



ARTÍCULOS ORIGINALES / Originals

EFECTO DE LA YERBA MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS*) SOBRE EL HUESO DE RATAS OVARIECTOMIZADAS

Lucas R. Brun,^{1,2*} Mercedes Lombarte,^{1,2} María Cielo Maher,¹ Candela Retamozo,¹ Verónica Di Loreto,¹ Alfredo Rigalli.^{1,2,3}

1. Laboratorio de Biología Ósea. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Rosario. 2. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). 3. Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Rosario (CIUNR). Argentina.

Resumen

El consumo de yerba mate (*Ilex paraguayensis*) es habitual en la Argentina y otros países de América del Sur. La yerba mate, al igual que el café y el té, contiene xantinas y polifenoles. El consumo de café ha mostrado tener impacto negativo sobre la densidad mineral ósea (DMO), mientras que el té ha mostrado tener efecto protector. En mujeres posmenopáusicas tomadoras de mate se halló mayor DMO de columna lumbar y cuello femoral en comparación con controles que no bebían mate. La DMO también fue mayor en ratas que recibieron una infusión de yerba mate y dieta baja en calcio; sin embargo, este incremento no fue capaz de revertir el efecto negativo del bajo contenido de calcio sobre las propiedades biomecánicas y la conectividad trabecular. El objetivo de este trabajo fue estudiar el tejido óseo de ratas ovariectomizadas (OVX) luego de recibir una infusión de yerba mate por 90 días en reemplazo del agua de bebida. Se utilizaron ratas Sprague Dawley (n=16) hembras divididas en 2 grupos: OVX+agua y OVX+yerba. Otro grupo de ratas (n=6) fue so-

metido a una cirugía simulada (Sham). El estudio mostró claramente el efecto deletéreo de la ovariectomía sobre todos los parámetros estudiados (DMO, histomorfometría ósea, conectividad trabecular y biomecánica) respecto del grupo Sham. El grupo OVX+yerba no mostró diferencias con el grupo OVX+agua en ninguno de los parámetros analizados, por lo que la yerba mate no produciría efecto alguno sobre el hueso de ratas adultas ovariectomizadas.

Palabras clave: yerba mate, *Ilex paraguayensis*, hueso.

Abstract

EFFECT OF YERBA MATE (*ILEX PARAGUARIENSIS*) ON BONE IN OVARIECTOMIZED RATS

Yerba mate (Ilex paraguayensis) consumption is common in Argentina and other South American countries. Like coffee and tea, yerba mate contains xanthines and polyphenols. It has been reported that caffeine consumption has a negative impact on bone mineral den-

* E-mail: lbrun@unr.edu.ar

sity (BMD) while tea has been shown to have a protective effect. On the other hand, in postmenopausal women that usually consumed yerba mate, lumbar spine and femoral neck BMDs were higher than in non-consumers. BMD was also higher in rats that received a yerba mate infusion and low calcium diet. However, this increase was not sufficient to reverse the negative effect of a low calcium diet on bone biomechanical properties and trabecular connectivity. The aim of this work was to study bone tissue in ovariectomized (OVX) rats receiving an infusion of yerba mate instead of drinking water for 90 days. Female Sprague Dawley rats (n=16) were divided into 2 groups: OVX+water and OVX+yerba. A third group of rats (n=6) was submitted to sham surgery (Sham). Results clearly showed the deleterious effect of ovariectomy on all studied parameters (BMD, bone histomorphometry, trabecular connectivity and biomechanical properties) compared to Sham group. The OVX+yerba group showed no difference with OVX+water group in all analyzed parameters. It is concluded that yerba mate does not produce any effect on the bone of ovariectomized adult rats.

Keywords: yerba mate, *Ilex paraguariensis*, bone.

Introducción

El consumo de yerba mate (*Ilex paraguariensis*) es habitual en la Argentina (5 kg/persona/año) y otros países de América del Sur, especialmente Uruguay, Brasil y Paraguay.¹ Aunque la concentración de cafeína en el mate es baja (~300-400 mg/l) en comparación con el café (~600 mg/l), en la Argentina el volumen promedio ingerido de mate supera ampliamente al de café por lo que la incorporación de cafeína a través del consumo de yerba mate excede la ingesta de cafeína aportada por el café.²

Se ha reportado que el consumo de cafeína tiene impacto negativo sobre la densidad

mineral ósea (DMO) y el riesgo de fractura, particularmente cuando la ingesta de calcio está por debajo de los requerimientos.^{3,4} Un metanálisis de diez estudios prospectivos que en conjunto incluyeron a más de 200.000 participantes mostró que el consumo de café está ligera pero significativamente asociado, en forma dosis-dependiente, a un mayor riesgo de fracturas, especialmente en las mujeres.⁵ Este efecto negativo también se observó en animales de experimentación.^{6,7} El mecanismo no está claro, pero hay trabajos que reportan que la administración de cafeína aumenta la osteoclastogénesis y la resorción ósea *in vivo*.⁸

Por otro lado, el consumo de té (*Camellia sinensis*) ha mostrado tener un efecto protector sobre la densidad mineral ósea y el riesgo de fractura, aunque el efecto parece ser poco significativo.^{9,10} Este efecto positivo es atribuido a la presencia de polifenoles con capacidad antioxidante.¹¹ Un estudio previo comparando ratas adultas con ratas jóvenes mostró correlación entre la pérdida de DMO y la actividad de la enzima superóxido dismutasa, lo que sugiere que el estrés oxidativo induciría la pérdida de hueso relacionada con la edad.¹² Adicionalmente, se ha demostrado que alimentos ricos en antioxidantes pueden representar una estrategia para disminuir la pérdida ósea relacionada con la edad, y que los alimentos ricos en polifenoles se encuentran asociados a una mejor salud ósea, atribuible a su capacidad antioxidante.^{11,13,14}

Dado este efecto diferencial entre el café y el té, se plantea la necesidad de conocer el efecto de la yerba mate sobre el hueso. La yerba mate, por su parte, contiene polifenoles tanto flavonoides como cafeoil-derivados. Entre los flavonoides predomina la rutina, seguido de quercetina, kaempferol y miricetina. Entre los cafeoil-derivados predomina el ácido clorogénico; en menor proporción también se encuentran el ácido 4,5-dicafeolquínico, el ácido 3,4-dicafeolquínico y el ácido 3,5-dicafeolquínico. Entre las xantinas



se destacan la cafeína y la teobromina y, en menor medida, la teofilina.^{15,16,17}

En un trabajo previo se halló mayor DMO (+9,7%) de columna lumbar en mujeres posmenopáusicas que tomaban al menos 1 litro de mate/día (n=146) en comparación con controles que no bebían mate (n=146) (0,952 g/cm² vs. 0,858 g/cm², respectivamente; p<0,0001). Datos similares se observaron en cuello femoral donde la DMO fue mayor (+6,2%) en las mujeres tomadoras de mate en comparación con las pacientes controles (0,817 g/cm² vs. 0,776 g/cm², respectivamente; p=0,0002).¹⁸

Por otra parte, nuestro grupo llevó a cabo un trabajo en ratas Sprague Dawley de 30 días de edad donde se evaluó el efecto de la yerba mate sobre el tejido óseo a través de estudios de densitometría, morfometría, histomorfometría, conectividad trabecular y biomecánica ósea.¹⁹ Los animales fueron divididos en cuatro grupos experimentales (n=6/grupo): Agua+calcio 0,2 g%; Agua+calcio 0,9 g%; Yerba+calcio 0,2 g%; Yerba+calcio 0,9 g%. Los grupos Yerba recibieron *ad libitum* una infusión de yerba mate (25 g de yerba mate en 1 litro de agua a 90°C) en reemplazo del agua de bebida. La yerba mate mostró un efecto positivo sobre la DMO, congruente con lo hallado por Conforti y col.,¹⁸ y también en el volumen de hueso trabecular pero solo en el grupo con bajo contenido de calcio en la dieta. Esto podría indicar que el efecto negativo de la baja ingesta de Ca en el volumen óseo se contrarresta en parte por la yerba mate. Sin embargo, la yerba mate no fue capaz de revertir el efecto negativo del bajo contenido de Ca sobre las propiedades biomecánicas y la conectividad trabecular.¹⁹

Objetivo

El objetivo de este trabajo fue evaluar las propiedades biomecánicas y microestructurales del tejido óseo en ratas ovariectomizadas expuestas a una infusión de yerba mate.

Material y métodos

Animales y procedimientos generales

Ratas Sprague Dawley (n=16) hembras de 7 semanas fueron sometidas a ovariectomía bilateral y aleatoriamente se dividieron en dos 2 grupos: OVX+agua, que recibió agua como bebida y OVX+yerba, que recibió una infusión de yerba mate (25 g de yerba mate en 1 litro de agua a 90 °C previamente filtrada y enfriada) en reemplazo del agua. La administración de la infusión de yerba mate se realizó inmediatamente post-OVX. Otro grupo de ratas (n=6) fue sometido a una cirugía simulada (Sham) para comprobar el efecto de la OVX sobre el tejido óseo. La duración del experimento fue de 90 días y, finalizado ese tiempo, se extrajeron las tibias y los fémures para realizar los estudios óseos.

El manejo de animales se llevó a cabo bajo las normas internacionales de cuidado y uso de animales de laboratorio.²⁰ Todos los experimentos realizados fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario.

Densidad mineral ósea

La densidad mineral ósea (mg Ca/cm²) se determinó en las tibias por absorciometría de rayos X (WorkRay 70 KV, Workman SRL, Argentina) simultáneamente con un patrón de aluminio previamente calibrado con concentraciones de Ca conocidas.^{17,21} La DMO se determinó en un área de 2 mm² a 1 mm del cartílago de crecimiento coincidente con la zona donde se llevaron a cabo los estudios histomorfométricos que se describen a continuación.

Histomorfometría ósea

La tibia izquierda se fijó en formol-PBS al 10% durante 72 horas. Posteriormente se descalcificó en EDTA 10% a 4 °C y se procesaron histológicamente para la inclusión en parafina. Se realizaron cortes histológicos de 5-7 μm con un micrótopo (Minot-MikrotmTyp

1212®. Leitz, Wetzlar, Alemania) y posterior tinción con hematoxilina-eosina. Se tomaron imágenes digitales a 1 mm en dirección distal del borde inferior del cartílago de crecimiento en un área de 2 mm² con un microscopio (Olympus®, Alemania) y una cámara fotográfica adaptada (Olympus SP-350®, China). Las imágenes obtenidas (40x) fueron posteriormente analizadas con un software específico (Image J 1.40®, NIH, Maryland, Estados Unidos) con el cual se determinó en forma directa: el área total de tejido analizado: TV (mm²); área ocupada por hueso: BV (mm²), y perímetro de dicha área: BS (mm). Con estos valores se calcularon los siguientes parámetros: porcentaje de tejido óseo: BV/TV (%), espesor trabecular: Tb.Th (mm) = $[2/(BS/BV)]$, número de trabéculas: Tb.N (1/mm) = $[(BV/TV)/(Tb.Th)]$ y separación trabecular: Tb.Sp (mm) = $[(1/Tb.N)-Tb.Th]$.²²

Conectividad trabecular

Sobre las mismas imágenes digitales donde se evaluaron los parámetros histomorfométricos, se determinaron los siguientes parámetros de conectividad trabecular (Image J 1.40): número total de nodos (Nd), número de ramas de nodo a nodo (NNd), número de nodo a ramas terminales (NNdTm), número de árboles (T), número de terminales (Tm) y el número de ramas con dos terminales (NTm) es decir trabéculas que no presentan nodos. Con estos parámetros se calcularon los siguientes parámetros de interconectividad: índice interconectividad $ICI = (Nd * NNd) / T * (NNdTm + 1)$; relación nodo-terminal $[R = Nd / Tm]$, y el nuevo índice de interconectividad $[NDX (\%/mm) = (R * NNd * (BV/TV) * Tb.Th) / ((NTm + NNdTm) * Dist * Tb.Sp)]$.^{19,23}

Evaluación de la resistencia ósea

La evaluación de la resistencia ósea se realizó en los fémures a través de dos ensayos: ensayo de flexión a tres puntos, a nivel de la diáfisis, para medir la resistencia del hueso cortical, y ensayo de compresión en un corte

transversal a nivel de la epífisis proximal, para medir la resistencia del hueso trabecular.^{17,24,25}

Se utilizó un instrumento para ensayos biomecánicos con una celda de carga de 300 N y una sensibilidad de 0,01 N. Al someter al hueso a la acción de una fuerza se produce un desplazamiento y la fuerza aplicada genera un voltaje que es proporcional a dicha fuerza. El desplazamiento se determinó con una precisión de 10 µm. Estos datos son adquiridos por un software (*Data Acquisition Suite* 1.0, Argentina, 2011) que permite obtener los siguientes parámetros: fuerza de fractura, fuerza máxima soportada, rigidez del hueso, energía absorbida, deformación, tensión, y módulo de Young.

Análisis estadístico

Los datos se muestran como media±error estándar. La distribución de los datos se analizó con el test de Kolmogorov-Smirnov. La comparación de los datos se realizó utilizando análisis de la variancia (ANOVA) para datos independientes y posttest de Bonferroni para la comparación entre grupos (GraphPad Prism 2.0, San Diego, Estados Unidos). Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

Resultados

El grupo Sham ($1,47 \pm 0,09$ mg Ca/cm²) presentó mayor DMO en forma significativa respecto de los grupos OVX (OVX+agua= $1,26 \pm 0,07$ mg Ca/cm²; OVX+yerba= $1,22 \pm 0,16$ mg Ca/cm²). No se observaron diferencias significativas entre los grupos OVX.

De manera congruente con la DMO, el volumen óseo trabecular (BV/TV) evaluado por histomorfometría fue significativamente menor en los grupos ovariectomizados (OVX+agua: $11,39 \pm 1,84\%$; OVX+yerba: $11,05 \pm 2,34\%$) respecto del grupo Sham ($29,38 \pm 4,23\%$). Esta disminución en el volumen óseo trabecular fue a expensas del número de trabéculas, sin diferencias en el espesor trabecular (Figura 1). La comparación entre los dos grupos OVX no

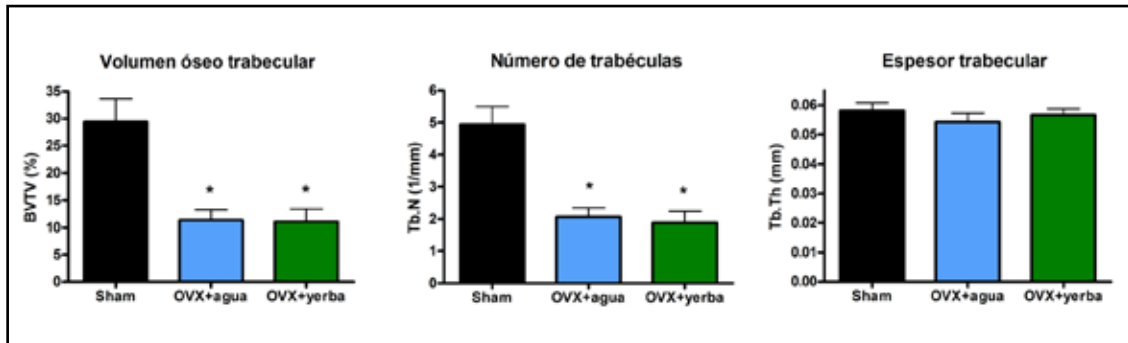


Figura 1. Variables histomorfométricas evaluadas en el hueso trabecular. * Indica diferencia significativa con respecto a Sham ($p < 0,05$).

mostró diferencias en ninguna de las variables estudiadas.

Del análisis de las variables de conectividad trabecular (Tabla 1) se infiere que el parámetro de conectividad (ICI), si bien presenta valores menores en los grupos OVX en comparación con el grupo Sham, no mostró diferencias significativas entre los 3 grupos. Por su parte, el parámetro de conectividad NDX, que contempla en su cálculo además de parámetros de conectividad, algunos parámetros histomorfométricos, sí mostró diferencias estadísticas entre el grupo Sham y los grupos OVX, sin observarse diferencias entre los grupos OVX+agua y OVX+yerba. Por último, se destaca que solo el grupo OVX+agua presenta menor relación nodoterminal (R) en comparación con el grupo Sham. El grupo OVX+yerba no fue diferente del grupo Sham, lo que demuestra una leve mejoría en la conectividad trabecular en el grupo OVX+yerba en comparación con el grupo OVX+agua.

La fuerza de fractura, la rigidez y el módulo de Young obtenidos del ensayo de compresión se hallaron disminuidos en forma significativa en los grupos OVX respecto del grupo Sham (Tabla 2), sin diferencias entre los grupos OVX. Por su parte, la energía absorbida no mostró variaciones entre los grupos estudiados.

Casi todos los parámetros biomecánicos del ensayo de flexión a 3 puntos fueron afectados negativamente por la ovariectomía (Tabla 3). Si bien el CSMI no mostró diferencias significativas, se observa una tendencia a valores mayores en los grupos OVX ($p = 0,07$). Al comparar el grupo OVX+agua con el grupo OVX+yerba no se hallaron diferencias significativas en los parámetros biomecánicos óseos (fuerza de fractura, fuerza máxima, energía absorbida y rigidez). Los parámetros indicadores de calidad del material, como estrés máximo y módulo de Young, tampoco mostraron diferencias significativas entre los grupos OVX.

Discusión

Debido al efecto negativo de la cafeína sobre el hueso, particularmente cuando la cantidad de calcio en la dieta es insuficiente, podría esperarse que el consumo de yerba mate fuera perjudicial para el hueso debido a su contenido de cafeína. El efecto negativo de la cafeína (más de 200-300 mg/día = ~400-500 ml de café) sobre la DMO se observó particularmente en mujeres que consumían Ca por debajo de 750 mg/día.^{3,4,5} Por su parte, el té (negro o verde) ha mostrado tener un leve efecto protector sobre la DMO.^{8,9,26} El hecho de que ambas bebidas que contienen cafeína muestren efectos

Tabla 1. Conectividad trabecular.

	Sham (n=6)	OVX+agua (n=8)	OVX+yerba (n=8)
ICI	0,82±0,14	0,23±0,09	0,45±0,23
NDX (%/mm)	12,53±4,01	0,35±0,22 *	1,06±0,90 *
R	0,36±0,06	0,16±0,03 *	0,22±0,05

* Indica diferencias significativas respecto del grupo Sham (p<0,05). Abreviaturas: ICI: índice de interconectividad; R: relación nodo-terminal; NDX: nuevo índice de interconectividad.

Tabla 2. Propiedades biomecánica óseas (ensayo de compresión).

Ensayo de compresión	Sham (n=6)	OVX+agua (n=8)	OVX+yerba (n=8)
Fuerza de fractura (N)	60,5±12,4	18,6±4,0*	10,9±1,3*
Energía absorbida (mJ)	2,3±0,6	2,9±1,0	1,2±0,3
Rigidez (N/mm)	679,0±190,8	43,0±8,3*	41,7±10,4*
Módulo de Young (GPa)	0,2±0,07	0,01±0,003*	0,01±0,004*

* Indica diferencias significativas respecto del grupo Sham (p<0,05).

Tabla 3. Propiedades biomecánicas óseas (ensayo de flexión a 3 puntos).

Ensayo de flexión	Sham (n=6)	OVX+agua (n=8)	OVX+yerba (n=8)
Fuerza de fractura (N)	152,5±8,6	117,5±3,7*	121,4±2,2*
Fuerza máxima (N)	163,1±6,3	119,6±4,1*	124,5±2,5*
Energía absorbida (mJ)	107,4±11,9	59,6±6,8*	67,9±6,2*
Rigidez (N/mm)	403,7±67,7	167,8±20,4*	207,3±25,8*
CSMI (mm ⁴)	7,7±1,0	9,7±2,3	9,7±1,9
Estrés máximo (MPa)	116,0±5,0	72,8±7,7*	75,6±11,0*
Módulo de Young (GPa)	1,8±0,6	0,6±0,2*	0,8±0,3*

* Indica diferencias significativas respecto del grupo Sham (p<0,05).

contrarios podría deberse a diversos factores: cantidad de cafeína, concentración total ingerida de cafeína en función del volumen ingerido, cantidad de calcio en la dieta, o también la cantidad y tipo de polifenoles con potencial efecto beneficioso sobre el hueso.²⁷

En consecuencia, resulta de interés conocer el efecto de la yerba mate sobre el tejido óseo. Si bien el contenido de cafeína del mate es menor que el del café, el volumen ingerido de mate en nuestra región es muy superior al de café; esto lleva a que sea el mate el que



aporta el 50% de cafeína consumida, relegando al café al segundo lugar con el 36%.²⁸

Este estudio evaluó el efecto de la yerba mate sobre el hueso de ratas OVX que recibieron una infusión de yerba mate en comparación con un grupo de ratas OVX que recibieron agua. Ambos grupos fueron comparados con un grupo Sham para evaluar el efecto de la OVX. El estudio muestra claramente el efecto deletéreo de la OVX sobre todos los parámetros estudiados (DMO, histomorfometría ósea, conectividad trabecular y biomecánica) respecto del grupo Sham. El grupo OVX+yerba no mostró diferencias con el grupo OVX+agua en ninguno de los parámetros analizados en el diseño experimental del presente trabajo, por lo que la yerba mate no produciría efecto alguno sobre el hueso de ratas adultas ovariectomizadas. Solamente se destaca que el grupo OVX+agua presentó menor relación nodo-terminal (R) en comparación con el grupo Sham, mientras que el grupo OVX+yerba no fue diferente del grupo Sham. Este resultado indicaría una leve mejoría en la conectividad trabecular en el grupo OVX+yerba en comparación con el grupo OVX+agua. En este mismo sentido, los parámetros ICI y NDX mostraron valores más altos en el grupo OVX+yerba respecto del grupo OVX+agua; tal vez la amplia dispersión de los datos y el número bajo de animales no permitió hallar diferencias significativas. En un estudio previo donde se evaluó el volumen óseo en ratas OVX que consumieron yerba, la pérdida ósea en el hueso subcondral fue menor en comparación con los animales OVX que solo consumieron agua; sin embargo, el estudio biomecánico no mostró diferencias en las propiedades estructurales de la diáfisis femoral. Histológica e histomorfométricamente se observó que la yerba mate disminuyó la cantidad de médula ósea amarilla en animales OVX, probablemente inhibiendo la diferenciación de células mesenquimáticas a adipocitos y favoreciendo de esta manera la osteoblastogénesis.^{29,30}

En un estudio previo empleando el mismo

modelo de nuestro trabajo se evaluó el efecto de la cafeína sobre el tejido óseo y se mostró un efecto favorable de la cafeína sobre el sistema esquelético de las ratas, ya que observaron aumento de la mineralización ósea y mejor resistencia y estructura del hueso trabecular así como también mejores propiedades mecánicas del hueso compacto. En ratas no OVX se observó una tendencia a mejorar las propiedades mecánicas tanto del hueso esponjoso como del hueso compacto.³¹ El alto consumo de café ha sido asociado con efectos adversos sobre la masa ósea particularmente en las mujeres posmenopáusicas. Esto indicaría la posibilidad de que el efecto de la cafeína sea antagonizado por los estrógenos. Por lo tanto, se ha hipotetizado que los estrógenos podrían bloquear la vía de PKA dependiente de AMPc que es compartida por la cafeína.^{31,32}

Como limitación del presente estudio se puede plantear que la yerba mate fue administrada posteriormente a la OVX, cuando lo habitual es que las mujeres comiencen a tomar mate antes de su menopausia. Sin embargo, en un estudio previo se evaluó el efecto de la yerba mate sobre el hueso de ratas jóvenes.¹⁹ Estos animales recibieron durante 90 días una infusión de yerba mate (25 g de yerba mate/litro de agua) que contenía 370 mg/l de cafeína y cantidad diferente de Ca en la dieta (0,2% y 0,9%). Debido al crecimiento de los animales, el consumo de cafeína diario varió a lo largo del experimento entre 2-7 mg/100 g, lo cual se considera una dosis baja/moderada.^{31,33} En dicho trabajo se observó un leve efecto positivo de la yerba mate sobre la DMO y el volumen de hueso trabecular solo en el grupo con bajo contenido de calcio en la dieta pero que no logró revertir el efecto negativo del bajo contenido de Ca sobre las propiedades biomecánicas y la conectividad trabecular. En un estudio anterior donde se evaluó el efecto de la ingesta materna de cafeína durante el embarazo y la lactancia en la osificación endocondral de las crías, se reportaron efec-

tos adversos con todas las dosis estudiadas en forma dosis-dependiente.³⁴ Sin embargo, en ese estudio se emplearon dosis de cafeína de 25 mg/kg, 50 mg/kg y 100 mg/kg. Considerando que en una persona de 60 kg la dosis de 25 mg/kg correspondería a 1500 mg de cafeína (~2 litros de café/día), se requiere un estudio con dosis más cercanas al consumo promedio para obtener mejores conclusiones.

Otra limitación de este estudio es la forma de administración de la infusión de yerba mate la cual fue suministrada en forma continua, mientras que el mate se incorpora en períodos breves a lo largo del día por lo cual la concentración plasmática de cafeína y polifenoles podría presentar un patrón diferente.

En conclusión, la yerba mate no produjo efecto alguno sobre los parámetros óseos

analizados en ratas adultas ovariectomizadas, por lo tanto, no tendría efecto ni negativo ni positivo sobre el hueso una vez instalada la menopausia. Probablemente un efecto positivo de los polifenoles sobre el tejido óseo logre contrarrestar el efecto negativo de la cafeína.

Agradecimiento

Este trabajo fue financiado por la Fundación Alberto J. Roemmers.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Recibido: junio 2016.

Aceptado: noviembre 2016.

Referencias

1. Bracesco N, Sánchez AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. *J Ethnopharmacol* 2011; 136:378-84.
2. Olmos V, Bardoni N, Ridolfi AS, Villaamil-Lepori EC. Caffeine levels in beverages from Argentina's market: application to caffeine intake assessment. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2009; 26:275-81.
3. Kiel DP, Felson DT, Hannan MT, Anderson JJ, Wilson PW. Caffeine and the risk of hip fracture: the Framingham Study. *Am J Epidemiol* 1990;132:675-84.
4. Harris SS, Dawson-Hughes B. Caffeine and bone loss in healthy postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 1994; 60:573-8.
5. Liu H, Yao W, Zhang W, Zhou J, Wu T, He C. Coffee consumption and risk of fractures: a meta-analysis. *Arch Med Sci* 2012; 8:776-83.
6. Huang TH, Yang RS, Hsieh SS, Liu SH. Effects of caffeine and exercise on the development of bone: a densitometric and histomorphometric study in young Wistar rats. *Bone* 2002; 30:293-9.
7. Lacerda SA, Matuoka RI, Macedo RM, Petenusci SO, Campos AA, Brentegani LG. Bone quality associated with daily intake of coffee: a biochemical, radiographic and histometric study. *Braz Dent J* 2010; 21:199-204.
8. Liu SH, Chen C, Yang RS, Yen YP, Yang YT, Tsai C. Caffeine enhances osteoclast differentiation from bone marrow hematopoietic cells and reduces bone mineral density in growing rats. *J Orthop Res* 2011; 29:954-60.
9. Hegarty VM, May HM, Khaw KT. Tea drinking and bone mineral density in older women. *Am J Clin Nutr* 2000; 71:1003-7.
10. Devine A, Hodgson JM, Dick IM, Prince RL. Tea drinking is associated with benefits on bone density in older women. *Am J Clin Nutr* 2007; 86:1243-7.
11. Hubert PA, Lee SG, Lee SK, Chun OK. Dietary polyphenols, berries, and age-related bone



- loss: A review based on human, animal, and cell studies. *Antioxidants (Basel)* 2014; 3:144-58.
12. Zhang YB, Zhong ZM, Hou G, Jiang H, Chen JT. Involvement of oxidative stress in age-related bone loss. *J Surg Res* 2011; 169:e37-42.
 13. Sacco SM, Horcajada MN, Offord E. Phytonutrients for bone health during ageing. *Br J Clin Pharmacol* 2013; 75:697-707.
 14. Shen CL, Chyu MC, Wang JS. Tea and bone health: steps forward in translational nutrition. *Am J Clin Nutr* 2013; 98:1694S-9S.
 15. Dall'Orto VC. Comparison of tyrosinase biosensor and colorimetric method for polyphenol analysis in different kinds of teas. *Anal Lett* 2005; 38:19-33.
 16. Filip R, López P, Giberti G, Coussio J, Ferraro G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. *Fitoterapia* 2001; 72:774-8.
 17. Athayde ML, Coelho GC, Schenkel EP. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. *Phytochemistry* 2000; 55:853-7.
 18. 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.
 19. Brun LR, Brance ML, Lombarte M, Maher C, Di Loreto VE, Rigalli A. Effects of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on histomorphometry, biomechanics, and densitometry on bones in the rat. *Calcif Tissue Int* 2015; 97:527-34.
 20. Guide to the care and use of experimental animals. Vol1.2nd ed. Canadian Council on animal Care Guidelines, 1993.
 21. Moreno H, Lombarte M, Di Loreto VE. Bones and bone tissue. In: Rigalli A, Di Loreto V (eds). *Experimental Surgical Models in the Laboratory rat*. Taylor & Francis Group. Boca Ratón, USA: CRC Press, 2009, p.229-32.
 22. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR histomorphometry nomenclature committee. *J Bone Miner Res* 1987; 2:595-609.
 23. Harrar K, Hamami L. An interconnectivity index for osteoporosis assessment using X-Ray images. *J Med Biol Eng* 2012; 33:569-75.
 24. Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* 1993; 14:595-608.
 25. Hogan HA, Ruhmann SP, Sampson HW. The mechanical properties of cancellous bone in the proximal tibia of ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 2000; 15:284-92.
 26. Shen CL, Yeh JK, Cao JJ, Wang JS. Green tea and bone metabolism. *Nutr Res* 2009; 29:437-56.
 27. Saraví FD. Cafeína y salud ósea. *Actual Osteol* 2014; 10:119-21.
 28. Olmos V, Bardoni N, Ridolfi AS, Villaamil-Lepori EC. Caffeine levels in beverages from Argentina's market: application to caffeine intake assessment. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 2009; 26:275-81.
 29. Nervegna MT, Lewicki M, Orzuza R, Friedman SM, Mandalunis PM. Yerba mate consumption reduces bone loss in ovariectomized animals. *J Dent Res* 2013; 92(C):157 [Abstract].
 30. Nervegna MT, Lewicki M, Rodríguez J, Bozzini C, Mandalunis PM. Efecto de la yerba mate sobre la médula ósea amarilla y biomecánica de huesos largos en ratas ovariectomizadas. *Actual Osteol* 2014; 10:60 [Abstract].
 31. Folwarczna J, Pytlík M, Zych M, Cegięła U, Kaczmarczyk-Sedlak I, Nowiska B, Sliwiński L. Favorable effect of moderate dose caffeine on the skeletal system in ovariectomized rats. *Mol Nutr Food Res* 2013; 57:1172-84.
 32. Zhou Y, Zhu ZL, Guan XX, Hou WW, Yu HY. Reciprocal roles between caffeine and estrogen on bone via differently regulating cAMP/PKA pathway: the possible mechanism for caffeine-induced osteoporosis in women and estrogen's antagonistic effects. *Med Hypotheses* 2009; 73:83-5.
 33. Ohta M, Cheuk G, Thomas KA, et al. Effects of caffeine on the bones of aged, ovariectomized rats. *Ann Nutr Metab* 1999; 43:52-9.
 34. Sena Reis AM, Moura Batista AC, De Melo Ocarino N, Serakides R. Effects of caffeine intake in mothers on maternal cortisol levels and offspring endochondral ossification. *Actual Osteol* 2014; 10:20-36.