated by oxidative stress [52]. We also investigated the osteoclastogenesis inhibitory factor OPG, a decoy receptor for the RANKL [12]. Both factor were ameliorate after MT treatment on perimenopausal rats. Similar effect had been demonstrated to *Camellia sinensis* teas, whose ability to decreased the bone absorption was attributed to reducing osteoclastogenesis, by inhibiting a signaling pathway it dependent on RANKL [11, 13] .

Oxidative stress plays a key role in the osteoporosis [53]. The relationship between the increase of oxidative stress and BMD reduction in senile postmenopausal females has been pointed out by different authors [54], but the data are contradictory and inconsistent when taking into account the perimenopause. In present study, the decreased BMD in perimenopausal rats was accompanied by significant lower antioxidant activity in plasma, like demonstrated in postmenopausal female [21] or aging [21], and increased in MDA levels on bone, reported in bone of rats ovariectomized [28] and plasma of the postmenopausal women [22]. In this study, the improvement in BMD after treatment with MT was accompanied by a reduction in bone oxidative damage, but can not be associated with non enzymatic antioxidant defense, since the increase in plasma FRAP, although statistically significant, was only 5 %. This result is not surprising, since the ability of MT to raise plasma FRAP is time dependent [16].

Increased oxidative damage may be the result of reducing the enzymatic antioxidant defense. In natural perimenopausal rats, increases in MDA levels were

associated with decreased activity of antioxidant enzyme SOD in erythrocytes and liver [15, 16]. Reductions in antioxidant defense in the bone structure of females were described earlier and decrease in activity of SOD have been appointed at least in part, as the cause of this [36]. MT increases SOD and GPx activity in erythrocytes and liver of the perimenopausal rats [15, 16], but the involvement of these enzymes in bone MDA reduction has not been investigated in this work. However, we evaluated the expression of SOD2 protein on bone. This isoenzyme is required to maintain osteoclast differentiation and function [18], and in osteoporotic women, was observed an inverse relationship with SOD2 and BMD [17]. Corroborant these findings, we observed increase in SOD2 protein expression in femur of perimenopausal rats, which was reduced after MT treatment. These results reinforce the idea that the improvement in bone structure following treatment with MT results from a lower osteoclast activity.

Conclusion

Taken together, the results of this investigation indicate that the use of MT in perimenopause can assist in maintaining the bone structure and thus the quality of life in females.

References

1. Victorin VJ, Panis C, Campos FC, Cayres RC, Colado-Simão AN, Oliveira SR, et al. Decreased oxidant profile and increased antioxidant capacity in naturally postmenopausal women. *Age*. 2013;35: 1411-1421.
2. Mesali L, Tupkovi E, Kendi S, Bali D. Correlation between hormonal and lipid status in women in menopause. *Bosn J Basic Med Sci*. 2008;8: 188-192.

3. Research on the menopause in the 1990s. Report of a WHO Scientific Group. World Health Organ Tech Rep Ser. 1996;866: 1-107.
4. Lane NE. Epidemiology, etiology, and diagnosis of osteoporosis. Am J Obstet Gynecol. 2006;194: 3–11.
5. Masi L, Brandi ML. Physiopathological basis of bone turnover. Q J Nucl Med. 2001;45: 2–6.
6. Halliwell. Reactive oxygen species and the central nervous system. J. Neurochem. 1992;59: 1609–1623.
7. Syed FA, Ng AC. The pathophysiology of the aging skeleton. Curr Osteoporos .2010; 8: 235–240.
8. Baek KH, Oh KW, Lee WY, Lee SS, Kim MK, Kwon HS, et al. Association of oxidative stress with postmenopausal osteoporosis and the effects of hydrogen peroxide on osteoclast formation in human bone marrow cell cultures. Calcif Tissue Int. 2010;87: 226–235.
9. Koh JM, Lee YS, Kim YS, Kim DJ, Kim HH, Park JY et al. Homocysteine enhances bone resorption by stimulation of osteoclast formation and activity through increased intracellular ROS generation. J. Bone Miner Res. 2006; 21: 1003–1011.
10. Huang MS, Morony S, Lu J, Zhang Z, Bezouglaia O, Tseng W, et al. Atherogenic phospholipids attenuate osteogenic signaling by BMP-2 and parathyroid hormone in osteoblasts. J Biol Chem. 2007;282: 21237–21243.
11. Shen CL, Yeh JK, Cao JJ, Chyu MC, Wang JS. Green tea and bone health: Evidence from laboratory studies. Pharmacol Res. 2011;64: 155-161.
12. Conforti AS, Gallo ME, Saraví FD. Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) consumption is associated with higher bone mineral density in postmenopausal women. Bone. 2012;50: 9–13.

13. Heck CI, de Mejía EG. Yerba Mate tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *J Food Sci* 2007;72: 138–151.
14. Martins F, Suzan AJ, Cerutti SM, Arçari DP, Ribeiro ML, Bastos DH. Consumption of mate tea (*Ilex paraguariensis*) decreases the oxidation of unsaturated fatty acids in mouse liver. *Br J Nutr*. 2009;101: 527–532
15. Pereira AAF. Mate tea (*Ilex paraguariensis*) improves the antioxidant defense and decreases oxidative damage in senile female Wistar. M.Sc. Thesis, School of Araçatuba Dentistry - Universidade Estadual Paulista. 2013. Available in: <http://acervodigital.unesp.br/handle/unesp/233852>.
16. Tirapeli KG. Changes in markers of oxidative stress caused by different treatment times with mate tea (*Ilex paraguariensis*) in the aging process. M.Sc Thesis, School of Araçatuba Dentistry - Universidade Estadual Paulista. 2014. Available in: <http://acervodigital.unesp.br/handle/unesp/233852>.
17. Deng FY, Lei SF, Chen XD, Tan LJ, Zhu XZ, Deng HW. An integrative study ascertained SOD2 as a susceptibility gene for osteoporosis in Chinese. *J Bone Miner Res*. 2011;26:2695-2701.
18. Guo T, Zhang L, Konermann A, Zhou H, Jin F, Liu W. *Manganese superoxide dismutase is required to maintain osteoclast differentiation and function under static force*. *Sci Rep*. 2015;26:8016.
19. Pani G1, Koch OR, Galeotti T. The p53-p66shc-Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD) network: a mitochondrial intrigue to generate reactive oxygen species. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41:1002-1005.

20. Sánchez-Rodríguez MA, Ruiz-Ramos M, Correa-Muñoz E, Mendoza-Núñez VM. Oxidative stress as a risk factor for osteoporosis in elderly mexicans as characterized by antioxidant enzymes. *BMC Musculoskelet Disord*. 2007;8: 124.
21. Ishii S, Miyao M, Mizuno Y, Tanaka-Ishikawa M, Akishita M, Ouchi Y. Association between serum uric acid and lumbar spine bone mineral density in peri- and postmenopausal Japanese women. *Osteoporos Int*. 2014;25: 1099-1105.
22. Cervellati C, Bonaccorsi G, Cremonini E, Romani A, Fila E, Castaldini MC, et al. Oxidative stress and bone resorption interplay as a possible trigger for postmenopausal osteoporosis. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:1-8.
23. Guo T, Zhang L, Konermann A, Zhou H, Jin F, Liu W. Manganese superoxide dismutase is required to maintain osteoclast differentiation and function under static force. *Sci Rep*. 2015;26:8016.
24. Martins F, Suzan AJ, Cerutti SM, Arçari DP, Ribeiro ML, Bastos DH, Carvalho PO. Consumption of mate tea (*Ilex paraguariensis*) decreases the oxidation of unsaturated fatty acids in mouse liver. *Br J Nutr*. 2009;101:527-32.
25. Taga M, Miller EE, Pratt DE. Chia Seeds as a Source of Natural Lipid Antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1984;61: 928-931
26. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996;239: 70-76.
27. Le Fevre JJ, McClintock MK. Reproductive senescence in female rats: a longitudinal study of individual differences in estrous cycles and behavior. *Biol Reprod*. 1988;38: 780-789
28. Chen S, Asakawa T, Ding S, Liao L, Zhang L, Shen, J, Yu J, Sugiyama K. Chaihu-Shugan-San administration ameliorates perimenopausal anxiety and depression in rats. *Plos One*. 2013;8:e72428.

29. Frye JB, Lukefahr AL, Wright LE, Marion SL, Hoyer PB, Funk JL. Modeling perimenopause in Sprague-Dawley rats by chemical manipulation of the transition to ovarian failure. *Comp Med*. 2012;62: 193-202.
30. Granjeiro JM, Miranda MA, da Glória S T Maia M, Ferreira CV, Taga EM, Aoyama H. Effect of homologous series of n-alkyl sulfates and n-alkyl trimethylammonium bromides on low molecular mass protein tyrosine phosphatase activity. *Mol Cell Biochem*. 2004: 133-140.
31. Plank J, Rychlo A. A method for quick decalcification. *Zentralbl Allg Pathol*. 1952; 89:252-254.
32. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *Bone Miner Res*. 1987;2: 595-610.
33. Raffi M.B., Méndez M.C. & Riet-Correa F. Histomorphometric and histological evaluations of the bone lesions caused by fluoride in chickens. *Pesq. Vet. Bras*. 1997;17: 69-76.
34. Garcia VG, Longo M, Gualberto Júnior EC, Bosco AF, Nagata MJ, Ervolino E, et al. Effect of the concentration of phenothiazine photosensitizers in antimicrobial photodynamic therapy on bone loss and the immune inflammatory response of induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res*. 2014;49: 584-594.
35. Cummings SR. How drugs decrease fracture risk: lessons from trials. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2002;2: 198-200.
36. Maniam S, Mohamed N, Shuid AN, Soelaiman IN. Palm tocotrienol Exerted Better Antioxidant Activities in Bone than α -Tocopherol. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008;103 :55-60.

37. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52: 302-310.
38. Arçari DP, Bartchewsky W, dos Santos TW, Oliveira KA, Funck A, Pedrazzoli J, et al. Antiobesity effects of yerba maté extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice. *Obesity.* 2009;17: 2127-2133.
39. Lukefahr AL, Frye JB, Wright LE, Marion SL, Hoyer PB, Funk JL. Decreased bone mineral density in rats rendered follicle-deplete by an ovotoxic chemical correlates with changes in follicle-stimulating hormone and inhibin A. *Calcif Tissue Int.* 2012;9: 239-249.
40. Gorjanović S, Komes D, Pastor FT, Belščak-Cvitanović A, Pezo L, Hečimović I, et al. Antioxidant capacity of teas and herbal infusions: polarographic assessment. *J Agric Food Chem.* 2012 Sep 26;60: 9573-80.
41. Przygodda F, Martins ZN, Castaldelli APA, Minella TV, Vieira LP, Cantelli K, et al. Effect of erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) on serum cholesterol, triacylglycerides and glucose in Wistar rats fed a diet supplemented with fat and sugar. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2010;20: 956-961.
42. Sowers MR, Zheng H, Jannausch ML, et al. Amount of bone loss in relation to time around the final menstrual period and follicle-stimulating hormone staging of the transmenopause. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95: 2155–2162.
43. Tantikanlayaporn D, Wichit P, Weerachayaphorn J, Chairoungdua A, Chuncharunee A, Suksamrarn A, et al. Bone sparing effect of a novel phytoestrogen diarylheptanoid from *Curcuma comosa* Roxb. in ovariectomized rats. *PLoS One.* 2013 Nov 11;8: e78739.

44. Chatuphonprasert W, Udomsuk L, Monthakantirat O, Churikhit Y, Putalun W, Jarukamjorn K. Effects of *Pueraria mirifica* and miroestrol on the antioxidation-related enzymes in ovariectomized mice. *J Pharm Pharmacol*. 2013;3: 447-56.
45. Felsenberg D, Miller P, Armbrecht G, Wilson K, Schimmer RC, Papapoulos SE. Oral ibandronate significantly reduces the risk of vertebral fractures of greater severity after 1, 2, and 3 years in postmenopausal women with osteoporosis. *Bone*. 2005 ;37: 651-654.
46. Moerman EJ, Teng K, Lipschitz DA, Lecka- Czernik B. Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways. *Aging Cell*. 2004;3: 379–389
47. Arcari DP, Santos JC, Gambero A, Ribeiro ML. The in vitro and in vivo effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract on adipogenesis. *Food Chem*. 2013, 141, 809–815.
48. Shen CL, Chyu MC, Wang JS. Tea and bone health: steps forward in translational nutrition. *Am J Clin Nutr*. 2013;98: 1694S-1699S.
49. Lelovas PP, Xanthos TT, Thoma SE, Lyritis GP, Dontas IA. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comp Med*. 2008 ;58: 424-430.
50. Liu CC¹, Hu S, Chen G, Georgiou J, Arns S, Kumar NS, Young RN, Grynepas MD. Novel EP4 Receptor Agonist-Bisphosphonate Conjugate Drug (C1) Promotes Bone Formation and Improves Vertebral Mechanical Properties in the Ovariectomized Rat Model of Postmenopausal Bone Loss. *J Bone Miner Res*. 2015; 30:670-680.
51. Barrett Connor E, Wade SW, Downs RW, Ganiats T, Hochberg M, Recker RR, Stolshek BS. Self-reported calcium use in a cohort of postmenopausal women

receiving osteoporosis therapy: results from POSSIBLE US. *Osteoporos Int.* 2015. [Epub ahead of print]

52. Bai XC, Lu D, Liu AL, et al. Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF-kappaB ligand expression in osteoblast. *J Biol Chem.* 2005; 280:17497–17506.

53. Fernandez SM, Keating AF, Christian PJ, Sen N, Hoying JB, Brooks HL, Hoyer PB. Involvement of the KIT–KITL signaling pathway in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovarian follicle loss in rats. *Biol Reprod.* 2008;79:318–327.

54. Portal-Núñez S, Lozano D, de la Fuente M, Esbrit P. Pathophysiology of aging bone. *Rev Esp Geriatr Gerontol.* 2012; 47:125-13.

Figures legends

Figure 1- Animals groups and experimental designer. Adult rats (AD), perimenopausal (PM) and perimenopausal+MT (PM+MT).

Figure 2- Femur anatomy and region used to histomorphometry and immunohistochemistry assay.

Figure 3- Mate analysis by mass spectroscopy obtained by full scan spectrum and the chemical structure identified polyphenols: cis 3-CQA (3-O-caffeoyl quinic cis), 5-p-CoQA (acid 5-Op-quinic cumaroil), CeQA (3-o-feruloilquínico), 4C,5 pCoQA (4-5-O-caff eoylquinic op-cumaroil) and cis 4,5-diCQA (4,5-di-O-caffeoylquinic acid).

Figure 4- Duration of estrous cycle (days) of adult rats (AD), perimenopausal (PM), perimenopausal+MT (PM+MT). Values expressed as mean \pm standard error, n = 10 / group. *When comparing AD to PM group. Student *t* test, $p < 0.05$ to compare AD to PM and PM to PM+MT.

Figure 5- Total bone mineral density (BMD) expressed in g/cm^2 , of the femur of adult rats (AD), perimenopausal (PM), perimenopausal+MT (PM+MT). Values expressed as mean \pm standard error, n = 10 / group. *When comparing AD to PM group; #when comparing PM to PM+MT group. Student *t* test, $p < 0.05$.

Figure 6- Two-dimensional histomorphometry of the femoral neck in adult rats (AD), perimenopausal (PM), perimenopausal+MT (PM+MT). H&E staining of trabecular bone in the femoral neck (6A), original magnification: 40x. Scale bars: 8 μm .

Trabecular bone volume (TBV) (6B), area occupied by adipocytes (AOA) (6C) and number of osteocytes (N.Ot) (6D). Values expressed as mean \pm standard error, n = 10 / group. *When comparing AD to PM group; #when comparing PM to PM+MT group. Student *t* test, p <0.05.

Figure 7 – Plasma Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity of adult rats (AD), perimenopausal (PM), perimenopausal+MT (PM+MT). Values expressed as mean \pm standard error, n = 10 / group. *When comparing AD to PM group; #when comparing PM to PM+MT group. Student *t* test, p <0.05.

Figure 8- Photomicrographs showing the pattern of immunolabeling for TRAP (A, B, C) RANKL (D, E, F) and OPG (G, H, I) on trabecular bone of femoral neck of adult rats (AD) (A, D and G), perimenopausal (PM) (B, C and H) and perimenopausal+MT (PM+MT) (C, F and I). Bone tissue (bt); arrows indicate immunoreactive cells. Original magnification: A-C: 400x; D-I, 200x. Scale bars: A-C, 80 μ m; D-I, 160 μ m. Counterstaining: Harris Hematoxylin.

Figure 9- (A) Plasma antioxidant capacity (FRAP) and (B) malondialdehyde levels (MDA) in femur homogenate of adult rats (AD), perimenopausal (PM), perimenopausal+MT (PM+MT). Values expressed as mean \pm standard error, n = 10 / group. *When comparing AD to PM group; #When comparing PM to PM+MT group, Student *t* test, p <0.05.

Figure 10- Photomicrographs showing the pattern of immunolabeling for SOD2 on trabecular bone of femoral neck of adult rats (AD), perimenopausal (PM),

perimenopausal+MT (PM+MT). Original magnification: 100x. Scale bars: 20 μ m.
Counterstaining: Mayer Hematoxylin.

Table legend

Table 1- Feed intake, water consumption, and body weight in the start and in the end of the treatment on adult rats (AD), perimenopausal (PM), perimenopausal+MT (PM+MT). Values expressed as mean \pm standard error, n = 10 / group. Student *t* test, p <0.05.