



GMD

Facultad Cs. Médicas
Biblioteca



TDM 2605

Laboratorio de
Biología Ósea

FCM Facultad de Ciencias
Médicas - UNR

UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

Facultad de Ciencias Médicas

Laboratorio de Biología Ósea

“Efectos del consumo de Yerba Mate sobre el desarrollo óseo, dentario y mandibular”

Lic. Natasha Sanz

Director: Dr. Lucas Brun

Co-directora: Dra. Lilian I. Plotkin

Tesis para optar al título de Doctora en Ciencias Biomédicas

2024

Índice

<u>1</u>	<u>AGRADECIMIENTOS</u>	5
<u>2</u>	<u>RESÚMEN</u>	6
<u>3</u>	<u>ABREVIATURAS</u>	8
<u>4</u>	<u>INTRODUCCIÓN</u>	9
<u>3.1</u>	<u>El tejido óseo</u>	9
	<u>Estructura y función del tejido óseo</u>	9
	<u>Clasificación según forma</u>	9
	<u>Clasificación según organización estructural</u>	13
<u>3.2</u>	<u>Composición del tejido óseo</u>	15
	<u>Matriz orgánica</u>	15
	<u>Fase mineral</u>	15
	<u>Células del tejido óseo</u>	16
	<u>Diferenciación de células óseas</u>	18
<u>3.3</u>	<u>Osteogénesis, modelado y remodelado</u>	21
	<u>Síntesis de la matriz ósea</u>	21
	<u>Osificación intramembranosa</u>	22
	<u>Osificación endocondral</u>	23
	<u>Remodelado Óseo</u>	24
	<u>Mineralización del tejido óseo</u>	26
<u>3.4</u>	<u>Yerba Mate</u>	28
<u>3.5</u>	<u>Compuestos presentes en la yerba mate</u>	28
	<u>Polifenoles</u>	28
	<u>Xantinas</u>	31
	<u>Saponinas</u>	33
	<u>Minerales</u>	33
<u>3.6</u>	<u>Actividad biológica de los extractos de <i>Ilex paraguariensis</i> y sus componentes</u>	34
<u>3.7</u>	<u>Efecto antioxidante de la YM y sus componentes</u>	36
<u>3.8</u>	<u>Estrés oxidativo en el hueso</u>	38
<u>3.9</u>	<u>Efecto de la yerba mate sobre tejido óseo</u>	42
	<u>Efectos de los componentes de la YM sobre el tejido óseo</u>	42
	<u>Cafeína</u>	42
	<u>Polifenoles</u>	44
<u>3.10</u>	<u>YM y sus efectos sobre el tejido óseo</u>	46

<u>3.11</u>	<u>YM y efectos en hueso durante la gestación</u>	47
<u>5</u>	<u>HIPÓTESIS</u>	50
<u>6</u>	<u>OBJETIVOS</u>	50
<u>7</u>	<u>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u>	50
<u>8</u>	<u>ACTIVIDADES Y METODOLOGÍA</u>	51
	<u>Diseño experimental</u>	51
	<u>Objetivo 1</u>	55
	<u>Medidas morfométricas macroscópicas</u>	55
	<u>Histomorfometría Dinámica</u>	57
	<u>Histomorfometría estática</u>	59
	<u>Evaluación de la resistencia ósea</u>	61
	<u>Evaluación de la densidad mineral ósea y el contenido mineral óseo</u>	63
	<u>Objetivo 2</u>	65
	<u>Histomorfometría estática</u>	65
	<u>Morfometría dental</u>	66
	<u>Histomorfometría Dinámica</u>	66
	<u>Evaluación de la densidad mineral ósea y el contenido mineral óseo</u>	67
	<u>Objetivo 3</u>	68
	<u>Proteínas totales</u>	68
	<u>Contenido de polifenoles totales</u>	68
	<u>Creatinina</u>	68
	<u>Alanina aminotransferasa</u>	69
	<u>Parámetros de estrés oxidativo</u>	69
	<u>Análisis estadístico de los datos</u>	70
<u>9</u>	<u>RESULTADOS</u>	71
	<u>Peso corporal y evaluación del consumo de líquidos</u>	71
	<u>Objetivo 1</u>	73
	<u>Fémur</u>	73
	<u>Tibia</u>	75
	<u>Vértebras</u>	77
	<u>Hemimandíbula</u>	79
	<u>Objetivo 2</u>	81
	<u>Hueso alveolar interradicular</u>	81
	<u>Molares</u>	81
	<u>Objetivo 3</u>	84
	<u>Determinaciones bioquímicas</u>	84

<u>10</u>	<u>DISCUSIÓN</u>	87
<u>11</u>	<u>CONCLUSIONES</u>	98
<u>12</u>	<u>CITAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	99

AGRADECIMIENTOS

A todos los que fueron parte de este camino, y no me refiero únicamente a estos últimos años, sino a quienes me acompañan desde el principio, GRACIAS.

Sin lugar a duda, enfrentarse a esta página en blanco para expresar gratitud a todos los que hicieron que esto sea posible, es un desafío. No es sencillo mirar hacia atrás y recordar todos los momentos y personas que me ayudaron a completar esta gran tarea, pero vamos a intentarlo:

A mi familia, gracias por acompañarme en cada etapa de mi vida, por heredarme esta personalidad aventurera y un poco loca, y ser parte de mis desafíos. La forma en la que me enseñaron a ver la vida me lleva siempre más allá de lo que yo pienso que es posible.

A mis amigos, por cada mate, cada risa y cada hombro que use para llorar (porque lagrimas hubo y a montones). Gracias por ser mi cable a tierra, por estar en las buenas y permanecer en los momentos difíciles, por acompañarme cada día en esta travesía y porque sé que aun con kilómetros de por medio, seguirán siendo parte de mi vida.

Al LBO, que tiene y tendrá siempre un lugar especial en mi corazón, y que, por supuesto deja la vara muy alta, gracias por enseñarme a hacer ciencia, en un lugar donde aprendí, y donde también me toco enseñar, donde festejamos cada éxito y cada logro, pero donde también me tuvieron paciencia en cada experimento fallido. Lugar donde aprendí a ser becaria, directora, técnica, compañera, madre, amiga, conviviente, y muchos otros etcéteras. Y aunque ya no van a poder preguntarme en que cajón esta la tapita, el adaptador o la muestra que mandaron de Kazajistán hace 3 años atrás, de alguna forma u otra siempre seré parte del mejor laboratorio del mundo, el LBO.

A mi director Lucas, gracias por convencerme en hacer un doctorado en contra de mi voluntad, fue una las mejores decisiones en mi vida. Gracias por hacerme parte del LBO desde el principio, por la libertad creativa que les diste a mis locuras y por aceptar mis decisiones que fueron apareciendo y alterando este camino. Gracias por no limitar tu rol como director y acompañarnos no solo científicamente, si no en lo cotidiano nuestras vidas. Gracias por que no solo esperas lo mejor para este equipo, si no que siempre trabajas, te involucras y nos ayudas, para que cada uno de nosotros pueda seguir creciendo y teniendo oportunidades. Espero que la vida me siga dando la posibilidad de tener directores como vos.

A mi codirectora Lilian, gracias por abrirme las puertas y hacerme sentir como en casa, pero del otro lado del mundo. Gracias por acompañarnos en este inmenso desafío y por ayudarnos a ir más allá de lo que nosotros creíamos eran nuestros limites personales. Gracias al hermoso equipo que me acompañó en Indianápolis porque transformamos nuestros temores a un nuevo idioma, una nueva cultura y un nuevo modo de vida en una experiencia en la que nunca faltaron abrazos, amigos, comida, o compañía.

2 RESÚMEN

La yerba mate (YM) obtenida de la especie arbórea *Ilex paraguariensis* es utilizada en países de América Latina para la preparación de infusiones como el 'mate' que contienen cafeína y polifenoles. Al formar parte de la cultura y vida diaria de las personas, estas bebidas son consumidas incluso durante el embarazo. La ingesta de cafeína en esta etapa se ha asociado con una menor densidad ósea y peso al nacer en la descendencia, mientras que los polifenoles han demostrado mejorar las propiedades óseas y los parámetros de estrés oxidativo en plasma. El propósito de este estudio fue evaluar el impacto de la ingesta de infusiones de YM en la descendencia durante los periodos de gestación, lactancia y postnatal en el desarrollo y crecimiento de los huesos. Se utilizaron Ratas Sprague-Dawley hembras de diez semanas de edad y se dividieron aleatoriamente en un grupo control (GC) al cual se le administró agua *ad libitum*; grupos YM y YM+ que consumieron una infusión preparada con 50 g y 100 g de hojas de YM molidas en 1 litro agua a 70°C y 90°C respectivamente. Los tratamientos iniciaron previo a la preñez y hasta los 39 días de edad de las crías. La formación ósea en huesos largos y vértebras ocurre por medio del proceso de osificación endocondral y en hemimandíbulas por medio de la osificación intramembranosa por lo que se utilizaron estas piezas para evaluar estos dos patrones de osificación y además se realizó el análisis del tejido dentario. Se aplicaron ensayos de biomecánica para evaluar tanto tejido cortical como trabecular, análisis de densidad mineral ósea para la evaluar la composición del tejido óseo, ensayos de morfometría, e histomorfometría, y evaluación de la fracción del volumen de hueso trabecular. Finalmente se realizó un ensayo de histomorfometría dinámica para la evaluación del crecimiento óseo. A nivel plasmático se evaluaron parámetros de estrés oxidativo y parámetros de función renal y hepática. Como resultado de este trabajo se halló que los tratamientos con YM aumentaron la capacidad antioxidante en plasma. El volumen de la fracción ósea trabecular se halló aumentada en todas las piezas evaluadas, así como algunos de los parámetros biomecánicos en hemimandíbula. Sin embargo, se encontraron menores niveles de densidad

mineral ósea en los grupos tratados y no se evidenciaron diferencias a nivel histológico en los molares o en el crecimiento aposicional de los huesos, concluyendo que los tratamientos podrían inducir un aumento en la producción de hueso trabecular y que, al tratarse de hueso inmaduro, aún no está completamente mineralizado. Finalmente, los hallazgos de este estudio evidencian que la exposición a YM durante la etapa embrionaria y postnatal no produce un efecto negativo biológicamente relevante en el tejido cortical, mientras que se observa un incremento del tejido óseo trabecular que a largo plazo podría ser beneficioso para la salud ósea de las crías.

3 ABREVIATURAS

BMP	Proteínas morfogenéticas óseas
BMU	Unidades multicelulares básicas
BV/TV	Fracción de volumen trabecular
Cbfa1	Factor fijador central alfa 1
CSMI	Momento de inercia
DMO	Densidad mineral ósea
ERK 1/2	Vía de quinasas activadas por señales extracelulares
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
GLP-1	Péptido 1 similar al glucagón intestinal
GOT	Aspartato aminotransferasa
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo I
IL-1	Interleuquina-1
IL-6	Interleuquina-6
JNK	Vía de C-Jun N-terminal
LRP5	Proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad 5
LRP6	Proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad 6
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MAR	Tasa de aposición mineral ósea
MDA	Malondialdehído
OPG	Osteoprotegerina
Osx	Osterix
PTH	Hormona paratiroides
RANK	Receptor activador del factor nuclear κ B
RANKL	Ligando del receptor activador del factor nuclear κ B
ROS	Especies reactivas del oxígeno
TBARS	Sustancias reactivas a ácido tiobarbitúrico
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
TRAP	Fosfatasa ácida tartrato resistente
YM	Yerba mate

4 INTRODUCCIÓN

3.1 El tejido óseo

Estructura y función del tejido óseo

El sistema esquelético está formado por los huesos, órganos compuestos por tejido conjuntivo especializado. Estas estructuras proveen a los vertebrados ventajas evolutivas a través de sus funciones, entre ellas, soporte estructural, protección de órganos, soporte mecánico para el movimiento, homeostasis y metabolismo mineral, producción de células sanguíneas, y por último en su función como órgano endócrino.

El tejido presente en los huesos es un tejido conectivo especializado que le otorga características especiales a este sistema. Está compuesto por una matriz extracelular mineralizada con fibras colágenas donde se depositan sales de hidroxapatita, calcio y fósforo, formando una estructura o matriz con una parte orgánica y una parte inorgánica. Esta estructura aloja diferentes tipos celulares que se ocupan de la formación, mantenimiento y remodelado del tejido óseo [1].

En la superficie externa de los huesos se halla el periostio, una membrana de tejido conjuntivo fibroso que contiene vasos, nervios, y en su capa interna células osteogénicas responsables del crecimiento y la remodelación continua del hueso cortical [2]. Por otra parte, en las cavidades internas se halla el endostio formado por una sola capa de células, no es tan activo como el periostio durante el crecimiento activo de los huesos, pero también posee células osteoprogenitoras y fibras colágenas. Es ancho durante los primeros años de vida y su espesor va disminuyendo al llegar a la adultez. En resumen, el periostio se encarga de la formación ósea sobre la superficie externa del hueso mientras que el endostio se ocupa de formar la matriz interna y del mantenimiento de la cavidad de la medula ósea [3].

Clasificación según forma

Los huesos se clasifican de acuerdo con su forma en huesos largos como el fémur, huesos cortos como los huesos del carpo, huesos irregulares como las vértebras y

huesos planos como los de la mandíbula o el cráneo. Veremos algunos ejemplos:

Huesos Largos: El Fémur

El fémur es una estructura ósea que comienza a desarrollarse en el embrión a través del proceso de osificación endocondral. Está formado por tres regiones principales, la diáfisis es la parte central cilíndrica del hueso, la epífisis es la región en ambos extremos y la metáfisis es la región que se encuentra entre la diáfisis y las epífisis, que es además el sitio donde ocurre el crecimiento longitudinal de este tipo de huesos. Como ya mencionamos, hallamos una región interna conocida como endostio y una región externa recubriendo el hueso llamada periostio [2]. Todas las estructuras pueden observarse en la siguiente figura:

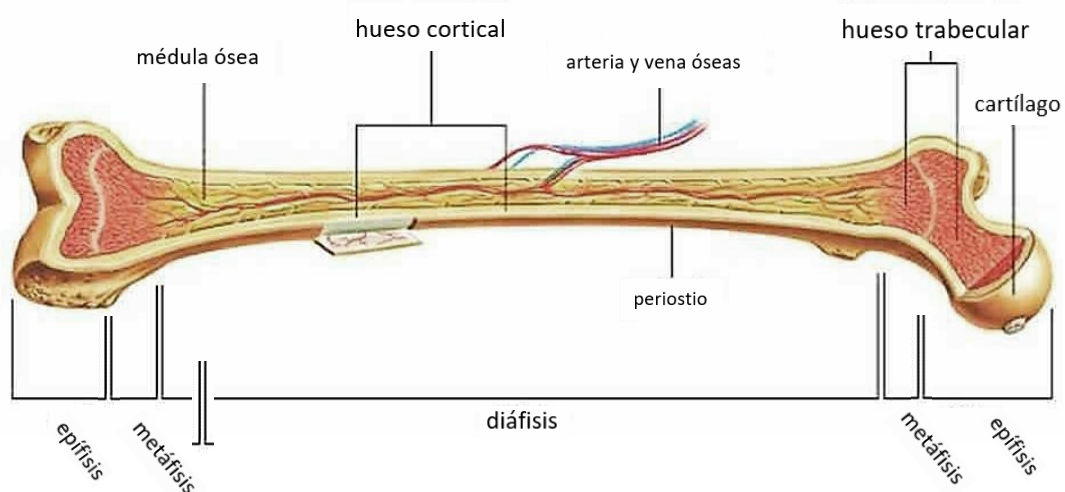


Figura 1 – Esquema anatómico de un hueso largo

Huesos planos: La mandíbula

La mandíbula, está anatómicamente dividida en dos mitades que en el caso de los humanos se fusionan en la sínfisis mandibular en la región central. Otras regiones de la mandíbula son el cuerpo y la rama ascendente desde donde se conectan el proceso corónide y proceso del cóndilo, además la mandíbula contiene al proceso alveolar en el que se alojan los dientes. La formación de este órgano implica el crecimiento, fusión y moldeado de una gran variedad de tejidos en el arco faríngeo, que comienza durante la cuarta semana de gestación en dos centros de osificación intramembranosa donde

el cartílago de Meckel sirve como guía, pero no forma parte del proceso de osificación. Por otra parte, y a diferencia del resto de la mandíbula, en el cóndilo se dará una osificación del tipo endocondral [4].

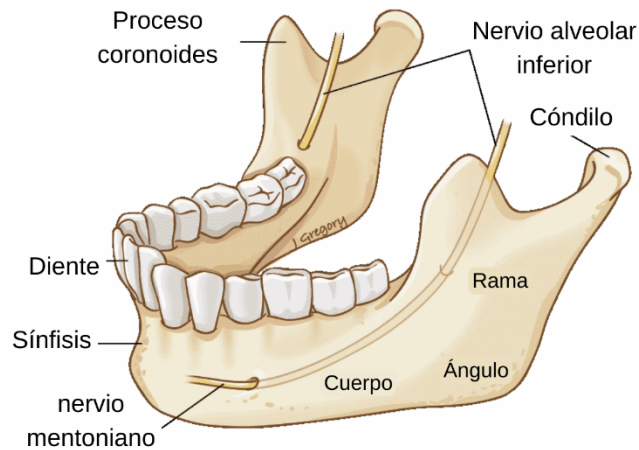


Figura 2 – Esquema anatómico de un hueso plano

Dientes

Su función más relevante es la masticación, pueden clasificarse en primarios o permanentes, el primer grupo hace su aparición entre los seis y ocho meses luego del nacimiento y son reemplazados posteriormente por los dientes permanentes [5]. De acuerdo con su función podemos clasificarlos en incisivos, caninos, premolares y molares. A nivel estructural, como se ve en la Figura 3, los dientes constan de una corona y una raíz, que se inserta en el hueso alveolar de la mandíbula uniéndose al mismo por el ligamento periodontal. Los dientes están conformados por un tejido conectivo mineralizado denominado dentina, cubierta en la zona coronaria por el esmalte, un tejido duro y resistente con muy poca actividad metabólica. El esmalte es secretado por los ameloblastos antes de la erupción de las piezas dentales, luego de esta etapa estas células sufren un proceso de senescencia y el tejido pierde su capacidad de regeneración o reparación. En la zona radicular la dentina está cubierta por el cemento. Finalmente, en el interior de la dentina se halla la cavidad pulpar, compuesta por un tejido conectivo laxo. Esta cavidad tiene dos regiones la pulpa coronaria y radicular, es un tejido altamente innervado donde se hallan los odontoblastos, células responsables de la producción de la dentina (Figura 4) [5].

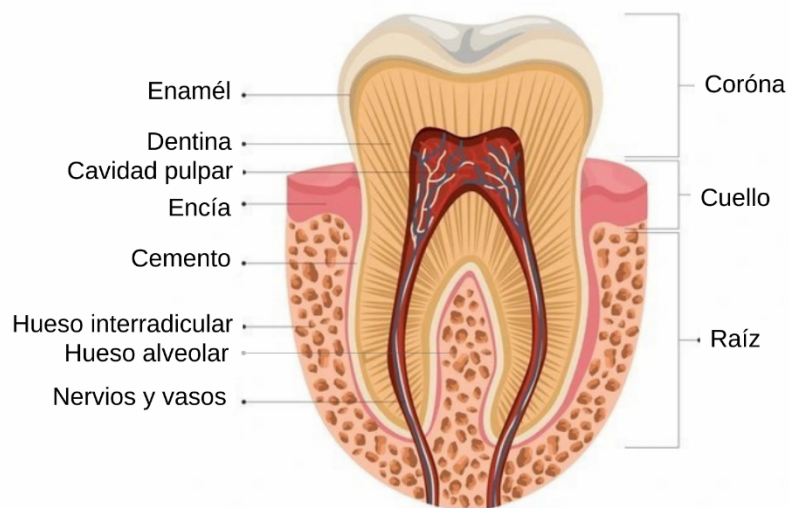


Figura 3 – Estructura de un molar

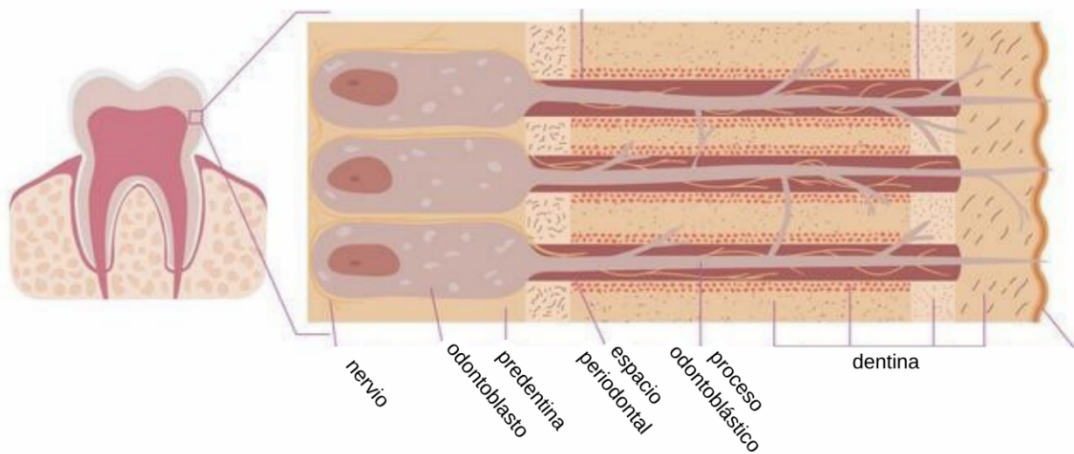


Figura 4 – Esquema de un corte histológico en sección longitudinal de un molar en la región de la dentina.

Huesos irregulares: Vértebras

Los huesos irregulares, en este caso las vértebras, están divididas en dos regiones, el cuerpo vertebral y el arco vertebral posterior, desde donde se extienden las apófisis (Figura 5). El cuerpo vertebral es el que soporta el peso y el arco vertebral forma un conducto entre todas las vértebras, que protege la medula espinal. Las vértebras se generan durante la etapa embrionaria por medio de un proceso de osificación endocondral [2].

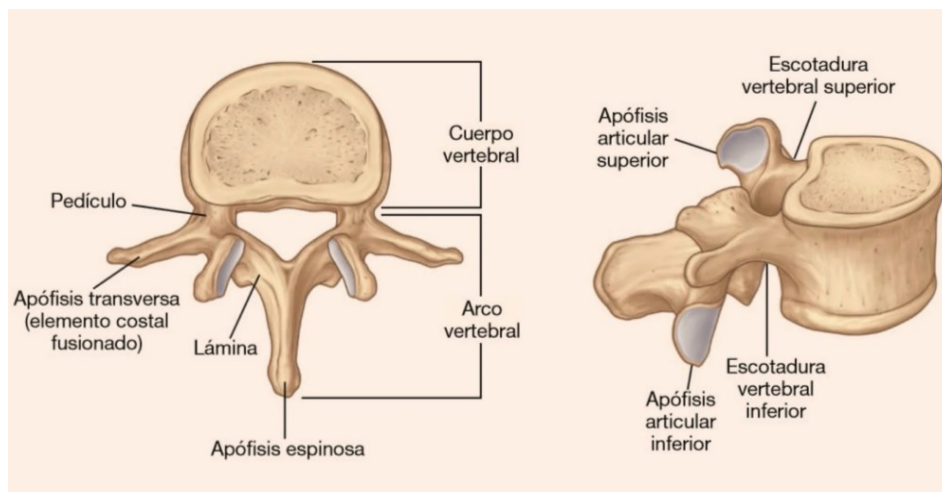


Figura 5 – Esquema de la estructura de una vértebra.

Adaptado de Gray, Anatomía para estudiantes. 4ª Ed. Drake, R.L.; Vogl, A.W.; Mitchell, A.W.M.

Clasificación según organización estructural

La estructura ósea es muy compleja, para poder conocer y comprender sus propiedades biomecánicas, deben tenerse en cuenta sus diferentes niveles estructurales u organización jerárquica.

A nivel macroscópico el tejido óseo puede clasificarse en cortical y trabecular; el primero se reconoce como una capa densa en la zona externa del hueso y cumple un papel en el soporte de cargas, su estructura consiste en láminas concéntricas que forman las osteonas o sistema de Havers por el cual circulan los vasos sanguíneos y nervios. El tejido trabecular está formado por finas espículas anastomosadas o trabéculas, posee aspecto poroso y se halla en la zona interna, la orientación de las trabéculas no es aleatoria si no que se correlaciona con la magnitud y la dirección de las cargas que soporta, que además redirige hacia el tejido cortical, más resistente [1].

En la siguiente figura se detallan ambas estructuras:

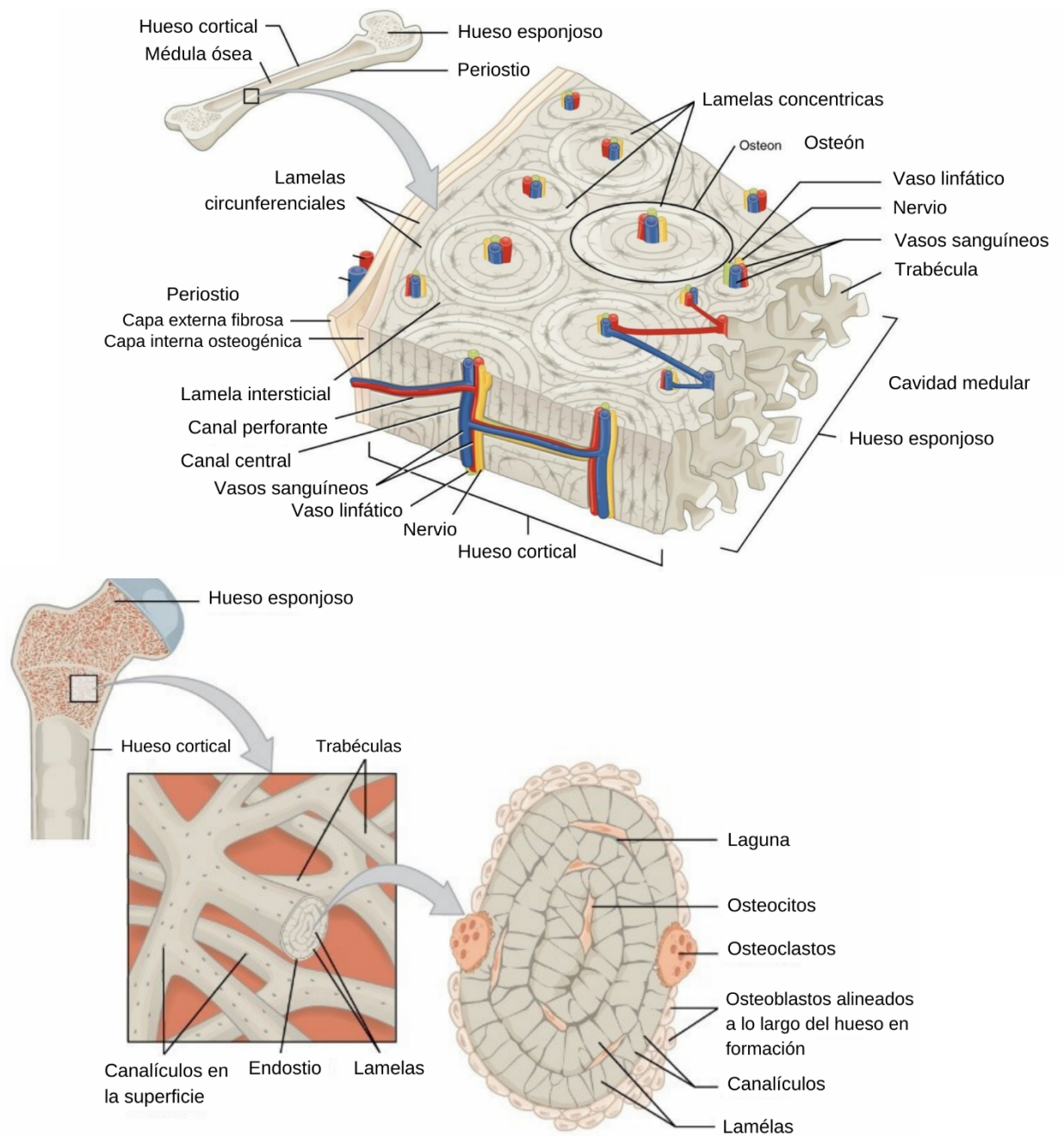


Figura 6 – Esquema de los 2 tipos de tejido óseo, arriba tejido cortical, abajo tejido óseo trabecular.

3.2 Composición del tejido óseo

A continuación, se detallan los tres componentes principales del hueso:

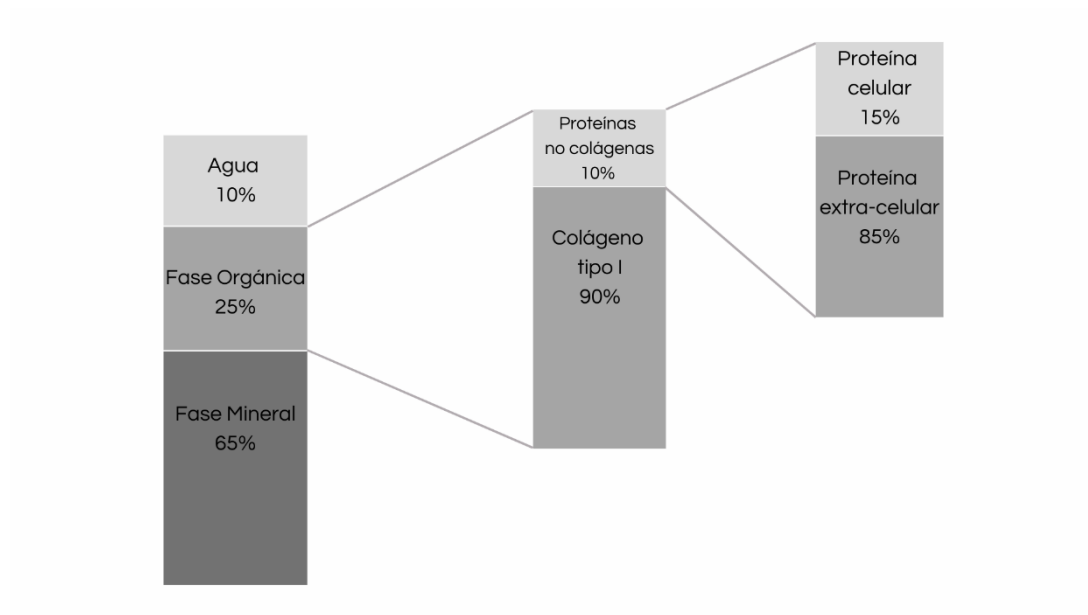
Matriz orgánica

El tejido óseo posee una matriz orgánica formada en su mayoría por colágeno y otras proteínas no colágenas:

- Colágeno: Aproximadamente un 90% de la fase orgánica del hueso está formada por colágeno de tipo I, también se encuentran presentes el colágeno tipo II y V. En la molécula de colágeno se halla la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD), que es reconocida por las integrinas de superficie de las células óseas [6]. También está formada por los aminoácidos hidroxilisina e hidroxiprolina, este último, es un marcador de los diferentes fenotipos de colágeno y sus valores de excreción urinaria tienen relación directa con la tasa de reabsorción ósea [7]. Las fibras de colágeno se estabilizan mediante puentes de hidrógeno y piridinolina entre aminoácidos. El colágeno no tiene gran afinidad por el calcio, por lo que para el proceso de mineralización se verán involucradas otras proteínas conocidas como proteínas no colágenas.
- Proteínas no colágenas: Estas proteínas conforman la sustancia fundamental del tejido y representa el 10% restante de proteínas, entre ellas encontramos proteoglucanos que contribuyen a la resistencia, glucoproteínas que participan en la adhesión como la osteocalcina, osteonectina o la sialoproteína ósea, proteínas con otras funciones como la fosfatasa alcalina que participa del proceso de mineralización de la matriz y, por último, factores de crecimiento y citosinas [1].

Fase mineral

La fase mineral de la matriz está formada por cristales pequeños de hidroxipatita que se depositan entre las fibras de colágeno, dando origen a un material que posee las características adecuadas de rigidez, flexibilidad y resistencia. En esta fase también



encontramos sales de sodio, magnesio, potasio y carbonatos [1]. En la siguiente figura

se resumen los componentes de la matriz ósea:

Células del tejido óseo

Entre las células principales que intervienen en los procesos dinámicos que ocurren en el tejido óseo encontramos:

Células osteoprogenitoras: Son células madre, precursoras de células especializadas, los osteocitos y osteoblastos. Se originan en la médula ósea por medio de la diferenciación de células mesenquimales. Son más abundantes y activas durante el desarrollo fetal o períodos de renovación ósea, y disminuyen su actividad durante la adultez. Están presentes en el endostio, en la capa externa del periostio y revistiendo a las células ontogénicas [8].

Figura 7 – Componentes principales de la matriz ósea. Adaptado de ref. 1

Osteoblastos: Son células cuboidales que representan de un 4 a un 6% del total de células óseas en el individuo adulto. Se ubican en las superficies donde el nuevo tejido está siendo sintetizado ya que son las encargadas de producir las proteínas de la matriz ósea, además de la enzima fosfatasa alcalina, fundamental para el proceso de mineralización. Están presentes a lo largo de toda la vida, pero debido a la alta demanda durante el desarrollo embrionario y la juventud, alcanzan su máxima actividad durante estos períodos. Estas células no están totalmente diferenciadas, los osteoblastos que quedan rodeados de matriz extracelular eventualmente se diferenciarán a osteocitos, y aquellos que quedan en la superficie ósea pasarán a ser células planas en el periostio. Finalmente, la mayoría de los osteoblastos sufrirán apoptosis [9].

Células planas: Estas células derivadas de la diferenciación de los osteoblastos cubren la superficie endóstica de la médula ósea donde no hay formación ni resorción del hueso, también están presentes en el periostio directamente sobre la superficie mineralizada. Se ha demostrado que estas células previenen la interacción directa de los osteoclastos con la matriz ósea cuando la reabsorción no debe ocurrir, además participan de la diferenciación de los osteoclastos produciendo osteoprotegerina (OPG) y el ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL). Los

osteoblastos y las células planas están en estrecho contacto por medio de uniones adherentes [10, 11].

Osteocitos: Representan entre el 90 y 95% de las células que conforman el esqueleto adulto y derivan de los osteoblastos diferenciados. Con una vida media de 25 años, se localizan en las lagunas celulares rodeados por el fluido óseo, por medio del cual recibirán señales mecánicas o químicas provenientes de otras partes del organismo que serán detectadas por las dendritas de los osteocitos y funcionarán como estímulos para que regule las funciones de los demás tipos celulares. Se encargan además de mantener el equilibrio entre los procesos de formación y resorción ósea durante el remodelado óseo [12,13]. La comunicación de los osteocitos sucede a través de uniones gap formadas por la unión de dos hemicanales en células adyacentes, cada canal está compuesto de seis moléculas de conexina, en este caso la conexina 43, es la más importante a nivel óseo [14]. Estos canales están cerrados en condiciones normales y se abren de forma transitoria ante determinados estímulos que aumentan la concentración intracelular de calcio [13].

Osteoclastos: Son células diferenciadas multinucleadas que se originan de células mononucleadas del sistema hematopoyético, su función principal es la resorción ósea. Sus múltiples núcleos están rodeados de mitocondrias, retículo endoplásmico, y aparatos de Golgi desarrollados. La presencia de vesículas, lisosomas y vacuolas indican que estas células están involucradas activamente en la producción de energía y la síntesis de proteínas. Los osteoclastos tienen la capacidad de crear un microambiente con la matriz ósea subyacente. En este compartimiento el pH es bajo por la actividad de la anhidrasa carbónica II, permitiendo la liberación de H^+ por medio de una bomba de protones que se encuentra en la membrana basolateral y genera un pH de 4,5 [15,16,46]. Esta acidificación permite una descalcificación localizada del componente óseo mineralizado, exponiendo a las proteínas de la matriz ósea, que ahora pueden ser degradadas por enzimas como catepsina K, fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP), metaloproteasas y gelatinasa [17]. La capacidad del osteoclasto para formar un microambiente cerrado con la matriz ósea es un requisito indispensable para que ocurra la resorción ósea. Esta zona sellada se genera con un anillo de filamentos de actina y extensiones celulares que aíslan esta zona generando un

compartimento cerrado. El anclaje de la célula a la matriz se da por acción de una integrina que tiene la capacidad de reconocer y adherirse a secuencias de aminoácidos Arg-Gli-Asp, presentes en la mayoría de las proteínas óseas, como osteopontina y sialoproteína [3].

Diferenciación de células óseas

Diferenciación de osteoblastos

Las células osteoblásticas derivan de la diferenciación de células mesenquimales, su regulación y proliferación a partir de precursores es fundamental para el mantenimiento de la masa ósea. La diferenciación celular depende de factores de transcripción, como el factor fijador central alfa 1 (Cbfa1, del inglés core-binding factor alpha 1) y osterix (Osx), proteínas morfogenéticas óseas (BMP) y de la vía de señalización Wnt; estos últimos dos factores son los reguladores más relevantes de la diferenciación osteoblástica. También hay otros reguladores como el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-1) y la leptina [18].

Las proteínas BMP se unen y activan receptores en las células mesenquimales por medio de la fosforilación. Estos receptores activados fosforilan proteínas citoplasmáticas lo que induce su asociación y la formación de un complejo heteromérico. Este complejo fosforilado se transloca luego al núcleo donde ejerce su función como regulador de la transcripción, activando genes que promueven la diferenciación de las células mesenquimales a osteoblastos. Otra vía que usan las BMP activa a la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) que también ejerce su función regulando la transcripción de genes que activan la osteoblastogénesis [19,20].

Otra de las vías de señalización importante para la activación de la osteoblastogénesis es la vía Wnt, la cual consta de glicoproteínas que traducen sus señales a través de receptores que expresan los osteoblastos conocidos como LRP5 y LRP6 (*low-density lipoprotein receptor-related protein*: proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad). La vía Wnt estimula la osteoblastogénesis al aumentar la proliferación y diferenciación de preosteoblastos, y al reducir la apoptosis de osteoblastos. Cuando el ligando Wnt está presente, se acumula β -catenina en

citoplasma que se transloca al núcleo, donde inicia la transcripción de los genes blanco [21].

Osteoclastogenesis

La formación de los osteoclastos y su actividad durante la resorción ósea están bajo regulación de un sistema que involucra factores estimulantes secretados por células estromales, osteoblastos y osteocitos. Uno de ellos es RANKL, que interactúa con los receptores en las células precursoras de osteoclastos, conocido como receptor activador del factor nuclear κB (RANK). La unión entre RANKL y RANK conduce a la activación de los factores de transcripción que causan la diferenciación de los precursores mononucleares a osteoclastos multinucleados [22]. El ligando RANKL está presente como proteína transmembrana en la superficie de las células estromales, y alternativamente es producida de manera soluble durante la inflamación por los linfocitos T, esto implica que los procesos inflamatorios pueden estimular la resorción ósea.

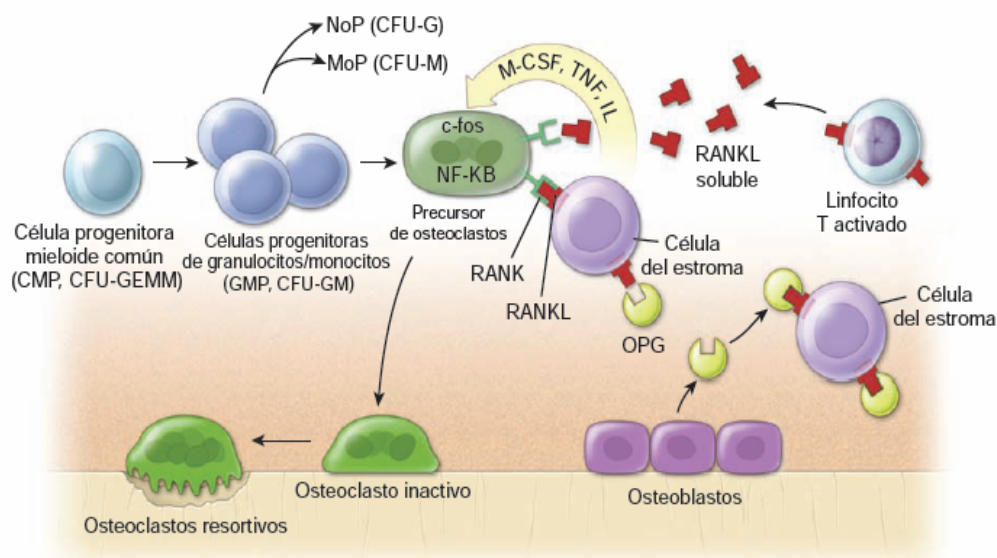


Figura 8 – Regulación de las principales células del tejido óseo.

Otras citoquinas y factores como interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-6 (IL-6), hormona paratiroides (PTH), 1,25- dihidroxivitamina D y calcitonina también están involucrados en la regulación de la diferenciación y activación de los osteoclastos [22,23].

Por su parte los osteoblastos también sintetizan OPG que al unirse a RANKL impide la interacción RANK/RANKL y por lo tanto su diferenciación a osteoclastos. Es así como el balance entre RANKL y OPG es determinante de la formación y la actividad de los osteoclastos [22].

3.3 Osteogénesis, modelado y remodelado

La osteogénesis o formación ósea es un proceso que inicia durante la sexta y séptima semana del estadio embrionario y continua luego del nacimiento hasta los 25 años de edad [24].

Síntesis de la matriz ósea

Para la formación del tejido óseo, los precursores osteoblásticos deben migrar de la médula a la superficie ósea donde se diferencian a osteoblastos maduros y depositan matriz ósea. En este proceso intervienen el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y BMP-2, necesarios para la diferenciación y crecimiento de los precursores osteoblásticos. También participan integrinas y proteínas de la matriz extracelular como la osteopontina, la sialoproteína ósea, la vitronectina, el colágeno tipo I y la fibronectina [25].

Los osteoblastos maduros e inmaduros son las células encargadas de la formación de la matriz extracelular; este proceso requiere de la secreción de colágeno tipo I y otras proteínas por parte de los osteoblastos, con la subsecuente mineralización de esta matriz. El colágeno forma una superficie organizada que será mecánicamente estable, y que además actúa como un esqueleto que permite el anclaje de los osteoblastos, su regulación y crecimiento. [26].

La síntesis de la matriz ósea puede dividirse en tres estadios: proliferación, maduración o desarrollo y mineralización. La síntesis de colágeno por parte de los osteoblastos ocurre de la misma manera que para el resto de las proteínas iniciando con la transcripción y traducción del ARN mensajero de dos tipos de polipéptidos que darán lugar al colágeno tipo I, la cadena α_1 y α_2 . Luego de su síntesis el colágeno es rápidamente depositado en el sitio de modelado o remodelado óseo, dando como resultado la formación de una capa osteoide que va ocupando una mayor proporción del tejido. En un proceso posterior la tasa de síntesis de colágeno disminuye mientras que la tasa de mineralización aumenta para igualar a la velocidad de la producción del osteoide, finalmente la producción de colágeno cesa, y la mineralización del tejido de da de forma completa [26].

La formación de los huesos, como todo órgano, se da por medio de mecanismos complejos que requieren de la presencia de células especializadas para dar lugar a todas las estructuras finales, en el caso de los huesos este proceso se da por medio dos tipos de osificación según la región del esqueleto.

Osificación intramembranosa

Es el proceso que ocurre durante el periodo embrionario por el cual se originan los huesos del cráneo, la mandíbula y clavículas. Este inicia por medio de la proliferación y condensación de células mesenquimales que están rodeadas de un tejido conectivo primitivo u osteoide y que posteriormente se diferencian a osteoblastos. La producción inicial de la matriz da lugar a un centro de osificación primaria, donde el crecimiento de la pieza ósea comienza a ocurrir. Cuando los osteoblastos quedan rodeados de matriz extracelular, se diferenciarán a osteocitos y de este modo se forma el hueso primario, una estructura inicialmente poco organizada que surge de la producción acelerada de colágeno. Además, en esta etapa comienza la formación los vasos sanguíneos necesarios para el suministro de nutrientes a este tejido [24].

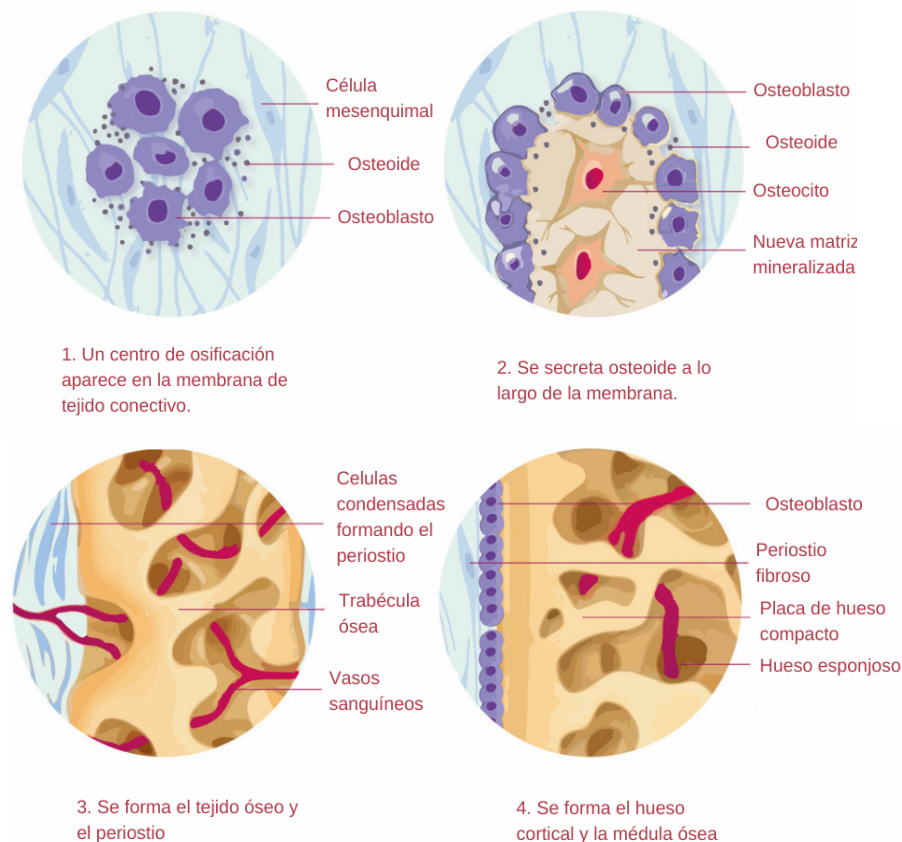


Figura 9 - Etapas del proceso de osificación intramembranosa

Osificación endocondral

La osificación endocondral es el proceso mediante el cual se forman la mayoría de los huesos del cuerpo, excluyendo los del cráneo y las clavículas. Comienza con células mesenquimales que se agrupan y diferencian en condroblastos. Estos condroblastos secretan una matriz cartilaginosa lo que estimula la diferenciación de condroblastos a condrocitos. El cartílago producido se denomina cartílago hialino y funciona como molde para la formación ósea. Rodeando al cartílago se encuentra el pericondrio, una membrana fibrosa con células que se diferencian a osteoblastos y comienzan el proceso de formación ósea en la región de la diáfisis. Así, se forma una estructura conocida como collar óseo formado por hueso lamelar, que limita la difusión de nutrientes al cartílago y promueve su mineralización. Todo este proceso genera señales para la migración de vasos sanguíneos primarios, que van a suministrar células osteoclásticas y nutrientes para la formación de la cavidad medular y el centro de osificación primaria. Por otra parte, en los extremos del hueso se forman los centros de osificación secundaria que se da por medio de la placa de crecimiento, responsable del crecimiento longitudinal de los huesos. [24,27]

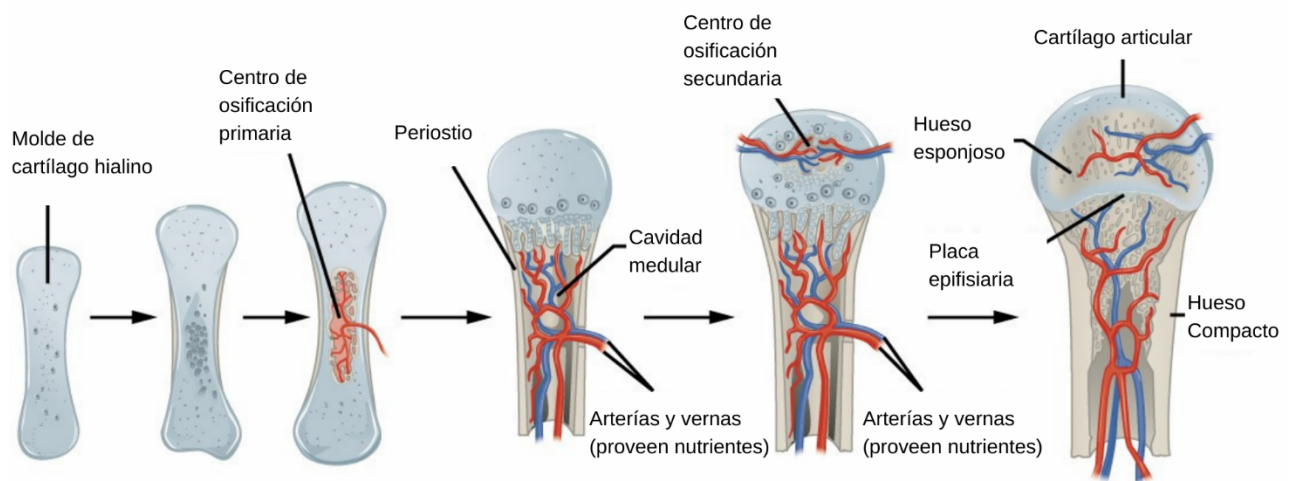


Figura 10 - Esquema del proceso de osificación endocondral.

Hueso inmaduro y hueso maduro

El hueso en formación en el embrión se conoce como hueso inmaduro o primario, este difiere del hueso maduro en que no presenta una organización estructural laminar organizado. Por la disposición de las fibras colágenas esta variedad ósea se conoce como fasciculado con una disposición entrelazada de las fibras colágenas. También

contiene una mayor cantidad relativa de células con una distribución aleatoria, mientras que en el hueso maduro las células se orientan con su eje mayor paralelo a las laminillas. En el hueso inmaduro la sustancia fundamental ocupa mayor porcentaje que en el hueso maduro. Finalmente, el hueso inmaduro no se halla totalmente mineralizado al inicio, mientras que el hueso maduro posee una mineralización prolongada, con una mineralización secundaria donde los sistemas de Havers más recientes están menos mineralizados que los más antiguos en la región cortical [3]. Estas características pueden observarse en la Figura 11 donde se muestra la diferencia estructural en cada uno de estos tejidos.

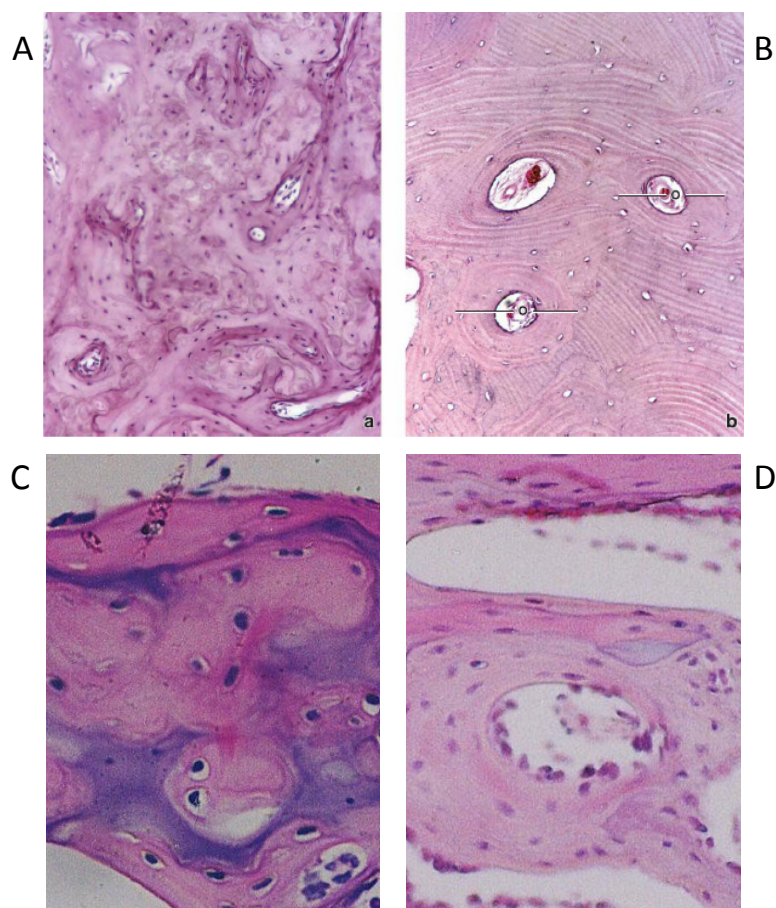


Figura 11 - Cortes histológicos de hueso maduro e inmaduro teñidos con hematoxilina eosina. A: tejido cortical inmaduro B: tejido cortical maduro con canales haversianos (o) C: Tejido trabecular inmaduro. D: tejido trabecular inmaduro.

Remodelado Óseo

La formación y el mantenimiento de la estructura ósea dependen del proceso de remodelado óseo llevado a cabo en las unidades multicelulares básicas (BMU), sitio

donde las células trabajan en conjunto en un constante equilibrio, acoplando la actividad y función de osteoblastos y osteoclastos. Una sub o sobreproducción del tejido óseo, da lugar a condiciones patológicas, en muchos casos perjudiciales para la salud humana. Por lo tanto, la renovación del tejido óseo en un ritmo adecuado se convierte en una condición necesaria para mantener la calidad y estructura de este a lo largo de la vida [28].

La remodelación ósea consta de 5 fases: activación, resorción, reversión, formación y mineralización [29].

Durante la activación, las células mononucleadas precursoras de osteoclastos, se reclutan en cercanía a la superficie ósea cubierta por células planas, para posteriormente fusionarse y formar los osteoclastos. La formación, activación, y actividad de los osteoclastos están reguladas por citoquinas secretadas localmente y también por factores sistémicos.

La fase de resorción está dominada por la actividad de los osteoclastos que, gracias a moléculas de adhesión y proyecciones celulares, se unen a la superficie del hueso formando una laguna de resorción donde actuarán solubilizando el mineral por medio de una acidificación del microambiente, y degradando la matriz orgánica por medio de metaloproteinasas y catepsinas. Una vez completado el proceso, estos osteoclastos, mueren por apoptosis.

Al finalizar la fase de resorción, se produce una fase de inversión, que es una transición en la cual la actividad de los osteoclastos va disminuyendo hasta que son reemplazados completamente por pre-osteoblastos y células mononucleares que comenzaran la siguiente etapa de este proceso.

La siguiente fase es la de formación, donde los osteoblastos son reclutados al sitio de remodelado y secretan nueva matriz orgánica conocida como osteoide, que luego comienza a mineralizarse para formar el tejido óseo.

Por último, en el proceso de reposo, estos osteoblastos pueden quedar rodeados de matriz y diferenciarse a osteocitos, o como células de revestimiento, mientras que otras mueren por apoptosis.

Remodelación ósea

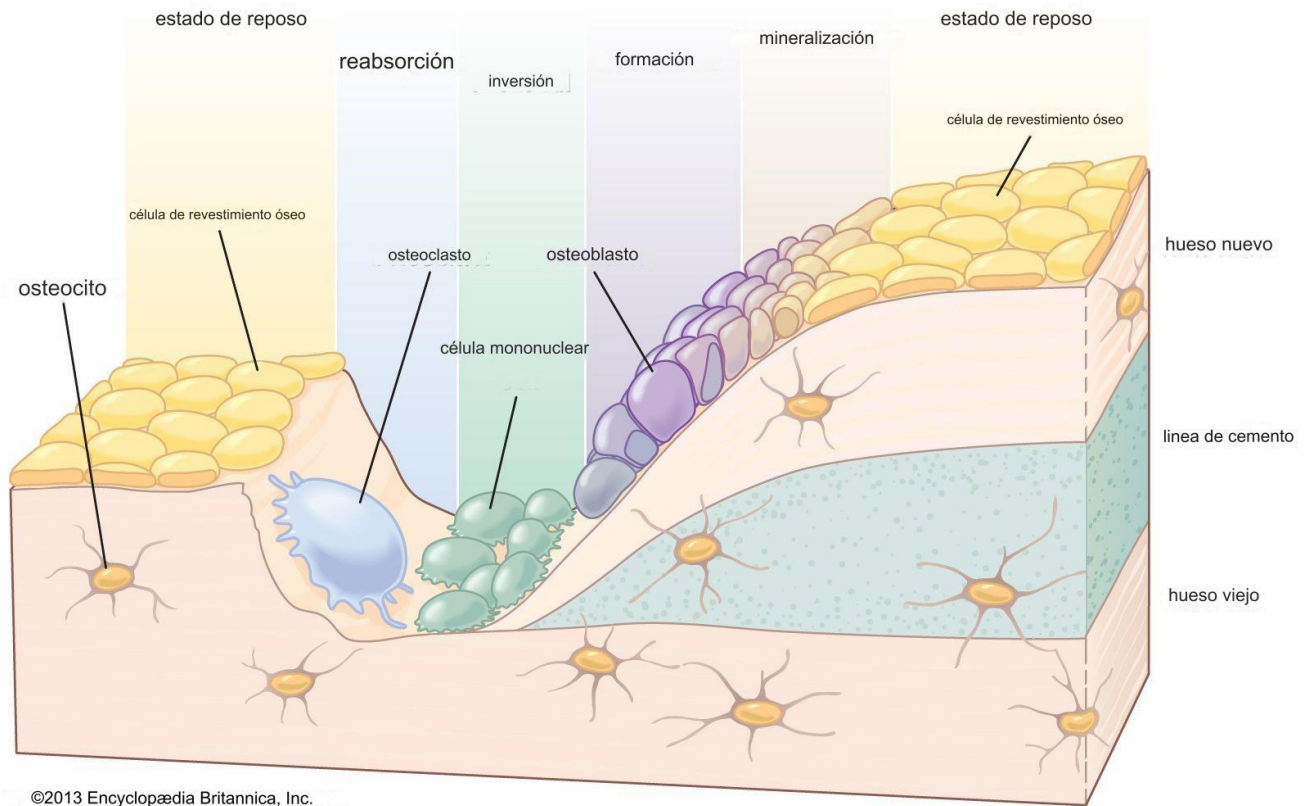


Figura 12 - Esquema de las 5 fases del proceso de remodelado óseo.

Mineralización del tejido óseo

A pesar de que en la actualidad no se conoce el mecanismo exacto por el cual ocurre este proceso, en uno de los posibles modelos se propone que la nucleación y formación de los cristales de hidroxipatita es llevada a cabo por un transporte acoplado en dos fases, que primero remueve los protones y luego condensa los minerales en cristales densos [30]. Hay dos pasos continuos y secuenciales para el depósito de minerales en el hueso, primero se da un rápido incremento en el número de cristales debido a una nucleación heterogénea (mineralización primaria) y luego un crecimiento lento y la maduración de los cristales. La nucleación se produce en las regiones de separación entre los extremos de las fibras de colágeno y a lo largo de los poros que se forman entre ellas. [1]

La hidroxipatita le proporciona la rigidez mecánica y la resistencia de carga al hueso.

Los cristales de hidroxiapatita son extremadamente pequeños y pueden contener numerosas impurezas como carbonato, magnesio y fosfato ácido.

En las células la mineralización comienza por acción de vesículas liberadas por los condrocitos y osteoblastos que facilitan la liberación de calcio y fosfato. Las enzimas también pueden regular la mineralización, particularmente la fosfoproteín-fosforilasa y la fosfatasa alcalina. Esta última hidroliza los ésteres fosfóricos aumentando la concentración local de fosfato, y por lo tanto aumentando el grado de mineralización [31].

3.4

Yerba Mate

La yerba mate (YM) obtenida de la molienda y procesado de la especie arbórea *Ilex paraguariensis* es consumida diariamente en países de América Latina como Brasil, Argentina, Paraguay y Uruguay para la preparación de infusiones calientes o frías como el 'mate' o 'tereré'. El consumo promedio de yerba mate se estima entre unos 8 a 10 kilos per cápita al año en Uruguay, 6,5 kg en Argentina y de 3 a 5 kg en el sur de Brasil [32,33,34].

De estos países, Argentina posee los niveles de mayor producción, principalmente en las provincias de Corrientes y Misiones, donde se cultivan plantaciones y se cosechan alrededor de 280 toneladas al año [35]. Para obtener el producto final, la materia prima debe pasar por diferentes procesos antes de ser envasada como el blanqueo, secado y estacionamiento. Estas etapas variaran de acuerdo con el productor y a las características que se quieren obtener en el producto final. El proceso de blanqueado permite inactivar las enzimas polifenol oxidasas, evitando la oxidación de los polifenoles presentes [36]

3.5 Compuestos presentes en la yerba mate

Polifenoles

Como su nombre lo refiere son estructuras compuestas por uno o más anillos fenólicos sustituidos con grupos hidroxilos. Esta clase de compuestos son sintetizados por las plantas como producto de su metabolismo secundario, y en muchos casos son indispensables para sus mecanismos biológicos [37].

Los polifenoles presentes en los alimentos, en este caso en las infusiones de YM pueden ejercer diferentes efectos fisiológicos en los seres humanos principalmente por su capacidad antioxidante que actúa en reacciones de óxido-reducción y por medio de su capacidad de modulación de enzimas, produciendo beneficios sobre la salud y reduciendo el riesgo de la incidencia de ciertas enfermedades [34].

El contenido y concentración de polifenoles presentes en la YM varían de acuerdo con la región en la que fue cultivada, la época del año, el proceso de secado, y el clima, entre otros. [38]

Los polifenoles hallados en la YM pueden clasificarse en dos grupos mayoritarios de acuerdo con su estructura y biosíntesis:

Por un lado, los **flavonoides** tienen una estructura común, en general se componen de dos anillos aromáticos y un ciclo de carbonos unidos a oxígeno. Entre los flavonoides sintetizados por *I. paraguariensis* encontramos rutina, quercetina, kaempferol y miricetina [37].

El segundo grupo son los **cafeoil derivados**, en su estructura poseen un único anillo aromático unido a una cadena lateral con un grupo carboxilo. Representan un 10% del peso seco y entre ellos encontramos ácido clorogénico, ácido 4,5- dicafeolquínico, ácido 3,4-dicafeolquínico, ácido 3,5-dicafeolquínico y ácido cafeico. A estos compuestos se les atribuye el principal poder antioxidante de la YM [34].

Figura 13 - Estructura general de Cafeoil derivados

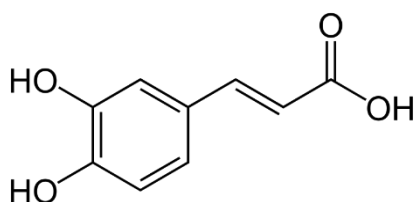
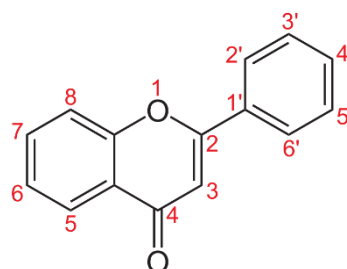


Figura 14 - Estructura general de flavonoides



La concentración de polifenoles en las infusiones preparadas con YM ha sido estudiada por varios autores quienes han reportado diferentes valores según el método de extracción y otros factores inherentes al proceso productivo de la YM.

Butiuk y colaboradores encontraron que los polifenoles derivados de *I. paraguariensis* constituyen el componente bioactivo predominante, con una concentración de $7,73 \pm 0,15$ mg/ml de ácido clorogénico en extractos acuosos, un valor mayor al hallado en infusiones de té ($7,15 \pm 0,14$ mg/ml) [39, 40]. Por su parte, el grupo de Mazzafera utilizó infusiones preparadas con 1,5 g de YM en 30 ml de agua corriente a 85 °C, hallando valores de 0,48 mg de ácido clorogénico/ml, lo que implica un consumo de 72 mg ácido clorogénico al ingerir 150 ml de una infusión de YM [41]. En otro ensayo realizado por Heck con una infusión preparada con la misma metodología mencionada previamente, hallaron que los valores de polifenoles podían variar en un rango de $100,3 \pm 5,5$ a

179,7 ± 3,6 equivalentes de ácido clorogénico por gramos de hojas secas dependiendo de las condiciones de crecimiento de las plantas. [38]

Finalmente, en relación con la abundancia de los polifenoles en los extractos de YM, Heck y colaboradores realizaron una identificación de los componentes presentes en la YM por HPLC obteniendo el siguiente perfil cromatográfico en el cual se puede observar que el ácido clorogénico y sus derivados son los constituyentes

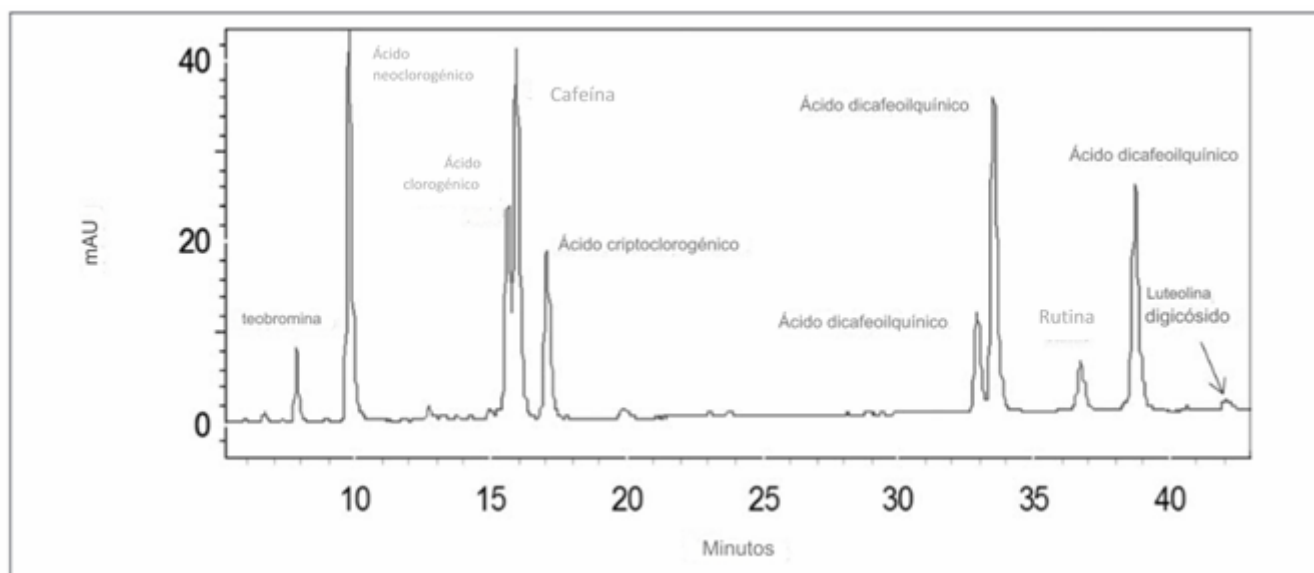


Figura 15 - Perfil cromatográfico con componentes de YM. Adaptado de Ref 36. predominantes. [36]

Biodisponibilidad de los polifenoles: absorción y metabolismo

Para establecer la efectividad de la acción a nivel fisiológico de los compuestos de la YM en el ser humano, es importante establecer su biodisponibilidad, es decir la capacidad efectiva para ser absorbidos, metabolizados y finalmente ejercer su actividad sobre el organismo. Estos son factores a tener en cuenta, ya que los compuestos más abundantes de la dieta no serán necesariamente los de mayor biodisponibilidad. Por otro, lado la absorción no se relaciona de forma directa con la concentración presente de estos compuestos en los tejidos y con su bioactividad. Bajo condiciones de consumo regular, incluso pequeñas cantidades de polifenoles pueden ser absorbidos e incrementar su concentración en plasma y a nivel celular [42].

La mayoría de los polifenoles presentes en la dieta se encuentran en formas

químicamente modificadas unidas a grupos esteres, a glucósidos o formando polímeros. Para que puedan ser absorbidos deben ser hidrolizadas. Una vez absorbidos los polifenoles son procesados en el organismo como xenobióticos a través de mecanismos de conjugación en el hígado como metilación, sulfatación y glucuronidación. Finalmente, cada polifenol puede dar lugar a diferentes metabolitos que pasan a la circulación sistémica y serán transportados a los diferentes tejidos [43].

En el caso particular del tejido óseo, un estudio reciente demostró que algunos polifenoles, entre ellos la rutina, solo presenta actividad antiosteoclástica cuando se encuentra en su forma de aglicona, es decir, en su forma libre no conjugada. Esto requiere que, para que el polifenol tenga actividad en el tejido, el glucurónido unido al polifenol debe ser hidrolizado. Sorprendentemente, se descubrió que el hueso posee actividad beta glucoronidasa, la cual es necesaria para convertir al polifenol en su forma activa [44].

Durante el periodo de gestación y lactancia, los polifenoles presentes en la dieta de la madre podrán además pasar desde la circulación hacia la leche materna [45].

Xantinas

Las xantinas son alcaloides derivados de purinas que se encuentran en plantas como el té, café o cacao. Las xantinas de la YM incluyen la cafeína (1,3,7-trimetilxantina), la teobromina (3,7- dimetilxantina) y la teofilina (1,3-dimetilxantina). De estas tres, la cafeína se encuentra en una mayor concentración, 1% a 2% del peso seco, seguido por la teobromina con 0,3% a 0,9% del peso seco. Las xantinas son las responsables del efecto estimulante en el sistema nervioso central y, en parte, del sabor de las bebidas de YM [36].

La concentración de cafeína en relación al consumo es de aproximadamente 78 mg de cafeína cada 150 ml de infusión, esto es similar a los 85 mg de cafeína que posee una taza de café. Sin embargo, en países como Argentina o Uruguay donde la población consume estas infusiones diariamente, la cantidad de cafeína ingerida diariamente puede alcanzar hasta 300 mg, igualando el consumo diario de cafeína de países como Estados Unidos. Además, en Argentina el consumo diario para niños de 10 años o

menores es de 35 mg al día, para aquellos entre 11 y 15 años fue de 120 mg diarios y para el grupo de 16 a 20 años de 240 mg/día. [41, 46, 47].

Panzl y colaboradores hicieron determinaciones de la relación cafeína/ácidos dicafeolquínicos en una infusión con 50 g de YM en 1 litro de agua pura a 80°C por. Esta relación se utiliza en general para establecer el nivel de tostado en muestras de café, y es una medida de la relación entre ácidos clorogénicos y cafeína en los granos. En el experimento de Panzl los valores obtenidos para el caso de la YM fue de 0,6 para yerba tostada y entre 0,15 y 0,27 para YM sin tostar, mientras que para el café se obtuvieron relaciones de 0,4 a 4,6 dependiendo de la variedad. Se puede ver de este modo que la YM provee una mayor cantidad relativa de ácido clorogénico respecto a la cafeína, por lo que se considera una fuente de ácidos clorogénicos en la dieta [48]. Por su parte se halló que el contenido de cafeína presente en bebidas frías como el tereré fue 2,5 veces mayor que en bebidas calientes [34].

Biodisponibilidad de las xantinas: Absorción y metabolismo

La cafeína, así como las demás xantinas presentes en la YM, presentan una completa y rápida absorción en el organismo, 99% de la cantidad ingerida es absorbida luego de 45 minutos, la máxima concentración en plasma se da entre 15 y 120 minutos después del consumo de esta sustancia. Luego de ser absorbida se distribuye en el agua corporal y es lo suficientemente lipofílica como para atravesar las membranas biológicas incluyendo la barrera hematoencefálica [49].

La vida media de la cafeína en el plasma de individuos sanos es de aproximadamente 5 horas, y esto puede variar para mujeres embarazadas, mujeres con tratamientos anticonceptivos, el feto o niños en desarrollo, llegando a permanecer hasta por 30 horas en el sistema, lo que hace más susceptible a estos grupos a los efectos tóxicos de la cafeína. La dosis letal en humanos es de 150–200 mg/kg de peso corporal [49].

La cafeína es metabolizada en hígado a metilxantinas, ácido úrico y otros derivados. en humanos la principal vía elimina un grupo metilo a la cafeína, obteniendo paraxantina como el metabolito más abundante, superando 10 veces las concentraciones de otros metabolitos como teobromina o teofilina. La cafeína es clarificada más rápido que la paraxantina, y 10 horas luego de la ingestión esta última excede hasta 10 veces las

concentraciones de cafeína en plasma [49].

Saponinas

Las saponinas son moléculas con alto peso molecular, solubles en agua, formadas por una aglicona o sapogenina unido a una o más cadenas de azúcar, en general las saponinas de la YM están formadas por un triterpeno como aglicona que puede ser ácido ursólico o oleanólico. Son las principales responsables del sabor amargo de las infusiones de YM. Se distinguen de otros glicósidos por sus propiedades tensoactivas que generan espuma al ser agitados [50]. Las funciones biológicas de las saponinas se basan en su capacidad de formar micelas mixtas con esteroides y ácidos biliares. Las principales saponinas identificadas en YM son las matesaponinas 1 a 5, En el caso de la matesaponina 1 se hallaron concentraciones de 352 µg/ml en infusiones preparadas 15 g de hojas en 100 ml de agua. Las hojas contienen relativamente un porcentaje elevado de saponinas, entre un 5% a 10% del peso seco total [51,52].

Minerales

Los datos existentes sobre el contenido de minerales en la YM comercial son variables debido a que la extracción de minerales de las hojas en las infusiones no muestra la misma relación que la obtenida en hojas secas de YM. Por ejemplo, el contenido de calcio en las hojas es mayor que el hallado en infusiones, esto ocurre ya que el calcio posee baja solubilidad en agua [53]. Otro factor que afecta la cantidad de minerales son las variaciones en el cultivo y el posterior procesamiento de las hojas, ambos cambian drásticamente la composición mineral obtenida. Esto también se ve influenciado por el uso de fertilizantes y el tipo de suelo. [36]

Los principales macronutrientes en las hojas de YM son K, Ca, Mg y P con cantidades de 11,35, 7,69, 6,99 y 1,37 mg/g de hojas secas respectivamente, mientras que, entre los micronutrientes, el Mn y Fe son los más abundantes con 0,68 y 0,12 mg/g de hoja secas. [34]

Además, si se consume un litro de estas infusiones al día se cubre un 45% de los requerimientos de Mg en mujeres y un 34% en hombres, y en el caso del Mn un 204% en mujeres y un 159% en hombres [54].

3.6 Actividad biológica de los extractos de *Ilex paraguariensis* y sus componentes

El estudio de las propiedades de las infusiones de YM y sus efectos sobre la salud ha captado la atención de diferentes grupos de investigación desde hace tiempo.

En la siguiente tabla se resumen los efectos estudiados de los componentes individuales presentes en la YM con los efectos biológicos observados:

Tabla 1 - Principales efectos en la salud de los componentes presentes en la YM. Adaptada de [36]

Compuestos	Actividad Biológica
Cafeína	Anti carcinogénica, anti obesidad, antioxidante, antitumoral, diurético, energizante, estimulante, inhibidor de la topoisomerasa I y II, vasodilatador
Ácido Clorogénico	Antioxidante, analgésico, anti aterosclerótico, antibacteriano, antidiabético, antitumoral, colerético
Rutina	Antioxidante, antitumoral, previene las úlceras, vasodilatador, inhibidor de la AMPc fosfodiesterasa y de la topoisomerasa II
Tanino	Entre ellos la quercetina, antioxidante, antitumoral
Teobromina	Inhibidor de AMPc, inhibidor de la AMPc fosfodiesterasa, diurética, estimulante, miorelajante
Saponinas	Metabolismo del colesterol, absorción de grasas de la dieta
Teofilina	Inhibidor de AMPc, inhibidor de la AMPc fosfodiesterasa, diurética, colerética, estimulante, vasodilatador, miorelajante

Estudios previos demostraron que el consumo de infusiones de hierbas a base de mate, guaraná y damiana causaron una drástica ralentización del vaciado gástrico, así como una disminución en el tiempo percibido para la plenitud gástrica, aumentando así la sensación de saciedad. El mate, además, ha demostrado tener potencial en los tratamientos para la pérdida de peso y se lo considera un suplemento dietético. El mecanismo de estos efectos no se conoce con certeza, pero se indica que podría deberse a su concentración a la presencia de cafeína, la cual posee actividad lipolítica, o a la concentración de saponinas que interfieren con el metabolismo del colesterol y retrasan la absorción intestinal de las grasas de la dieta [55].

Se ha descrito que la YM presenta acción hipolipemiante observándose una disminución en los niveles de triglicéridos y colesterol en ratas hipercolesterolémicas y una mejoría del

perfil lipídico en pacientes dislipidémicos [56,57]. En este mismo sentido se ha demostrado efecto anti-obesidad en ratones alimentados con dietas hiperlipídicas, reportándose el mismo efecto en seres humanos [58]. También tendría función en el metabolismo de la glucosa y en la sensibilidad a la insulina y, por lo tanto, efectos beneficiosos en patologías como la diabetes mellitus, el síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares [59].

Se evidenciaron propiedades antiinflamatorias e hipocolesterolemicas por parte de las saponinas. Su acción puede ser atribuida a que las matesaponinas inhiben la difusión pasiva del ácido cólico y la formación de micelas que de esta manera no pueden ser absorbidas y son excretadas [60].

Las metilxantinas inhibieron el incremento en el porcentaje de grasa corporal de ratas durante el desarrollo, inhibieron la acumulación de grasa y promovieron la lipólisis *in vitro*. En relación con esto el consumo de cafeína presentó una correlación negativa con el aumento de peso. Además, se asociaron beneficios a nivel cardiovascular al reducir el riesgo de enfermedades coronarias y accidentes cardiovasculares [59].

Entre los componentes de la YM la cafeína tiene la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica y aumentar las concentraciones circulantes de epinefrinas, incrementando la termogénesis y la lipólisis.

En estudios en ratas alimentadas con porcentajes altos de grasa, la YM demostró promover la saciedad por medio de diferentes mecanismos incluyendo la inducción o aumento del péptido 1 similar al glucagón intestinal (GLP-1), la modulación de los niveles de leptina en plasma, y un posible efecto estimulante sobre la saciedad central. Además, se vio que *I. paraguariensis* suprime el aumento de peso corporal y la acumulación de grasa visceral, y disminuye los niveles séricos de colesterol, triglicéridos, LDL colesterol, glucosa, insulina y la lipasa y leptina pancreática [61].

Se llevó a cabo un estudio en mujeres post menopáusicas en el cual se demostró que luego de consumir 1 L al día de infusiones de YM, el riesgo de dislipidemia, hipertensión y enfermedades coronarias se redujo un 42%, 47,1% y 100% respectivamente [62].

Para resumir los efectos observados a nivel fisiológico la Figura 16 muestra los principales efectos biológicos de la YM presentados en el trabajo de Brascresco et al. [53].

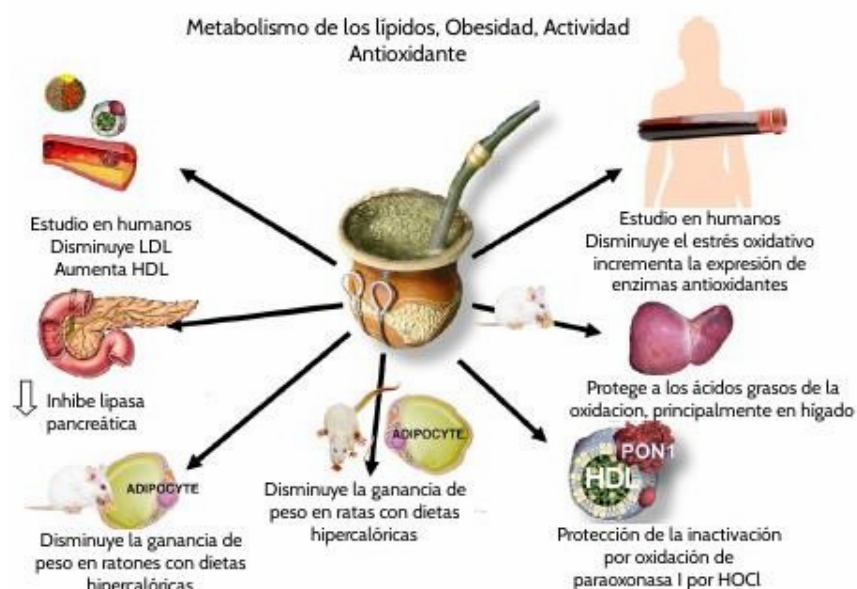


Figura 16 – Efectos biológicos de la YM, adaptado de ref 53

3.7 Efecto antioxidante de la YM y sus componentes

El estado redox fisiológico de los organismos es mantenido por diferentes sistemas antioxidantes que regulan la producción y actividad de especies reactivas como los radicales libres y oxidantes exógenos y endógenos.

El estrés oxidativo se produce cuando no hay un adecuado balance entre los radicales libres y los antioxidantes en el organismo, y esto puede darse en situaciones de envejecimiento, cambios hormonales, diferentes patologías como diabetes o cáncer, por la presencia de toxinas endógenas u exógenas, exposición a radiación o algunas drogas [63].

Los radicales libres poseen una elevada reactividad química causando daño celular debido a la oxidación lipídica, la alteración estructural de las membranas, la oxidación de proteínas y ácidos nucleicos, aumentando el riesgo de ciertas patologías como el cáncer y otras enfermedades. Por otro lado, patologías como la diabetes, enfermedades cardiovasculares y el cáncer también son responsables de aumentar el daño oxidativo [64].

Los radicales libres son moléculas inestables producidas durante reacciones químicas del metabolismo celular. Durante ciertas condiciones estos pueden acumularse

generando daño.

Los radicales libres se pueden clasificar como: especies reactivas del oxígeno (ROS) entre ellas, peróxido, superóxido, peróxido de hidrogeno y oxidrilo, también se clasifican como metales de transición entre ellos el hierro, cobalto o cobre, y finalmente otras especies como el nitrógeno o el cloro.

Los mecanismos de defensa celulares ante estos radicales libres son varios, y entre ellos el organismo puede utilizar macromoléculas que forman complejos con las especies reactivas y evitan su acción como la transferrina y la hemoglobina, también dispone de enzimas antioxidantes que reducen los niveles de especies reactivas, entre ellos superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa. El uso de cosustratos antioxidantes son empleados por las enzimas para reducir los radicales, por ejemplo, el glutatión y el NADPH, y además existen enzimas que regeneran a los cosustratos antioxidantes.

Otro tipo de mecanismos antioxidantes son moléculas presentes en el organismo que se usan como blanco para las especies reactivas, evitando la oxidación de otras macromoléculas, ejemplos de ellas son la albumina, el ácido úrico, la bilirrubina y la melatonina. Finalmente, también existen antioxidantes exógenos, como aquellos provenientes de la dieta como por ejemplo la vitamina E o C, el betacaroteno, los polifenoles, flavonoides y taninos [63].

Los polifenoles presentes en la YM son antioxidantes exógenos y poseen actividad antioxidante ya que poseen la habilidad de quelar metales y retener a los radicales libres, principalmente hidroxilos y peróxidos, como así también aniones superóxidos y peroxinitritos. El ácido clorogénico, posee la capacidad de donar un hidrogeno del anillo fenólico a los radicales libres, inhibiendo el proceso oxidativo [65]. Además de esto, el ácido clorogénico, la rutina, e incluso la cafeína exhiben una alta capacidad antioxidante, reduciendo el impacto negativo a nivel fisiológico del estrés oxidativo, y cuando se administran como suplementos funcionales en la dieta, pueden la producción de radicales libres [66]. En este mismo sentido, se ha encontrado un incremento lineal de los antioxidantes en plasma luego del consumo de infusiones herbales, lo que refuerza la evidencia respecto al consumo de infusiones y su efecto positivo ante el estrés oxidativo en humanos [67].

El estudio de la capacidad del mate para inactivar las especies reactivas del oxígeno (ROS) ha sido comparada con la actividad de las enzimas peroxidasa, principalmente por la concentración de polifenoles presentes, que actúan de manera similar a las 293 enzimas antioxidantes naturales del organismo, contribuyendo de manera significativa en el balance redox del organismo [36].

Los compuestos hallados en plantas con efectos protectores ante los radicales libres fueron clasificados de acuerdo con su capacidad antioxidante en el siguiente orden: polifenoles > flavonoides > ácido ascórbico > tocoferoles > purinas [54].

De todas las especies del género *Ilex*, *I. paraguariensis* es la que mayor actividad antioxidante posee, esto se explica por qué es la que presenta mayor concentración de ácido clorogénico, que como mencionamos anteriormente, es capaz de desactivar considerablemente las ROS, en base a esto se ha sugerido que la oxidación de lipoproteínas de baja densidad inducida por los radicales libres juegan un papel en la aterosclerosis, y se vio que las infusiones de mate inhiben esa oxidación [36].

Finalmente y en relación a la capacidad antioxidante de YM, se estudió el efecto del consumo de infusiones de YM y se halló que la actividad de todas las enzimas con acción antioxidante aumentó significativamente, entre ellas glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa con un 10%, 30% y 21% de incremento respectivamente, también se halló un aumento en la capacidad antioxidante en plasma y el consumo por el periodo de una semana disminuyó los niveles en plasma de sustancias reactivas a ácido tiobarbitúrico (TBARS) un ensayo indicativo de peroxidación lipídica [68,69].

3.8 Estrés oxidativo en el hueso

A nivel celular las ROS desencadenan diferentes respuestas, activando distintas vías de señalización como las vías MAPKs, la vía de quinasas activadas por señales extracelulares (ERK 1/2), la vía quinasa de C-Jun-N terminal (JNK) y p38 MAPK, todas estas vías se hallan involucradas en mecanismos que resultan en la apoptosis de osteoblastos u osteocitos, perjudicando la producción y mantenimiento del tejido óseo (Figura 17) [64].

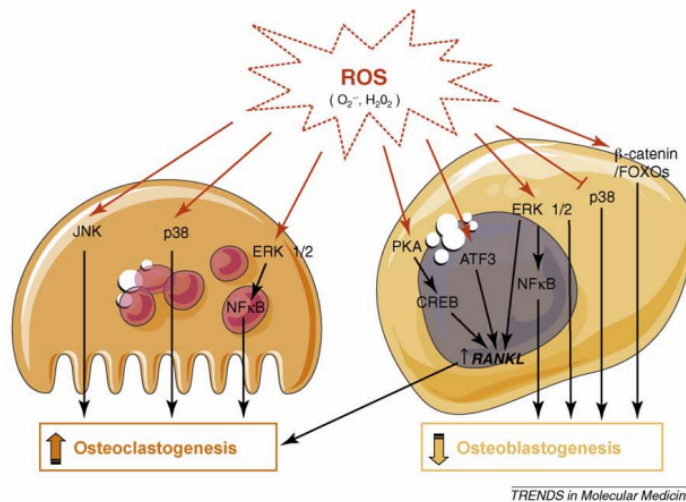


Figura 17 – Efecto de ROS en osteoblastos y osteoclastos.

Además, como hemos mencionado previamente, estas células producen diferentes moléculas de regulación de la actividad osteoclástica y osteoblástica, entre ellos RANKL y OPG. La expresión de estos factores es sensible al estado oxidativo, ante la presencia de ROS, se induce la transcripción de RANKL y disminuye la de la OPG, favoreciendo así la diferenciación de pre-osteoclastos. Este estado oxidativo previene la activación de los osteoblastos y por lo tanto la producción de OPG. El aumento de la relación RANKL/OPG produce como resultado un recambio óseo acelerado favoreciendo la actividad osteoclástica [70,71].

En resumen, los cambios en los sistemas antioxidantes y la presencia de ROS en el organismo se relacionan con un desbalance negativo, desencadenando la apoptosis de osteoblastos y osteocitos, y causando una situación favorable para la producción de osteoclastos, lo que estimula el recambio y la pérdida ósea. De esta manera, los antioxidantes por acción directa o contrarrestando el efecto de los ROS contribuyen a la diferenciación de osteoblastos, al proceso de mineralización y a la reducción de la actividad de los osteoclastos [64]. De hecho, un incremento en el número de osteoclastos, así como mayores niveles de TRAP un marcador de la actividad de osteoclastos, fueron hallados cuando se expusieron células mononucleares de medula ósea en cultivo a agentes oxidantes como el peróxido de hidrogeno [72].

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado la capacidad de los antioxidantes para contrarrestar directa o indirectamente el efecto de los oxidantes promoviendo la activación de la diferenciación celular, el proceso de mineralización y disminuyendo la

actividad osteoclástica [73,74]. Otros estudios relacionados al estrés oxidativo mostraron a nivel celular un incremento en el número de osteoclastos y de la resorción ósea, e inhibición de la diferenciación osteoblástica [75]. Además, algunos antioxidantes han demostrado la capacidad de restaurar la mineralización de osteoblastos expuestos a peróxido de hidrogeno en cultivo [76].

En resumen, el estrés oxidativo altera el proceso de remodelado óseo causando un desbalance entre la actividad de los osteoclastos y osteoblastos, pudiendo generar un desbalance en el metabolismo óseo y contribuyendo al desarrollo de patologías y desordenes del sistema esquelético [64].

La pérdida ósea por envejecimiento se encuentra relacionada al aumento del estrés oxidativo durante el envejecimiento, se halló un efecto negativo con pérdida ósea debida a la edad avanzada y al estrés oxidativo por presencia de una mayor concentración de malondialdehído en fémures y plasma de ratas de edad avanzada al comparar con grupos más jóvenes. [77]. También se halló que la DMO del fémur fue significativamente inferior en los grupos de ratas adultas en comparación con el grupo de ratas jóvenes y esto se correlacionó con los resultados obtenidos de la actividad de superóxido dismutasa, lo que sugiere que el estrés oxidativo induciría la pérdida ósea por edad [78]. También se hallaron niveles de marcadores antioxidantes en plasma disminuidos en ratas de edad avanzada [56].

En experimentos *in vivo* en modelos animales donde se utilizaron suplementos dietarios con té verde o arándanos con una alta presencia de polifenoles mostraron una atenuación en la perdida de trabéculas óseas, previnieron la perdida de colágeno en la matriz celular e inhibieron las vías de señalización de apoptosis de células osteoblásticas, evitando el desarrollo de osteoporosis en ratas ovariectomizadas [79 ,80]. En otro estudio se halló información similar sobre el efecto de los polifenoles del té verde en la prevención de la pérdida ósea en un modelo experimental de ratas con inflamación crónica [81].

Se ha sugerido que el estrés oxidativo en humanos podría estar involucrado en deferentes patologías óseas incluyendo osteoporosis, tumores del sistema esquelético, complicaciones óseas inducidas por diabetes y enfermedades inflamatorias de las articulaciones [82]. También hay evidencia de una disminución en

los niveles de marcadores antioxidantes en plasma en mujeres con osteoporosis [83]. El estrés oxidativo se presenta durante la osteoporosis por una deficiencia en los niveles de estrógenos durante la menopausia, y ha sido relacionada con la activación de la enzima NADPH oxidasa y/o una menor síntesis de enzimas antioxidantes y glutatión reducido [64]. La administración de antioxidantes en presencia de patologías como la osteoporosis ha demostrado tener efectos beneficiosos en individuos que la padecen [84], mientras que el consumo de té también está asociado con efectos beneficiosos en el mantenimiento de la densidad mineral ósea en mujeres de edad avanzada y menopaúsicas [85].

3.9 Efecto de la yerba mate sobre tejido óseo

Efectos de los componentes de la YM sobre el tejido óseo

Cafeína

Este compuesto ha sido asociado con efectos no deseables para la salud ósea. Sin embargo, como veremos, existe información dispar al respecto: algunos estudios hallaron efectos negativos, mientras que otros mostraron resultados neutros. En general, la dosis utilizada tiene mucho que ver.

Aunque la concentración de cafeína hallada en el mate (330-480 mg/L) es menor que la del café (promedio de 600 mg/L), en Argentina el 50% del consumo de cafeína en los adultos es a través del mate, y un 36% por el café. El consumo total de cafeína depende no sólo de su concentración, sino también del volumen ingerido en cada caso. El consumo promedio de cafeína en adultos en Argentina es de 288 mg/día, y resulta ser mayor al consumo de países como Estados Unidos, Reino Unido, o Brasil [46].

La evidencia de estudios llevados a cabo con este componente demostró que luego de tratar células estromales obtenidas de la medula ósea de ratas con concentraciones crecientes de cafeína de 0,1 a 1 mM, la viabilidad disminuyó de manera dependiente con la dosis. Esta muerte celular se dio principalmente por mecanismos de necrosis y apoptosis, encontrando que las proteínas y genes relacionados a la ontogénesis fueron negativamente regulados, inhibiendo así su expresión [86]. La administración de cafeína también aumentó la osteoclastogénesis y en modelos *in vivo* aumentó la resorción ósea [87].

Sin embargo, estudios previos realizados en nuestro laboratorio hallaron que concentraciones de 0,008 mM y 0,017 mM de cafeína aumentaron la viabilidad en un modelo celular de osteocitos (MLO-Y4) un 14,9% y 13,7% respectivamente, esas mismas concentraciones también causaron un aumento en un modelo celular de pre-osteoblastos en cultivo (MC3T3-E1), un 16,6% y 34,8% respectivamente comparado al control [88]

Además de modelos celulares, también se realizaron experimentos *in vivo*, uno de

ellos examinó los efectos de la administración durante 56 días de dosis de 10 mg cada 100 g de peso corporal al día, en la reparación y la densidad ósea en ratas Wistar, como resultado se halló una menor área de formación ósea respecto al control en zonas de reparación, pero no se halló una alteración en la densidad ósea [89].

En humanos, aunque la mayoría de los estudios sugieren que consumir hasta 400 mg de cafeína al día no es perjudicial para la salud ósea en adultos sanos, hay variabilidad en los hallazgos y varios factores contribuyen a esta incertidumbre, por lo que se necesita más investigación para obtener conclusiones definitivas [90].

La cafeína en altas concentraciones tendría un impacto negativo sobre la (DMO) sobre todo cuando su consumo está asociado a dietas con bajo contenido de calcio [91,92,93]. A través de un metaanálisis que incluyó 10 estudios prospectivos (n=200000) se vio que el consumo de café está asociado a un mayor riesgo de fracturas dependiendo de la dosis, particularmente en mujeres [94], este mismo resultado se obtuvo en un estudio con 31527 mujeres suecas que consumían más de 330 mg al día de cafeína, principalmente como se mencionó antes, en dietas deficientes de calcio [95]. Sin embargo, el mismo grupo de investigación en un trabajo posterior en el que se realizó un seguimiento de 61433 mujeres suecas desde 1987 hasta el año 2008 halló que un consumo moderado de cafeína estaría asociado a una ligera reducción en la densidad ósea, pero esto no aumentaría el riesgo de fracturas, osteoporosis ni de caídas [96].

Al evaluar dosis más altas, el consumo de 520 mg de cafeína por día se ha relacionado con una menor DMO cortical y trabecular en hombres mayores de 69 años, de manera similar el consumo de 260 mg por día, también se asoció a una menor DMO cortical, pero en este caso, en radio. Finalmente, en otros estudios con dosis menores de 108 a 300 mg por día no encontraron efectos sobre la DMO [90,97].

En un estudio donde se evaluaron dosis mayores a 300 mg diarios, se halló una asociación a una mayor pérdida ósea en la columna vertebral, pero esto no sucedió en otros sitios evaluados. Además, no se observaron diferencias significativas en la densidad ósea, las hormonas calciotrópicas o los marcadores óseos entre los diferentes niveles de consumo de cafeína [98].

Finalmente, también se sabe que el consumo de cafeína incrementa la excreción de calcio y disminuye su absorción intestinal con 5 mg netos de calcio perdidos por cada

taza consumida de café [99].

En resumen, aunque algunos estudios hallaron efectos negativos incluso en las dosis más bajas, la evidencia general apoya que un consumo de hasta 400 mg de cafeína al día en adultos sanos y 300 mg al día en mujeres embarazadas sanas no se asocia con efectos adversos significativos en la mayoría de los casos. Para niños y adolescentes, una ingesta de 2,5 mg/kg de peso corporal de cafeína por día sigue siendo una recomendación aceptable basada en la limitada evidencia disponible [90].

Polifenoles

Los polifenoles presentes en la YM han demostrado efectos beneficiosos a nivel del tejido óseo. Los polifenoles preservan la salud ósea a través de 5 posibles mecanismos: disminuyendo la pérdida ósea a través de la actividad antioxidante, la actividad antiinflamatoria, promoviendo la osteoblastogénesis, reduciendo la osteoclastogénesis, y por último, mediante su actividad osteoinmunológica [100]. Uno de los polifenoles más abundantes en el mate es el ácido clorogénico, al cual se le atribuye un efecto inhibidor dosis-dependiente sobre la diferenciación osteoclástica [101]. Además, promueve la diferenciación osteogénica de células mesenquimales de la pulpa dental en humanos, incrementa la expresión de genes relacionados a la osteogénesis e inhibe la expresión de genes que dan lugar a la osteoclastogénesis [102].

En estudios previos publicados por nuestro grupo de investigación, se halló un efecto positivo de los principales componentes de la YM (rutina, ácido clorogénico y cafeína) sobre viabilidad de células pre-osteoblásticas en cultivo para todas las concentraciones ensayadas de los componentes individuales. Asimismo, se observó un efecto positivo para una de las combinaciones preparadas (ácido clorogénico 10 µg/ml - cafeína 0,66 µg/ml) la cual presenta una relación de polifenoles/xantinas similares a la hallada en infusiones acuosas de YM [88].

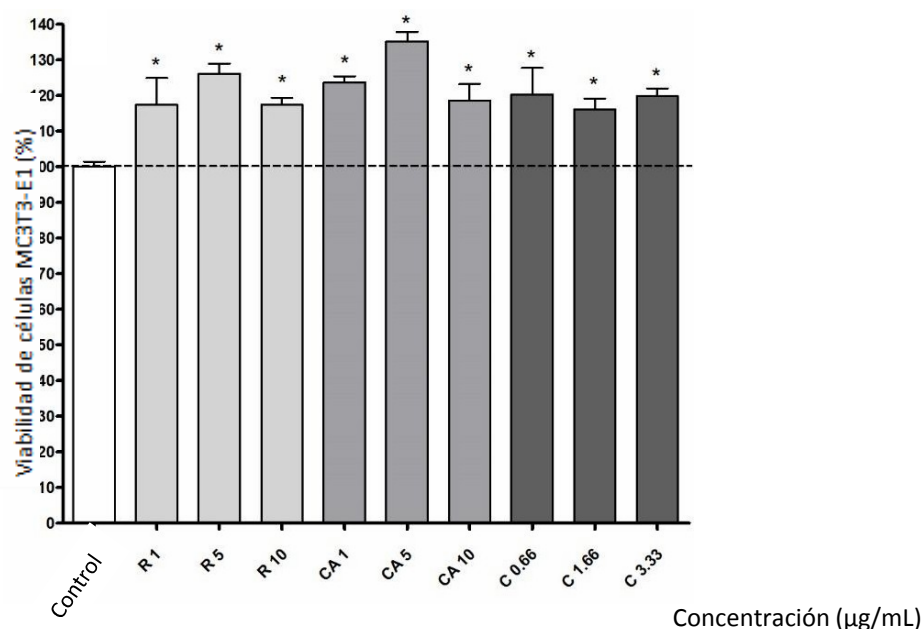


Figura 18 - Efecto de los componentes de la YM sobre la viabilidad de células pre-osteoblásticas en cultivo(MC3T3-E1). R: rutina, CA: ácido clorogénico, C: cafeína. Concentraciones en μg/ml. * Indica diferencia significativa respecto al control.

Algunos flavonoides demostraron un impacto positivo en el metabolismo óseo, por ejemplo, las isoflavonas de la soja suprimieron la reducción ósea en roedores y mujeres postmenopáusicas, y la icariina por su parte, ha demostrado tener propiedades osteogénicas *in vivo* e *in vitro* [103].

Los flavonoides evitan la pérdida ósea por su actividad en la regulación de las vías de señalización que promueven la diferenciación de los osteoblastos, reduciendo los efectos perjudiciales que se presentan en situaciones de estrés oxidativo y de inflamación crónica [104].

Se determinó el consumo de polifenoles de la dieta en un estudio en el que participaron 3226 mujeres de Escocia y se halló un consumo de aproximadamente 300 mg por día, consumidos principalmente en bebidas como el té, mientras que, en Estados Unidos, la ingesta total de flavonoides se estimó en 190 mg/día usando los registros dietéticos de NHANES 1999-2002 [105,106].

Se hallaron asociaciones positivas entre la ingesta total de flavonoides en la dieta y la DMO en columna y cuello femoral en un grupo de mujeres escocesas perimenopáusicas. Además, en el mismo estudio el consumo de catequinas y

flavononas se asoció negativamente con marcadores de resorción ósea. En un segundo estudio llamado TwinsUK, también se demostró que la ingesta total de flavonoides se asociaba positivamente con la DMO de la columna en mujeres del estudio (18 a 79 años) [105,107].

3.10 YM y sus efectos sobre el tejido óseo

En estudios previos realizados por nuestro grupo, se evaluó el efecto de los extractos acuosos de YM y se obtuvo un aumento significativo en la viabilidad celular en modelos celulares de osteocitos (MLO-Y4), pre-osteoblastos (MC3T3-E1) y osteoblastos (MC3T3-E1 diferenciadas) en comparación con los controles después de 48 horas de tratamiento con los extractos, con aumentos del 23,6% en las células MLO-Y4, 15,4% en las células MC3T3-E1 y un 105,8% en las células MC3T3-E1 diferenciadas [88].

Además, se estudió el efecto del consumo de infusiones de YM por 90 días en ratas Sprague Dawley de 30 días de edad, con dietas con las siguientes concentraciones de calcio: Control + Ca 0,2 g %; Control + Ca 0,9 g %; Yerba + Ca 0,2 g %; Yerba + Ca 0,9 g %. Luego de este lapso se evaluó el efecto de la YM sobre el tejido óseo en ratas a través de estudios de densitometría, morfometría, histomorfometría, conectividad trabecular y biomecánica ósea [108]. Se observó un efecto positivo sobre la DMO y el volumen de hueso trabecular en el grupo de animales que fue alimentado con YM y una dieta de bajo contenido en calcio. Esto podría indicar que el efecto negativo de la baja ingesta de calcio en el volumen óseo se revierte, al menos en parte, por la YM. Sin embargo, el consumo de YM no logró revertir el efecto negativo sobre las propiedades biomecánicas y conectividad trabecular [108].

Respecto a los efectos de estas infusiones en humanos, se halló una mayor DMO de columna lumbar y cuello femoral en mujeres postmenopáusicas que tomaban al menos 1 litro de mate/día en comparación con controles que no bebían mate [109]. También se observó que la frecuencia de fracturas en mujeres que consumen mate respecto a mujeres que no lo hacían, no presentaban diferencias significativas, así como tampoco se evidenció una diferencia en los niveles séricos de calcio total,

fósforo, PTH, 25(OH)vitamina D, y C telopéptidos [110].

3.11 YM y efectos en hueso durante la gestación

El consumo de cafeína ha sido señalado como una de las posibles causas que afectan negativamente al proceso reproductivo en humanos, desde acortar periodos menstruales reduciendo las posibilidades de concepción, retrasos en la implantación, abortos espontáneos, nacimientos prematuros, bajo peso al nacer y malformaciones congénitas [111]. Pero, así como muchos otros aspectos estudiados de la cafeína, la información puede llegar a ser ambigua o no extrapolable a la población humana por los modelos experimentales utilizados o las dosis bajo estudio. Por ejemplo, en una revisión donde se analizaron 17 estudios epidemiológicos que abordaron el riesgo de retraso del crecimiento fetal debido a la exposición a la cafeína durante el embarazo los resultados no fueron consistentes. Cuatro de los estudios informaron retraso del crecimiento con ingestiones superiores a 300 mg/día y ocho de los estudios no informan modificaciones. La disminución del peso al nacer fue muy pequeña y tuvo una importancia clínica mínima [112]. Estas asociaciones de bajo peso al nacer han sido observadas tanto para infusiones como el café o té en poblaciones con un consumo elevado, evidenciando una relación dosis dependiente, en la que no está claro cuáles son los valores mínimos en los que estos efectos no se observan, de hecho, esta correlación entre el consumo de cafeína y el riesgo en la pérdida de embarazos no está presente para dosis bajas [113,114].

La cafeína posee la capacidad de atravesar la placenta, y la baja velocidad metabólica para procesar la cafeína por parte del embrión puede resultar en niveles altos de cafeína circulante presentando niveles en sangre de sus metabolitos similares a los de la madre, por lo que se recomienda un consumo moderado de esta sustancia [115]. La cafeína puede inducir la vasoconstricción uteroplacentaria e hipoxia debido a un aumento en los niveles de catecolaminas en sangre [116]. Durante la etapa embrionaria, los bebés recién nacidos y prematuros metabolizan la cafeína de manera muy lenta, y El consumo de más de 450 mL de café al día puede además disminuir los niveles de hierro en la leche materna y resultar en anemia en los infantes [118].

En humanos, algunos estudios demostraron que solo ante elevados valores en plasma (752 ng/L) de paraxantinas se incrementa el riesgo de abortos espontáneos, pero que un consumo moderado no produce el mismo efecto [117]. Dosis de más de 130 mg diarias durante la gestación podría disminuir la ganancia de peso de los infantes alimentados exclusivamente de leche materna, pero esto debe ser estudiado en mayor detalle [118].

Se realizó una revisión sistemática con estudios publicados entre 2001 a 2015 y la evidencia que se encontró, sostiene que el consumo de 300 mg de cafeína/día en mujeres embarazadas saludables no está asociado con un efecto adverso en la reproducción o el desarrollo del feto. [90].

Estudios *in vivo* evaluaron el efecto del consumo de cafeína sobre la composición del tejido óseo suplementando a ratas preñadas con 1 mg de cafeína cada 100 g de peso corporal, hallando un mayor peso en las mandíbulas de los fetos para el día 22 de gestación del grupo suplementado. Los niveles de calcio, magnesio y zinc en los huesos fueron menores en los grupos suplementados con 1 y 2 mg de cafeína por cada 100 g de peso corporal, mientras que no se hallaron diferencias en el contenido de fósforo. Indicando que el consumo de cafeína durante el embarazo afectaría no solo el contenido mineral en los huesos de las crías, sino también el desarrollo y crecimiento de estos [119]. Además, al administrar dosis de 2 mg de cafeína cada 100 g de peso corporal en ratas en periodo gestacional, los maxilares de las crías a los 49 días de vida presentaron menores concentraciones de zinc e hidroxiprolina respecto al control, sin embargo, no hubo diferencias para el Ca, P y Mg, indicando una diferencia en la composición de la mandíbula ante la exposición de las crías a la cafeína [120].

Resultados en otro estudio mostraron una ganancia de peso similar entre las crías de ratas que fueron alimentadas con una dieta que contenía 1 mg de cafeína cada 100 g de peso corporal desde la gestación hasta el día 56 de vida respecto al control, pero se hallaron medidas morfométricas disminuidas, con la distancia desde el aspecto posterior del foramen del mentón hasta el punto más caudal en la cabeza del cóndilo de la mandíbula significativamente más corta en el grupo de cafeína en comparación con el grupo control, mientras que el resto de medidas morfométricas de la mandíbula no presentaron diferencias. Además, los fémures del grupo suplementado presentaron

un acortamiento en el largo del hueso [121].

Al evaluar la diferenciación osteogénica de células mesenquimales de crías de ratas tratadas con cafeína durante la preñez y la lactancia, con dosis de 2,5, 5 y 10 mg de cafeína cada 100 g de peso corporal, se halló que la actividad de fosfatasa alcalina estaba disminuida para los días 7, 14 y 21 respecto al control, así como también lo estaba la expresión de colágeno tipo I. Además, la expresión de los genes de fosfatasa alcalina, Runx-2 y sialoproteína ósea, así como la síntesis de nódulos mineralizados, disminuyó significativamente en los grupos tratados con cafeína [122]. Se concluyó entonces que la cafeína reduce la diferenciación osteogénica de las células mesenquimales de las crías expuestas a la cafeína durante la preñez y la lactancia.

Respecto a los efectos específicos en el tejido dentario de la exposición prenatal a cafeína, en un estudio en el que se implanto a ratas con tabletas subcutáneas con 100 mg de cafeína antes y durante la preñez, halló que para el día 22 posterior al nacimiento de las crías, el primer molar del grupo suplementado presentó una mayor solubilidad ácida de calcio y fósforo respecto al control. Al parecer la exposición prenatal a la cafeína afecta la formación normal del esmalte dental del primer molar durante la etapa fetal [123].

Finalmente, si bien hay pocos antecedentes en la bibliografía respecto al efecto del consumo de estas infusiones durante la gestación y el periodo postnatal en el tejido óseo, un estudio realizado en Brasil en 5300 mujeres no encontró una asociación entre el crecimiento intrauterino del feto o la duración del embarazo y el consumo de infusiones de YM [124]. Además, en otro experimento, se utilizaron infusiones de *Red rooibos*, que al igual que la YM presentan un contenido alto de antioxidantes, pero que no contienen cafeína, en el mismo se halló que las crías que fueron expuestas al consumo de infusiones de *Red rooibos* vía materna durante la gestación y post-lactancia, no presentaron cambios en las medidas de DMO, en la estructura o la resistencia de los huesos en ninguna de las edades evaluadas, indicando que la presencia de una elevada concentración de polifenoles en la dieta durante el periodo mencionado, no tendría efectos sobre el desarrollo y crecimiento de los huesos. [125].

5 HIPÓTESIS

Basándonos en los efectos previamente mencionados de la YM y sus componentes sobre el tejido óseo, hipotetizamos que la exposición a las infusiones de YM durante el desarrollo y crecimiento en ratas, causará modificaciones a nivel histológico, morfológico, biomecánico y en la DMO de los huesos y el tejido dentario, debido a los antioxidantes y cafeína presente en la yerba mate.

6 OBJETIVOS

Objetivo general: Establecer si el consumo de infusiones de YM por ratas gestantes afecta el desarrollo óseo, dentario y mandibular de su progenie.

7 Objetivos específicos

Objetivo 1: Evaluar variaciones en la estructura, histomorfometría, biomecánica y composición de huesos largos, vértebras, y mandíbulas en las crías de ratas gestantes consumidoras de infusiones de YM.

Objetivo 2: Identificar modificaciones en la composición, crecimiento y estructura del tejido dentario en las crías de ratas gestantes consumidoras de infusiones de YM.

Objetivo 3: Establecer si el consumo de infusiones de YM en ratas gestantes afecta parámetros plasmáticos relacionados al tejido óseo y parámetros de estrés oxidativo en las crías.

ACTIVIDADES Y METODOLOGÍA

Diseño experimental

Se utilizaron ratas hembra de la línea Sprague-Dawley de 10 semanas de edad obtenidas del CIPReB (Centro de Investigación y Producción de Reactivos Biológicos) de la Facultad de Ciencias Médicas (UNR) y alojadas en el bioterio del Laboratorio de Biología Ósea, donde fueron mantenidas en ambiente ventilado y temperatura controlada a 23 ± 1 °C con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas.

Luego de una semana de adaptación, los animales se dividieron aleatoriamente en 3 grupos de 4 ratas hembra cada uno. Se colocaron en plantel en proporción 2 hembras/1 macho por una semana. Se pesaron cada 5 días y luego de confirmar la preñez fueron separadas en cajas individuales. Posterior al nacimiento de las crías se normalizaron los grupos con una distribución de 8 animales por madre.

Para poner a prueba nuestra hipótesis se diseñaron 3 grupos experimentales:

- 1, Grupo Control
- 2, Grupo Yerba Mate (YM)
- 3, Grupo Yerba Mate Concentrada (YM+)

El grupo YM recibió una infusión *ad libitum* preparada con 50 g de YM por litro de agua a 70 °C que fue previamente filtrada y enfriada. Mientras que el grupo YM+ recibió una infusión *ad libitum* preparada con 100 g de YM por litro de agua a 90 °C también, previamente filtrada y enfriada, estos tratamientos se muestran detallados en la Figura 19. Este segundo grupo se usó para evaluar una infusión de YM que al prepararse con mayor temperatura presenta mayor capacidad antioxidante, contenido de polifenoles y cafeína, como demostró anteriormente nuestro grupo [88]. Los tratamientos fueron administrados a partir de la semana previa de ser colocadas en plantel, durante la preñez (21 días) y durante el amamantamiento hasta el momento en que se realizó la eutanasia de las crías día 39 de vida de las crías).

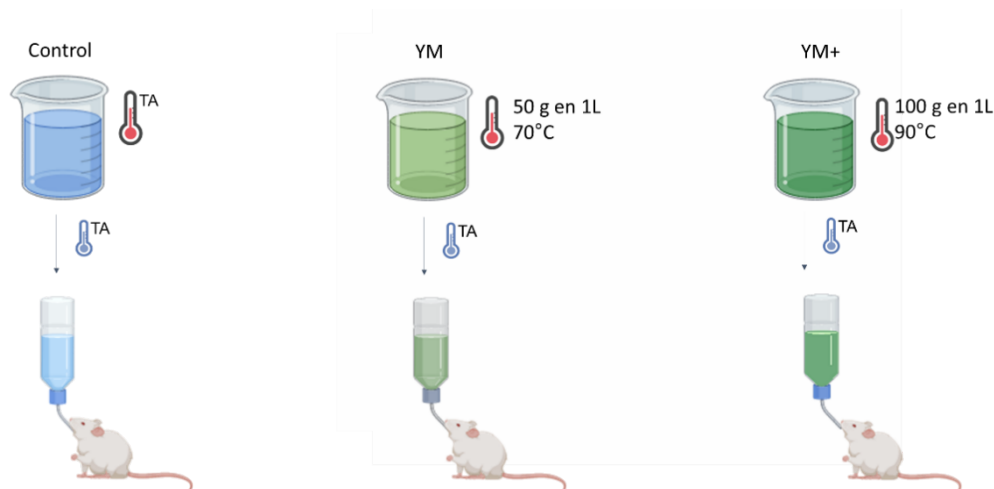


Figura 19 – Tratamiento para cada uno de los grupos.
TA: Temperatura ambiente.

Para ambos grupos YM y YM+ se utilizó YM comercial de la marca Playadito (lote: 2330705).

Para obtener el balance del consumo de líquidos, alimentos y del peso de las crías, se realizó un seguimiento de los mililitros y gramos de bebidas y alimento consumidos en promedio por jaula con relación al número de crías y al peso de estas, por lo que también se realizó un seguimiento en el peso de las crías (g) a partir del día 17 de vida. Con relación al contenido de cafeína hemos analizado previamente 12 marcas comerciales que abarcan más del 80% del mercado interno y no hallamos diferencia entre las mismas, reportándose una concentración de 0,32 g/L (IC95% 0,3-0,41) para la infusión de YM preparada con 50 g de hojas secas de YM en 1 litro de agua. Este valor coincide con las concentraciones reportadas previamente en la bibliografía (0,31-0,34 g/L) [88, 46] y con los valores de consumo diarios de cafeína promedio por la población argentina 0,288 g/L [46].

Considerando el volumen de infusión consumida por el grupo YM (0,1760 ml/g de peso corporal) se estimó la dosis de cafeína administrada en 56,32 mg/kg de peso corporal. En humanos este valor para una persona de 60 kg con un consumo de 300 mg diarios de cafeína resulta en una dosis de 5 mg por kilo de peso corporal por día. Es importante destacar que, aunque la cantidad de cafeína consumida en ratas es mayor que la hallada en humanos ambas dosis son equivalentes. Esto se justifica debido a las diferencias entre las especies, y a su distinta velocidad metabólica con una tasa 8 W/kg

en ratas y 1,25 W/kg en humanos, es decir, la tasa metabólica en ratas es 6,4 veces más alta que en humanos. En base a estas diferencias se obtiene la Dosis Equivalente en Humanos (DEH) utilizando la Ecuación 1 [126]:

Ecuación 1 – Dosis equivalente en humanos

Por lo tanto, la DEH ajustada por la superficie corporal y calculada según la fórmula proporcionada, es aproximadamente de 7,43 mg de cafeína por kg de peso corporal en ratas para el grupo YM, y resulta en un valor similar a los 5 mg de cafeína por kg de peso corporal estimados para un humano de 60 kg. Para el grupo YM+ este valor es aproximadamente 2,5 veces mayor (20,2 mg/kg).

Finalmente, a lo largo del experimento se realizaron inyecciones a las crías primero con Alizarin Red y luego con Tetraciclina, los días de vida 26 y 36 respectivamente. Finalizado el tiempo experimental, se llevó a cabo el procedimiento de eutanasia en cámara de CO₂,

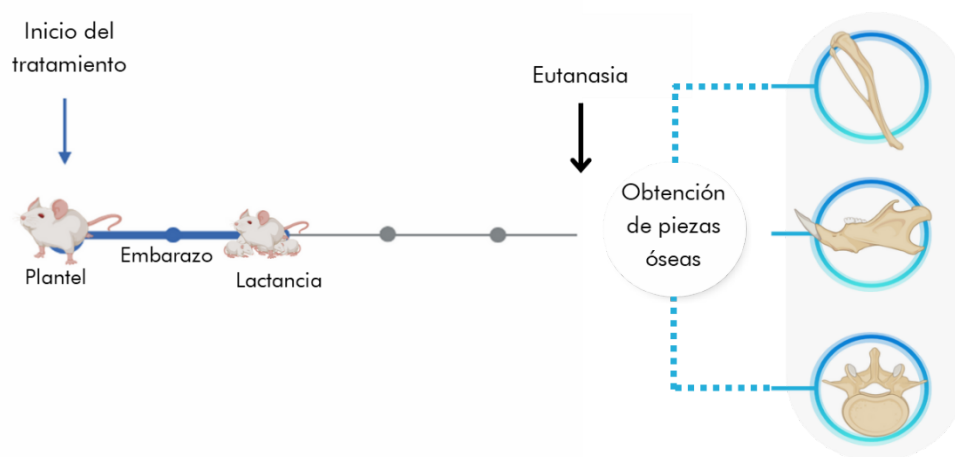


Figura 20 - Esquema de trabajo para el experimento realizado.

En sala de cirugía del laboratorio de Biología Ósea se procedió a la extracción de hemimandíbulas, fémures, tibias, vértebras lumbares y torácicas. Además, se extrajo sangre por punción cardíaca para las diferentes determinaciones realizadas en plasma.

Todos los procedimientos se llevaron a cabo bajo normas éticas universalmente consensuadas [127], y fueron aprobadas por el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) Comité de Bioética, Facultad de Ciencias Médicas, UNR. CUDI/EXPTE. N° 38920-2021,

A continuación, y en función de un mejor orden de la metodología, se detallarán las técnicas empleadas para cada objetivo específico:

Objetivo 1

Evaluar variaciones en la estructura, histomorfometría, biomecánica y composición de huesos largos, vértebras, y mandíbulas en las crías de ratas gestantes consumidoras de infusiones de yerba mate.

Medidas morfométricas macroscópicas

Sobre tibia, fémur, vértebras y una hemimandíbula izquierda se realizaron mediciones morfométricas y se evaluó el crecimiento óseo a nivel macroscópico. Las determinaciones detalladas a continuación se realizaron sobre imágenes digitalizadas de radiografías (Kodak D-speed 30,5x40,5 mm) de las piezas óseas almacenadas en formol-PBS 10% y se obtuvieron con un equipo de rayos X (WorkRay 70 KV, Workman SRL, Argentina).

Tibia

Para obtener las medidas macroscópicas de tibias izquierdas se tomó el diámetro y el largo sobre las radiografías digitalizadas con el software ImageJ 1,40 (NIH, Maryland, USA). La longitud se midió desde el extremo proximal al extremo distal del hueso, y el ancho fue tomado en la región media de la diáfisis, correspondiente con el 50% de la longitud total de la tibia.

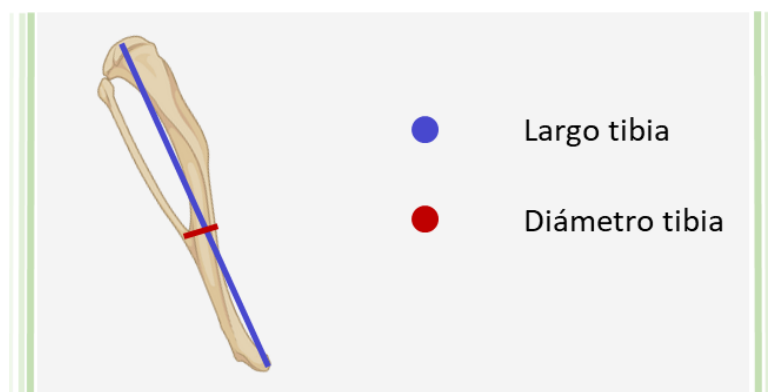


Figura 21 – Esquema de las medidas obtenidas en tibia

Fémur

El fémur izquierdo de cada animal fue extraído y almacenado a -20 °C en una gasa embebida en solución fisiológica. Al momento de tomar las medidas se descongelaron y se removieron todos los tejidos blandos del hueso, luego de realizar el ensayo de biomecánica, se cortó una sección transversal de 2,5 mm de espesor en una zona lo más cercana posible al punto de fractura de las piezas. Utilizando una lupa, se tomaron fotografías con cámara Touptek (XCAM1080PHA).

Empleando el software Image J 1,40 se obtuvieron medidas del perímetro endóstico y perióstico. Para el diámetro y radio, considerando la geometría irregular del fémur, se tomaron 4 medidas individuales que luego se promediaron. Además, se obtuvo el área de la médula, del hueso cortical y del área total.

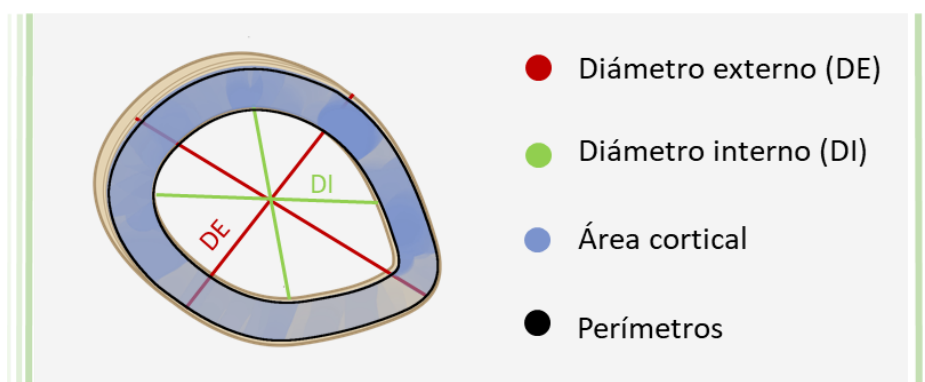


Figura 22 – Esquema de medidas obtenidas en fémur

Vértebra Lumbar

Sobre radiografías de vértebras lumbares (L1) se determinó ancho lateromedial de la vértebra (A.lm), ancho anteroposterior de la vértebra (A.ap), diámetro lateromedial del canal medular (D.lm), diámetro anteroposterior del canal medular (D.ap) y el área del canal medular (A.cm)

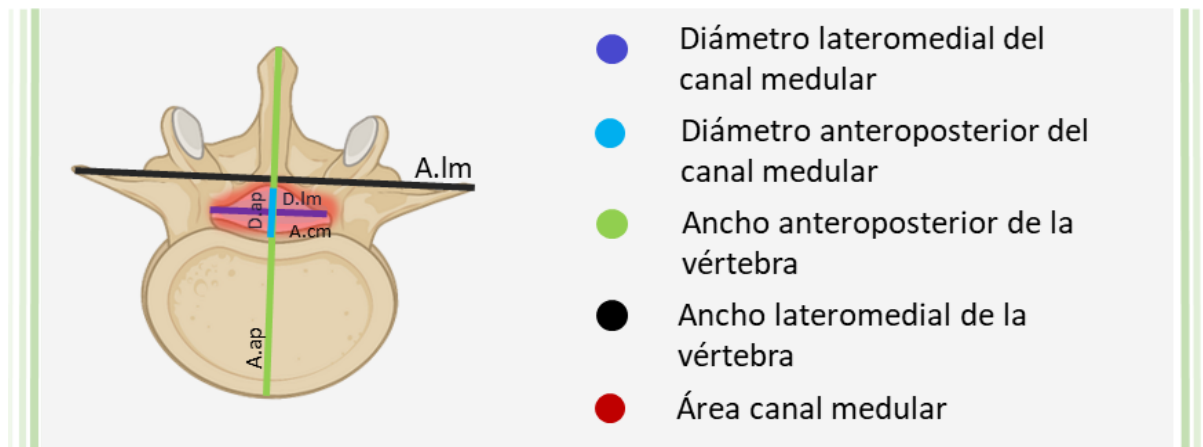


Figura 23 - Referencia de medidas en vértebra

Mandíbula

Las mediciones se realizaron sobre radiografías de hemimandíbulas izquierdas, según lo descrito por Eratalay [128], detallado en la Figura 24. La longitud mandibular se tomó desde el punto más anteroinferior de la mandíbula (O) al punto medio del cóndilo mandibular (C), punto más posterior de la base mandibular (B), y al punto posterosuperior de la apófisis coronoides (A). El área mandibular se midió como el área un triángulo formado entre tres puntos estables: OAB. Finalmente se tomó la longitud de los 3 molares en la hemimandíbula.

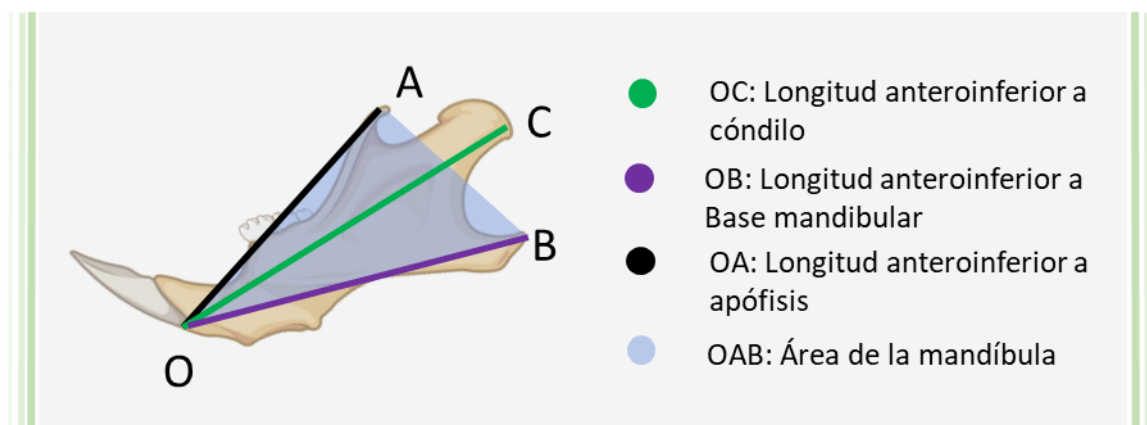


Figura 24 - Referencia de medidas en hemimandíbula

Histomorfometría Dinámica

Para evaluar el crecimiento microscópico como se describió en el diseño experimental, las crías fueron inyectadas inicialmente (dosis 25 mg/kg, volumen inyectado 1% del

peso corporal de las ratas) con una solución de clorhidrato de tetraciclina (Sigma Aldrich, USA) el día 26 de vida. La segunda dosis se realizó al día 36 de vida con el marcador Alizarin Red S (Sigma Aldrich, USA) en una dosis 25 mg/kg, volumen inyectado 1% del peso corporal. Tanto la tetraciclina como el Alizarin Red se utilizaron como marcadores de crecimiento ya que se asocian a los átomos de calcio depositados en las superficies mineralizadas del hueso en formación, generando bandas que pueden detectarse por microscopia de fluorescencia. La distancia entre las bandas se midió para estimar la tasa de aposición mineral en intervalos específicos de tiempo (MAR del inglés *Mineral Apositional Rate*).

Las tibias derechas se fijaron en formol-PBS 10%, luego se deshidrataron y desgrasaron en concentraciones crecientes de etanol (70% a 98%) y un paso final en xileno puro (Biopack, Argentina). Posteriormente se realizó una infiltración con metilmetracrilato puro (MMA) por 48 h, y luego se colocaron las diferentes piezas en tubos de polipropileno con 0,5 g de peróxido de benzoílo (Sigma, USA) cada 100 ml de MMA. El peróxido de benzoílo se utilizó como catalizador de la polimerización. Se realizó vacío y se dejaron polimerizar los bloques a 37-40 °C durante 1 semana o hasta que se completó la polimerización. Luego se realizaron cortes de 100-150 micras con sierra circular diamantada de baja velocidad (IsoMet Buehler Ltd. Illinois, USA), se pegaron estos discos sobre portaobjetos y se redujo el espesor de los cortes con papel de esmeril de 600-2000 granos/pulgada, hasta obtener un espesor de 30-35 micras.

Para la obtención de las imágenes y la determinación de los *scores* histomorfométricos, se utilizó un microscopio de fluorescencia (Mikoba serie F-320, China), cámara Touptek (XCAM1080PHA) y el software Image J 1,40 (NIH, USA). Para poder obtener imágenes con la fluorescencia emitida por la tetraciclina se utilizó un filtro azul (λ Excitación: 450-490nm), y para el Alizarin Red se utilizó un filtro de fluorescencia verde (λ Excitación: 510-560nm). Se obtuvieron 2 fotografías en la misma sección con cada filtro. Para unir las se utilizó un macro de diseño propio para Image J, y se realizó una composición con ambas marcas fluorescentes, sobre las cuales se aplicó un segundo macro llamado "*interedge distance*" que se utilizó para obtener la distancia entre las 2 bandas, el cual traza 20 medidas diferentes al azar en un área determinada, para luego promediarlas y así se obtuvo un valor final que fue el utilizado para hallar el MAR en cada muestra (Figura 25).

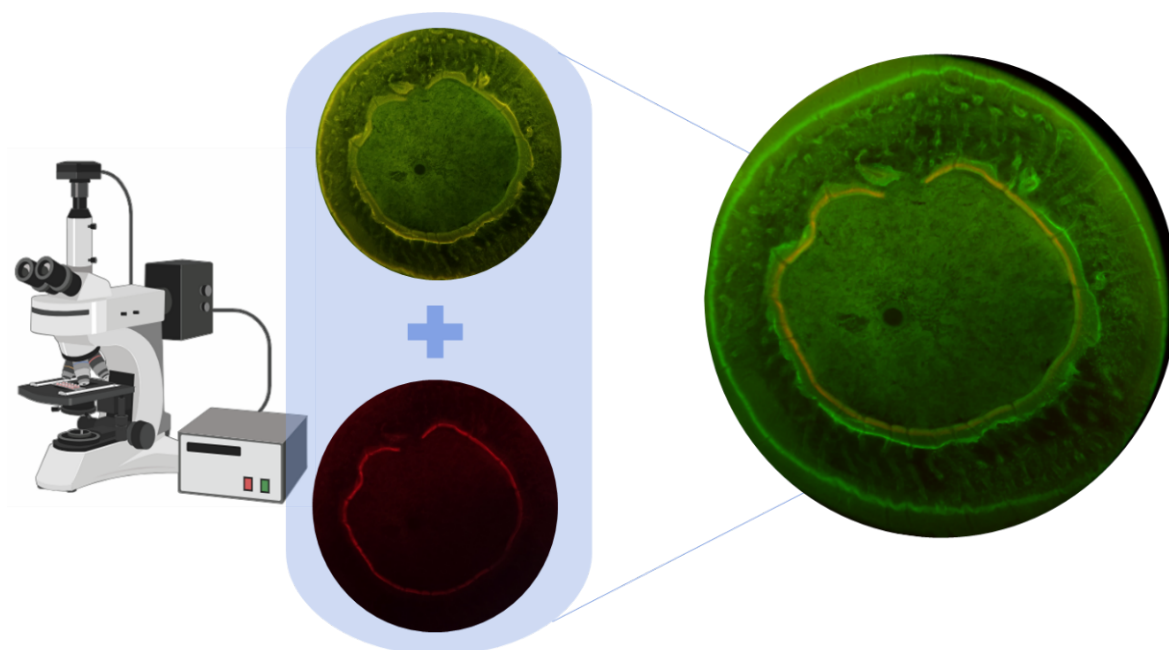


Figura 25 – Obtención de imágenes de histomorfometría dinámica

Histomorfometría estática

Las vértebras L4 y las tibias se fijaron con formol-PBS al 10% y posteriormente se descalcificaron en EDTA 10%. Se incluyeron en parafina y se realizaron cortes histológicos que se colorearon con hematoxilina-eosina. Posteriormente se tomaron fotografías de los cortes a 400x con una escala milimétrica en microscopio para evaluar el hueso trabecular sobre imágenes digitalizadas utilizando el software Image J 1,4 (NIH, USA).

Para los cortes obtenidos de tibias derechas se obtuvo el volumen de fracción de área trabecular (BV/TV) midiendo el área de las trabéculas a 0,5 mm por debajo de la región central del cartílago de crecimiento, en un rectángulo de 2 mm² de área mientras que para las cuartas vértebras lumbares (L4) se obtuvo midiendo el área a 0,2 mm por debajo del cartílago de crecimiento en un rectángulo de 1 mm² de área (Figura 26 y Figura 27).

Se obtuvo la fracción del área de las trabéculas con relación al área de tejido utilizada

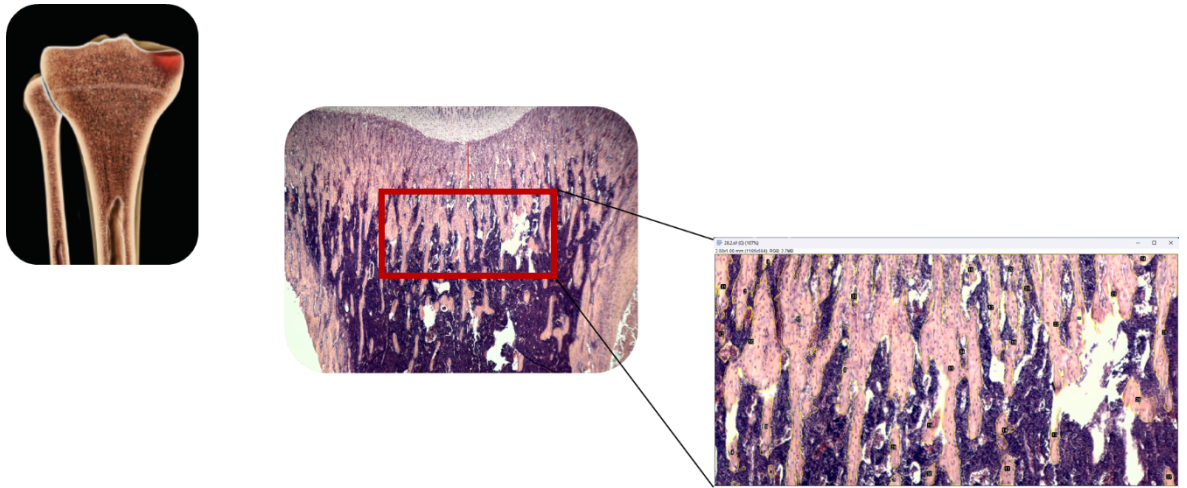


Figura 26 - Histomorfometría estática en tibias, representación de la región evaluada.

para la determinación.

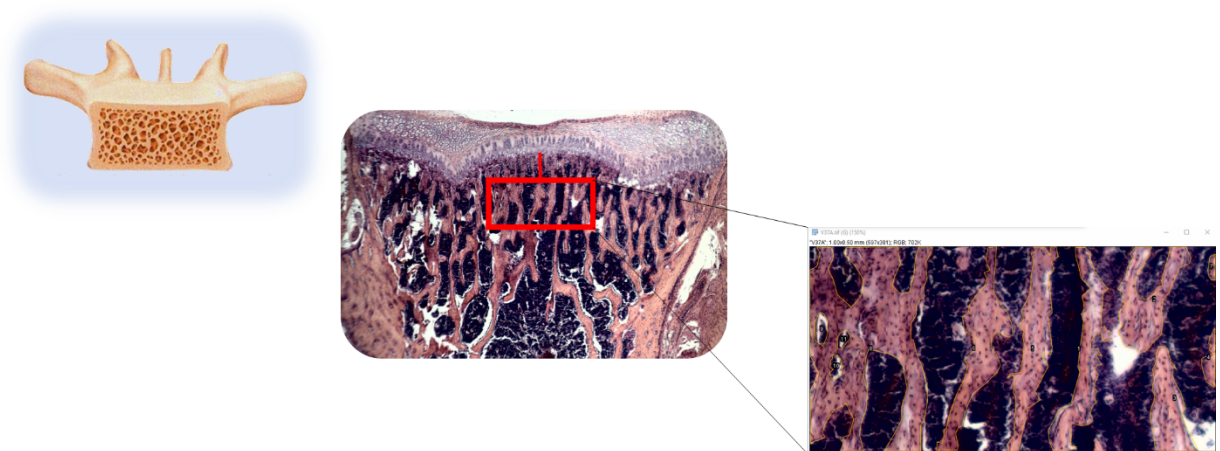


Figura 27 – Histomorfometría estática en vértebras, representación de la región evaluada.

Evaluación de la resistencia ósea

La evaluación de la resistencia ósea se realizó en la hemimandíbula izquierda, fémur izquierdo y derecho, y vértebra lumbar (L1) y torácica (T3) a través de ensayos de flexión a tres puntos y de compresión, según la pieza.

Las mandíbulas fueron colocadas de manera perpendicular al plano del equipo a temperatura ambiente, con el lado lingual hacia arriba, el punto central del equipo fue alineado

sobre el segundo molar (Figura 28). Para el ensayo de biomecánica el fémur se posiciono de tal manera que su eje longitudinal es paralelo al plano horizontal. Los puntos de apoyo de la base del equipo utilizado fueron situados en la epífisis proximal y distal del hueso, mientras que la carga se aplicó en el punto medio de la diáfisis.

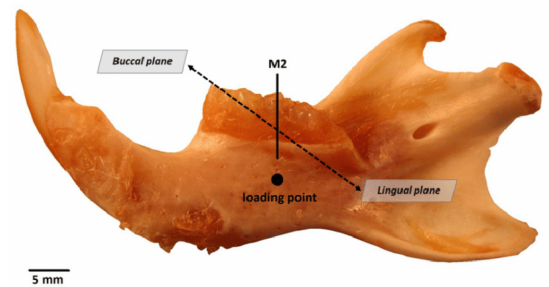


Figura 28 – Planos anatómicos de la hemimandíbula de rata



Figura 29 – Disposición de cada una de las piezas óseas en el equipo de biomecánica. De izquierda a derecha: hemimandíbula, vértebra, fémur.

El *ensayo de flexión a tres puntos* se utilizó en fémures y hemimandíbulas. Fue realizado en un equipo diseñado en el Laboratorio de Biología Ósea, este cuenta con una celda de carga de 200 N de capacidad máxima, con sensibilidad de 0,01 N y una precisión de 10 micras para el desplazamiento. La distancia entre las dos barras donde se apoya la muestra para la prueba de flexión de tres puntos fue de 12 mm. Se midió la longitud de los huesos con un calibre, se calculó el promedio de las mediciones y se marcó en cada hueso el punto de corte del ensayo donde se realizó la flexión (punto medio de la longitud total del hueso). Se colocó el hueso en el soporte de manera que el punto medio quedó a igual distancia de los puntos de apoyo en el soporte y luego se

aplicó la fuerza en la parte media del hueso. La velocidad de desplazamiento fue de 0,01 mm/seg, y se obtuvo una curva de carga en función de la deformación para determinar las propiedades óseas. Los valores de voltaje y desplazamiento fueron adquiridos por el software Biomedical Data Acquisition Suite 1,9 (2011, Argentina). El software transformó los datos de voltaje a fuerza y luego se calculó las demás variables biomecánicas obtenidas de la gráfica de fuerza (N) vs desplazamiento (mm): fuerza de fractura (N), fuerza máxima soportada definida como la máxima carga soportada (N), rigidez del hueso que es la pendiente de la sección lineal de la gráfica, energía absorbida definida como el área bajo la curva acumulada hasta el punto de fractura (mJ), stress (σ) y módulo de Young (Y). Todas estas variables se muestran en la Figura

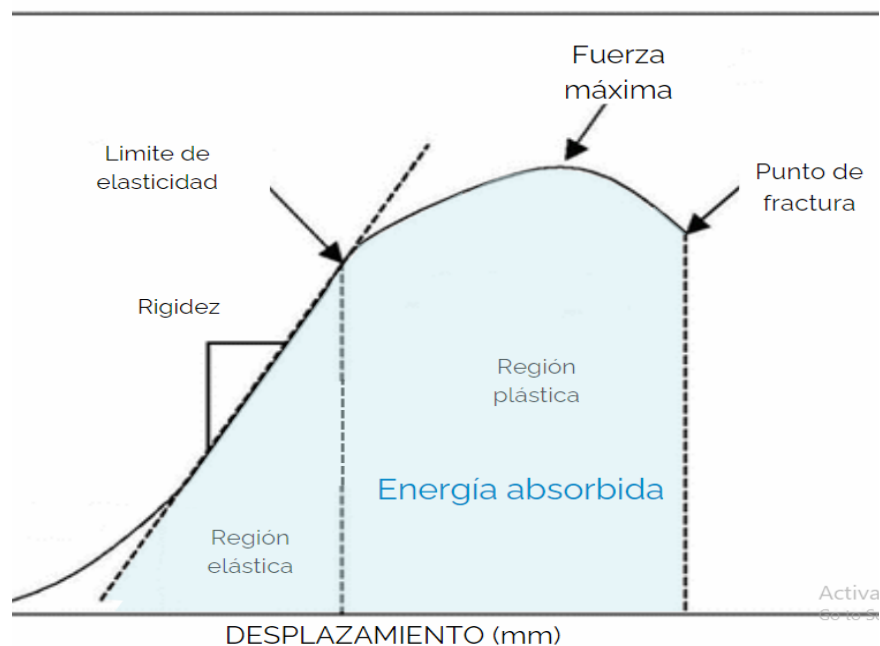


Figura 30 – Variables obtenidas de la curva de carga vs desplazamiento.

30.

Fuerza de Fractura: Es la fuerza en el punto de fractura. Mide la resistencia y la tenacidad de un material. Cuanto mayor sea la fuerza de fractura, más resistente será el material y más energía podrá absorber antes de fracturarse.

Fuerza máxima soportada: Es el valor máximo alcanzado de fuerza en la curva y representa al máximo valor de fuerza soportado antes de que se produzca una deformación permanente o una fractura.

Rigidez: Es la pendiente de la parte lineal de la curva fuerza vs desplazamiento. la rigidez se refiere a la medida de la resistencia del hueso a la deformación cuando se aplica una carga.

Energía Absorbida: La energía absorbida es el área total bajo la curva y representa la energía total absorbida por el hueso hasta el punto de fractura.

Momento de inercia (CSMI): Es una medida de la distribución de masa de una sección transversal de un hueso. Se utiliza para evaluar la resistencia a la flexión de un. Este valor está influenciado por la geometría del hueso.

Módulo de Young: Es una medida de la rigidez del hueso y su capacidad para resistir la deformación elástica bajo carga. Un mayor módulo de Young indica un hueso más rígido y menos deformable, mientras que un módulo de Young más bajo indica un hueso más flexible.

En el caso de las vértebras se aplicó un *ensayo de compresión*, y para ello ésta fue sometida a una fuerza perpendicular progresiva en la zona trabecular, utilizando un accesorio con punta plana redonda de 2,5 mm de diámetro. Se utilizó el mismo software para transformar los datos y calcular variables biomecánicas que para el ensayo a 3 puntos, obteniendo así la energía absorbida, la rigidez y fuerza máxima.

Evaluación de la densidad mineral ósea y el contenido mineral óseo

Se llevó a cabo sobre las radiografías (Kodak D-speed 30,5x40,5 mm) de las tibias, vertebras y hemimandíbulas con un equipo de rayos X (WorkRay 70 KV, Workman SRL, Argentina) incluyendo un patrón de aluminio. La medida de densidad mineral se realizó sobre radiografías de la tibia, se tomaron medidas del valor de intensidad de en la escala de grises sobre imágenes digitalizadas de 8 bits, en la región de la diáfisis y epífisis (Figura 31), y en la región del cóndilo en la mandíbula (Figura 31). Se realizó una interpolación de los valores hallados, con los valores de concentración obtenidos de un patrón calibrado con cantidades crecientes de calcio por cm^2 : 7,95, 18,72, 28,67, 40,73 y 51,93 mg Ca/cm^2 respectivamente. Las mediciones se realizaron con el software Image J 1,40,

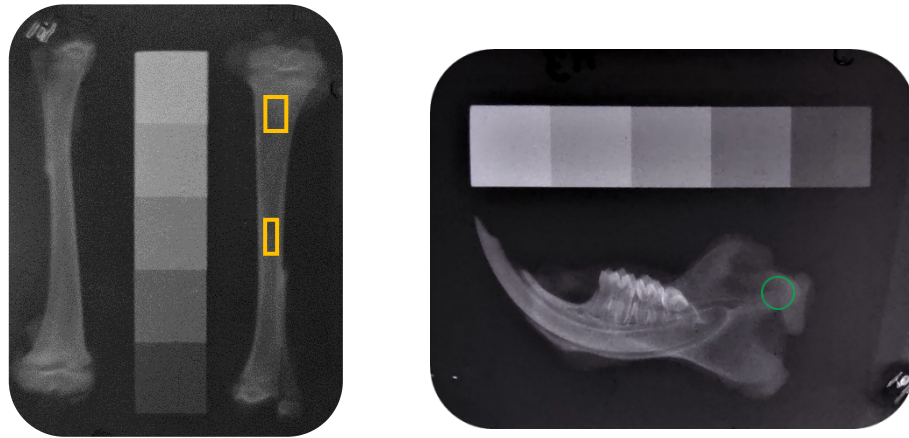


Figura 31 –Izquierda: Radiografía de tibias, los rectángulos representan las regiones donde se determinó la DMO, en el centro se observa el patrón calibrado. Derecha: Radiografía de hemimandíbula, el círculo rodea la región donde se determinó la DMO, en el centro se observa el patrón calibrado.

Objetivo 2

Identificar modificaciones en la composición, crecimiento y estructura del tejido dentario en las crías de ratas gestantes consumidoras de infusiones de yerba mate.

Histomorfometría estática

Las hemimandíbulas se fijaron con formol-PBS al 10% y posteriormente se descalcificaron en EDTA 10% antes de ser incluidas en parafina. Se tiñeron los cortes con hematoxilina-eosina. Para el análisis de hueso alveolar se tomaron fotografías con cámara Touptek (XCAM1080PHA) utilizando un aumento 100X en la región de la raíz del primer molar. Se calibraron las imágenes con una escala milimétrica y se analizaron utilizando el software Image J. Para el área total utilizada se trazó el perímetro interno delimitado por el ligamento periodontal y como base se tomó de referencia el extremo inferior de las raíces del molar. Dentro del área comprendida se tomó el área de las trabéculas y se obtuvo el volumen de fracción de área trabecular (BV/TV) como el área de las trabéculas en relación al área total utilizada para la determinación.



Figura 32 – Determinación de BV/TV en hueso alveolar interradicular

En esas mismas fotografías se midió la altura vertical desde la encía hasta la cresta ósea del hueso interradicular, ubicado en el espacio comprendido entre el primer y segundo molar. Además, se utilizaron fotografías de la pulpa dental a 400X para contar la proporción de odontoblastos por unidad de área, el ancho de la pre-dentina, la dentina y la capa odontoblástica (Figura 33).

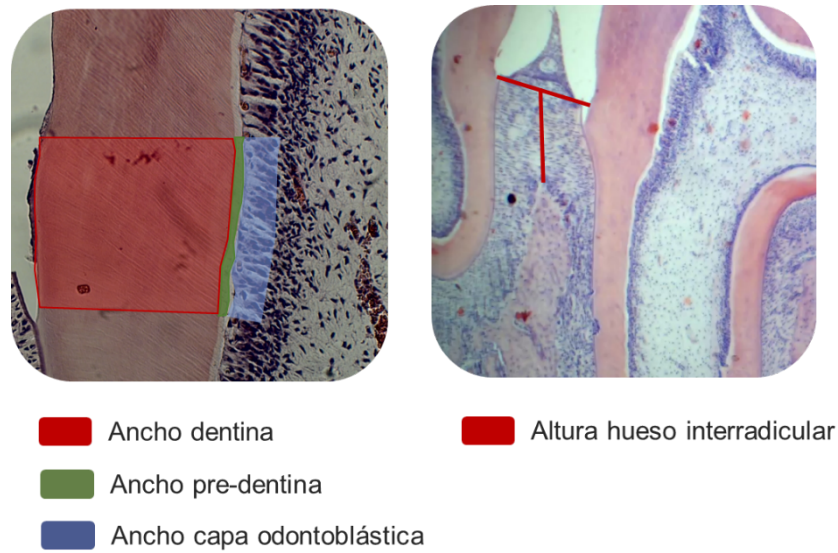


Figura 33 – Izquierda: Áreas utilizadas para la determinación. Derecha: determinación altura hueso interradicular.

Morfometría dental

Las mediciones se realizaron sobre radiografías digitalizadas de hemimandíbulas izquierdas utilizando el software Imagen J, tomando la longitud del ancho comprendido desde el inicio del primer molar al final del último molar.



Figura 34 – Determinación ancho molares

Histomorfometría Dinámica

Utilizando el mismo protocolo descrito anteriormente se procedió a obtener la MAR en la región de la dentina del primer molar a partir de fotografías obtenidas utilizando un microscopio con un aumento de 400X una escala milimétrica como referencia, y el software Image J para la obtención de las medidas en la región de la dentina.

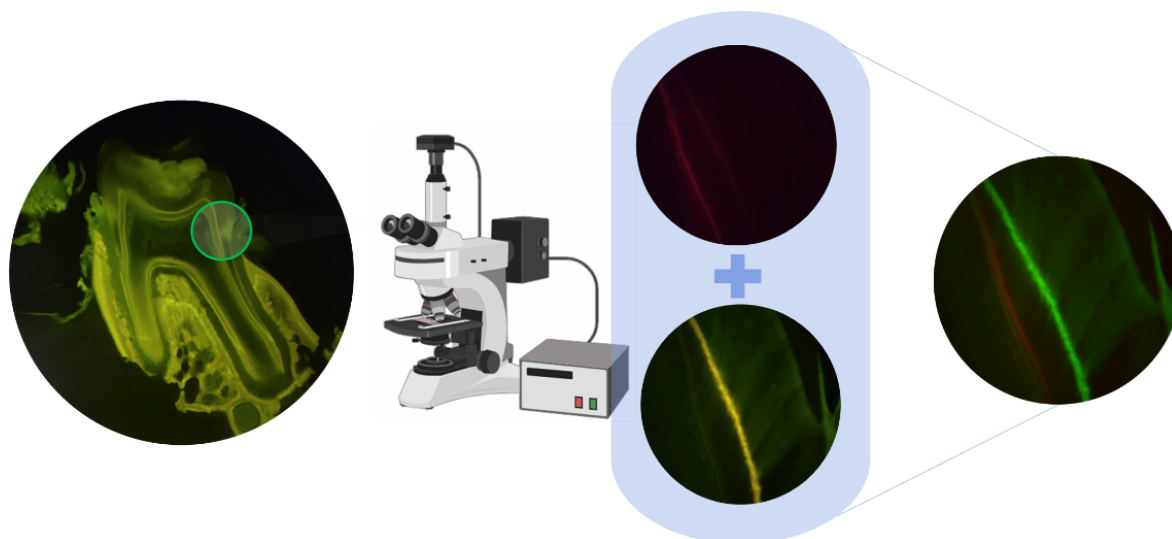


Figura 35 – Determinación histomorfometría dinámica.

Evaluación de la densidad mineral ósea y el contenido mineral óseo

La medida de densidad mineral se realizó por análisis de las radiografías digitalizadas del segundo molar y fue realizada simultáneamente con un patrón calibrado con concentraciones crecientes de calcio por cm^2 : 7,95, 18,72, 28,67, 40,73 y 51,93 mg Ca/ cm^2 respectivamente. Las mediciones se realizaron con el software Image J, y se obtuvieron los valores interpolando la densidad obtenida del segundo molar en la curva de calibración del patrón.

Objetivo 3

Establecer si el consumo de infusiones de yerba mate en ratas gestantes afecta parámetros plasmáticos relacionados al tejido óseo y parámetros de estrés oxidativo en las crías.

Sobre el plasma de las crías recolectado previo al sacrificio se determinó: concentración de proteínas totales, aspartato aminotransferasa (GOT), creatinina y parámetros de estrés oxidativo: lipoperoxidación, polifenoles totales y capacidad antioxidante. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y se utilizó un estándar comercial, Standatrol S-E 2 niveles (Wiener Lab) como control positivo.

Proteínas totales: se determinaron con un espectrofotómetro (Perkin Elmer Lambda 11) empleando un kit comercial Proteínas Totales AA (Wiener Lab). El método se basa en que los enlaces peptídicos de las proteínas reaccionan con el ion cúprico en medio alcalino, para dar un complejo color violeta con máximo de absorción a 540 nm, cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas totales en la muestra.

Contenido de polifenoles totales: se llevó a cabo por el método de Folin Cicolteu (según ISO 14502-1) con ligeras modificaciones para muestras de plasma con el fin de evitar la interferencia de proteínas [129]. El método se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes y se utilizó una curva de calibración con patrón de ácido gálico con concentraciones crecientes de 10 a 60 µg/ml. Las determinaciones se realizaron a 760 nm sobre plasma previamente desproteinizado con ácido tricloroacético al 10%. Los resultados se expresaron como µg de equivalentes de ácido gálico/ml (µg GAE/ml).

Creatinina: La determinación de creatinina se llevó a cabo como indicador de la función renal, utilizando kit comercial Creatinina cinética AA (línea líquida, Wiener Lab.). El método se fundamenta en la reacción a 25°C de la creatinina con el picrato alcalino que produce un cromógeno rojo que se mide espectrofotométricamente. La velocidad de formación del color es proporcional a la concentración de creatinina en la muestra. Los resultados se expresan en mg/L, las medidas de absorbancias a 500 nm se realizaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer lambda 11,

Alanina aminotransferasa: La actividad de GOT plasmática se realizó utilizando un equipo comercial GOT unitest, (línea sólida, Wiener Lab). La técnica se fundamenta en la medida del cambio de absorbancia a 340 nm, generado por la transaminación del L-aspartato a oxalacetato por la GOT, y la posterior reducción del oxalacetato a L-malato por la enzima malato deshidrogenasa a pH 7,8 y a 37 °C. Los resultados se obtienen en unidades/Litro (U/L) y las medidas de absorbancias se realizaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer lambda 11,

Parámetros de estrés oxidativo:

Lipoperoxidación: El malondialdehído (MDA), marcador de peroxidación lipídica, se origina por la acción de radicales hidroxilos sobre las cadenas insaturadas de los ácidos grasos de los fosfolípidos de membranas. Su aumento es un indicador de estrés oxidativo. El MDA se estimó como el nivel de TBARS por el método de Ohkawa [130]. El principio del método se basa en la medición espectrofotométrica del complejo que se forma durante la reacción del ácido tiobarbitúrico con MDA. Brevemente, las muestras de plasma se incubaron durante 1 h a 95 °C en un medio de reacción que contenía 14 mmol/L de dodecil sulfato de sodio, 1,25 mol/L de ácido tiobarbitúrico y 18 mmol/L de ácido acético. A continuación, las muestras se centrifugaron a 1000 g durante 5 minutos y los sobrenadantes se sometieron a desproteinización con 0,31 mol/L de ácido tricloroacético. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 1500 g durante 10 min y la absorbancia de los sobrenadantes se midió a 532 nm.

Por otro lado, se realizó una curva de calibración con un patrón de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) y se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras en la misma. La concentración de MDA se expresó en nmol/ml.

Capacidad antioxidante: Se lleva a cabo por el ensayo de FRAP de acuerdo con el procedimiento descrito por Benzie and Strain con modificaciones, en el cual la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} a bajo pH lleva a la formación de un complejo coloreado (TPTZ: ferrous-2,4,6-tripirydy-s-triazine), lo cual provoca un aumento de absorbancia a 593 nm [131]. Los resultados se expresaron como concentración de iones Fe^{3+} reducidos a

Fe²⁺ después de 3 minutos de incubación de las muestras con reactivo de FRAP (buffer acetato, TPTZ, HCl y FeCl₃).

En este caso se preparó una curva de calibración con el stock FeSO₄·7H₂O (1000 µmol/L) con concentraciones de 500 a 2500 µmol/L FeSO₄·7H₂O. Como control positivo se utilizó el antioxidante butilhidroxitolueno (100 µM). Para las muestras se utilizaron 5 µl de plasma diluido en 75 µl de H₂O, y luego se agregaron 600 µl del reactivo de FRAP.

Por último, se incubaron las muestras y la curva de calibración a 37 °C durante 10 minutos, y se realizó la lectura de absorbancia a 593 nm. Luego de restar el blanco, se interpoló en valor de absorbancia obtenido para las muestras en la curva de calibración y se obtuvo la concentración de las mismas en µmol de Fe²⁺/L.

Análisis estadístico de los datos

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo utilizando el software GraphPad Prism 8,0,2, Para las variables cuantitativas, se realizó una evaluación inicial de la distribución de los datos mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar el uso de pruebas paramétricas o no paramétricas, y se verificó la homogeneidad de la varianza utilizando el test de Bartlett.

Las variables continuas de los dos grupos tratados se compararon con el grupo de control utilizando el análisis de la varianza (ANOVA) a un criterio para distribuciones normales con varianza homogénea, o ANOVA de Brown-Forsythe y Welch para distribuciones normales sin homogeneidad en la varianza. Como post-test para las comparaciones múltiples, se utilizó la prueba de Dunnett. Además, cuando se evaluaron dos factores sobre la variable, se aplicó la prueba de ANOVA a dos criterios de clasificación. En todos los casos, se consideró una diferencia significativa cuando $p < 0,05$,

9 RESULTADOS

Peso corporal y evaluación del consumo de líquidos

Se evaluó el peso de las crías a los días 17, 25, 33 y 39 de vida para cada grupo. Se observó un aumento significativo en el peso a lo largo de los días, pero no se hallaron diferencias entre los diferentes grupos en ninguno de los días analizados (Figura 36).

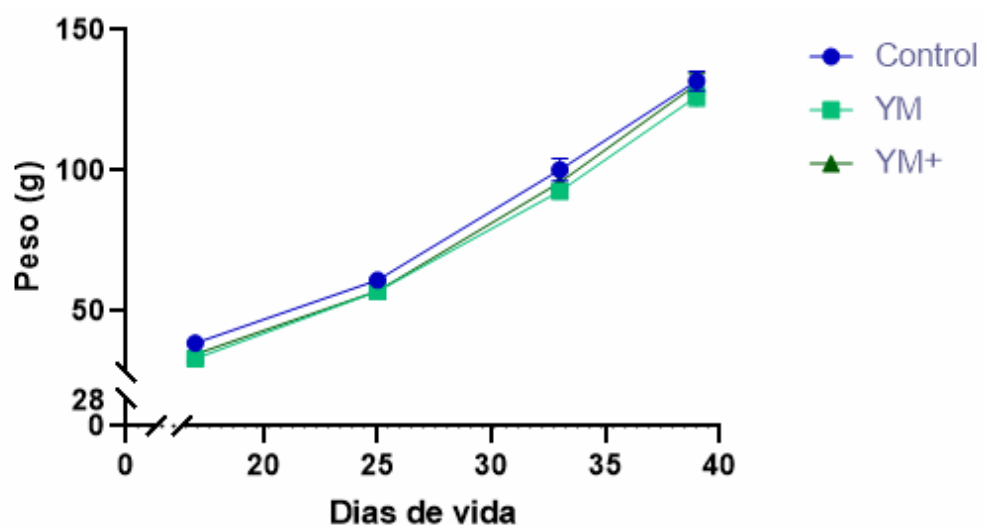


Figura 36 - Peso de las crías a lo largo de los experimentos. Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM. $p > 0,05$, ANOVA a 2 criterios.

A continuación, en la Figura 37 se muestran los pesos obtenidos al finalizar el experimento según el sexo y el tratamiento aplicado. No se observaron diferencias significativas en los pesos finales debidas al tratamiento o al sexo, y tampoco se halló una interacción entre estas variables. Por este motivo los resultados se presentan sin discriminar por sexo dentro de los grupos experimentales.

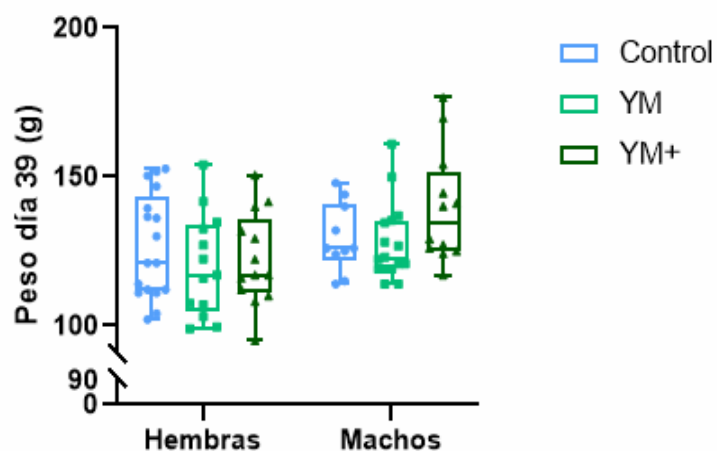


Figura 37 – Comparación de pesos de las crías por grupo y sexo. Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM. (ANOVA a 2 criterios, $p > 0,05$).

También se evaluó el consumo de líquidos para cada grupo experimental en el día 39 de vida y este valor hallado fue utilizado para la estimación de la dosis consumida de cafeína calculada en la sección del diseño experimental. Se observó un incremento del consumo de líquido en relación al peso corporal en los grupos tratados respecto del control, alcanzado diferencia significativa con un aumento del 15,8% respecto al control solo para el grupo YM+ (Figura 38).

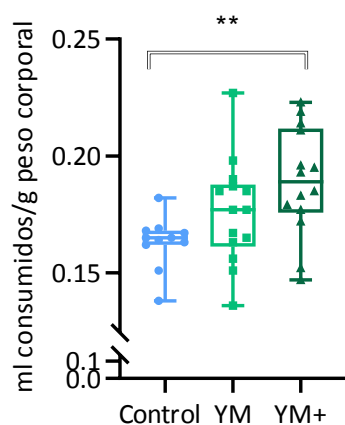


Figura 38 – Consumo de líquido (ml) de las crías en relación con el peso (g) al finalizar el experimento para cada uno de los grupos experimentales. ** $p < 0,01$, Test de Brown-Forsythe y Welch ANOVA. Post test de Dunnett.

Objetivo 1

Evaluar variaciones en la estructura, biomecánica y composición de huesos largos, vértebras, y mandíbulas en las crías de ratas gestantes consumidoras de infusiones de yerba mate.

Se detallan a continuación los resultados obtenidos para cada pieza ósea con los diferentes métodos de evaluación empleados.

Fémur

Medidas morfométricas macroscópicas

Se determinaron las medidas morfométricas en secciones transversales de fémur, para cada uno de los tratamientos. Tanto el ancho cortical como el área cortical se vieron significativamente disminuidos en el grupo YM en comparación con el grupo control, con una reducción del 9,5% en el ancho cortical y un 10,3% en el área cortical. Sin embargo, estas diferencias no se observaron en el grupo YM+ (Tabla 2). También se halló una disminución tanto en el área medular, el perímetro endóstico y el diámetro interno para el grupo YM+, representando un 13,4%, 9,7% y un 5,4% de cambio respectivamente, comparados con el grupo control, sin cambios significativos en estas variables en el grupo YM (Figura 39).

No se observaron diferencias significativas para las medidas de radio, perímetro perióstico, diámetro externo y área total en ninguno de los grupos tratados respecto al control (Tabla 2).

Tabla 2 – Morfometría de Fémur

	Control	YM	YM+
Radio (mm)	1,47 ± 0,03	1,45 ± 0,02	1,41 ± 0,03
Ancho cortical (mm)	0,42 ± 0,01	0,38 ± 0,01 **	0,44 ± 0,01
Área cortical (mm ²)	3,39 ± 0,14	3,04 ± 0,10 *	3,25 ± 0,09
Perímetro perióstico (mm)	6,75 ± 0,17	6,87 ± 0,09	6,23 ± 0,21
Diámetro externo (mm)	2,95 ± 0,06	2,90 ± 0,04	2,81 ± 0,06
Área total (mm ²)	6,84 ± 0,26	6,55 ± 0,15	6,23 ± 0,26

Los resultados se expresan como la media ± SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ANOVA. Post-test Dunnet.

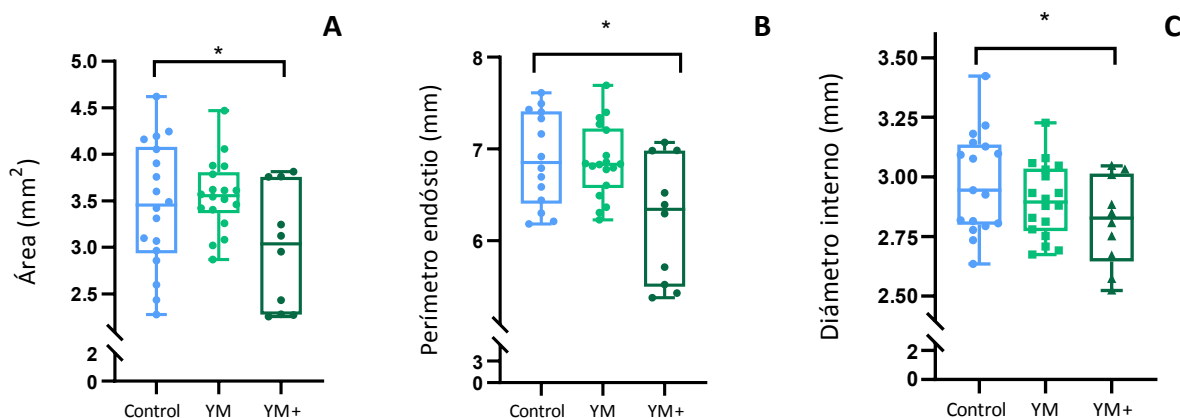


Figura 39 - Cambios morfométricos en el fémur. (A) Área medular, (B) Perímetro endóstico, (C) Diámetro interno. Valores expresados como media $\pm$ SEM. * $p < 0,05$, ANOVA. Post-test Dunnet.

Evaluación de la resistencia ósea

A través del ensayo de flexión a 3 puntos no se hallaron diferencias significativas en la mayoría de las variables excepto por una mayor energía absorbida en el grupo YM respecto al control sin diferencias para el grupo YM+ (Tabla 3).

Tabla 3 – Variables biomecánicas en fémur

	Control	YM	YM+
Carga máxima (N)	37,50 $\pm$ 0,94	37,98 $\pm$ 1,15	36,16 $\pm$ 0,62
Rigidez (mm/N)	105,80 $\pm$ 3,34	121,20 $\pm$ 6,75	107,00 $\pm$ 5,17
Fuerza de fractura (N)	33,84 $\pm$ 0,96	34,06 $\pm$ 1,12	33,08 $\pm$ 0,75
CSMI (mm ⁴)	1,78 $\pm$ 0,14	1,58 $\pm$ 0,11	1,54 $\pm$ 0,10
Energía absorbida (mJ)	23,51 $\pm$ 1,52	30,36 $\pm$ 1,68*	27,17 $\pm$ 2,18
Módulo de Young (GPa)	1,84 $\pm$ 0,21	2,08 $\pm$ 0,16	1,61 $\pm$ 0,10
Tensión máxima (MPa)	88,86 $\pm$ 5,86	99,56 $\pm$ 4,21	93,14 $\pm$ 5,47

Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM. * $p < 0,05$, ANOVA. Post-test Dunnet.

Tibia

Medidas morfométricas macroscópicas

Se halló una disminución significativa del diámetro en el grupo YM+ que representa un 4,3% de cambio respecto al control, sin diferencias para el grupo YM. Por otra parte, no se obtuvieron diferencias en el largo de la tibia entre los diferentes grupos (Tabla 4).

Tabla 4 – Morfometría de Tibias

	Control	YM	YM+
Largo (mm)	24,80 ± 0,19	24,80 ± 0,14	25,26 ± 0,15
Diámetro (mm)	2,08 ± 0,03	2,07 ± 0,03	1,99 ± 0,02 **

Los resultados se expresan como la media ± SEM. ** $p < 0,01$, Test de Brown-Forsythe y Welch ANOVA. Post test de Dunnett.

Histomorfometría dinámica

A nivel cortical no se observaron diferencias para ninguno de los tratamientos respecto al control en la tasa de aposición mineral (MAR) (Tabla 5). Asimismo, el ensayo reveló que la superficie activa de mineralización (MS/BS) no presentó diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, siendo en todos los casos del 100% dado que el análisis se realizó durante el periodo de crecimiento. Por lo tanto, la tasa de formación ósea, producto de estos dos parámetros, tampoco presenta variaciones respecto al control.

Tabla 5 – Tasa de aposición mineral en tibia

	Control	YM	YM+
Tasa de aposición mineral ($\mu\text{m}/\text{día}$)	4,433 ± 0,219	4,176 ± 0,048	4,810 ± 0,202

Los resultados se expresan como media ± SEM. Test ANOVA $p > 0,05$,

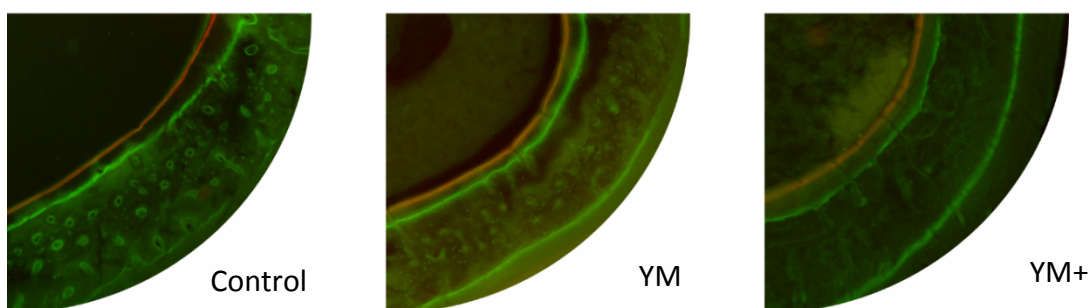
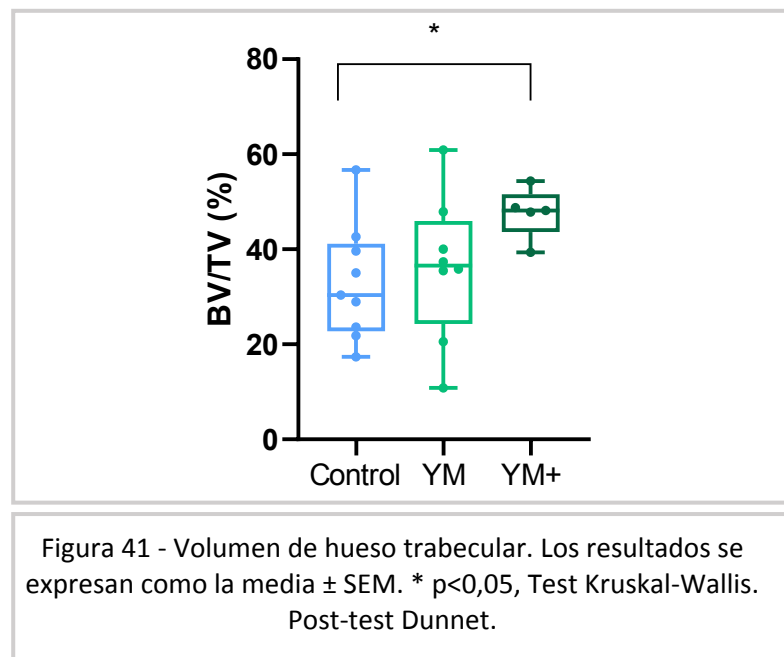


Figura 40 - Cortes histológicos de los grupos analizados por histomorfometría dinámica. Las figuras corresponden a cortes transversales de tibia, la línea roja corresponde a la marcación con Alizarin Red mientras que la línea verde contigua corresponde a la tetraciclina. Se observa que ambas líneas son continuas para todos los casos. Aumento 100X.

Histomorfometría estática

Al evaluar la fracción de volumen de hueso trabecular respecto al área total en metáfisis de tibia se observó una tendencia con aumento que solo fue significativo para el grupo YM+ con un incremento del 44,9% del volumen óseo trabecular (Figura 41). En la Figura 42 se observa esta diferencia obtenida en los cortes histológicos



evaluados.

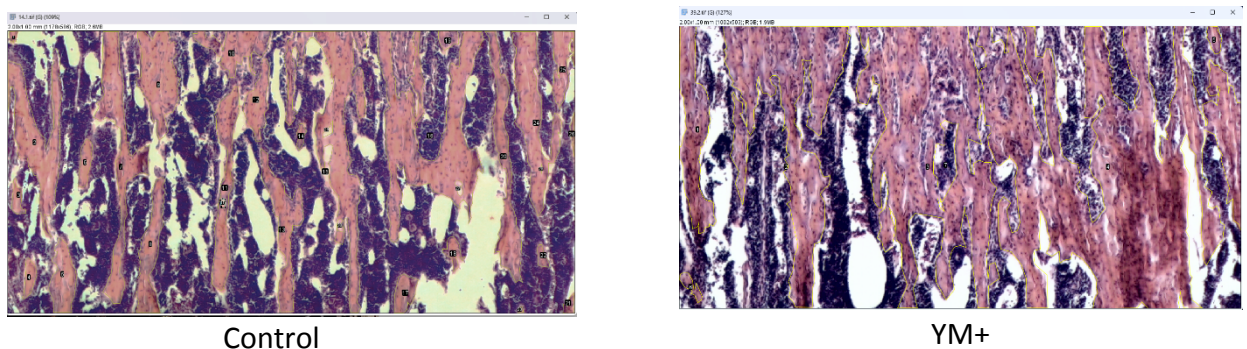
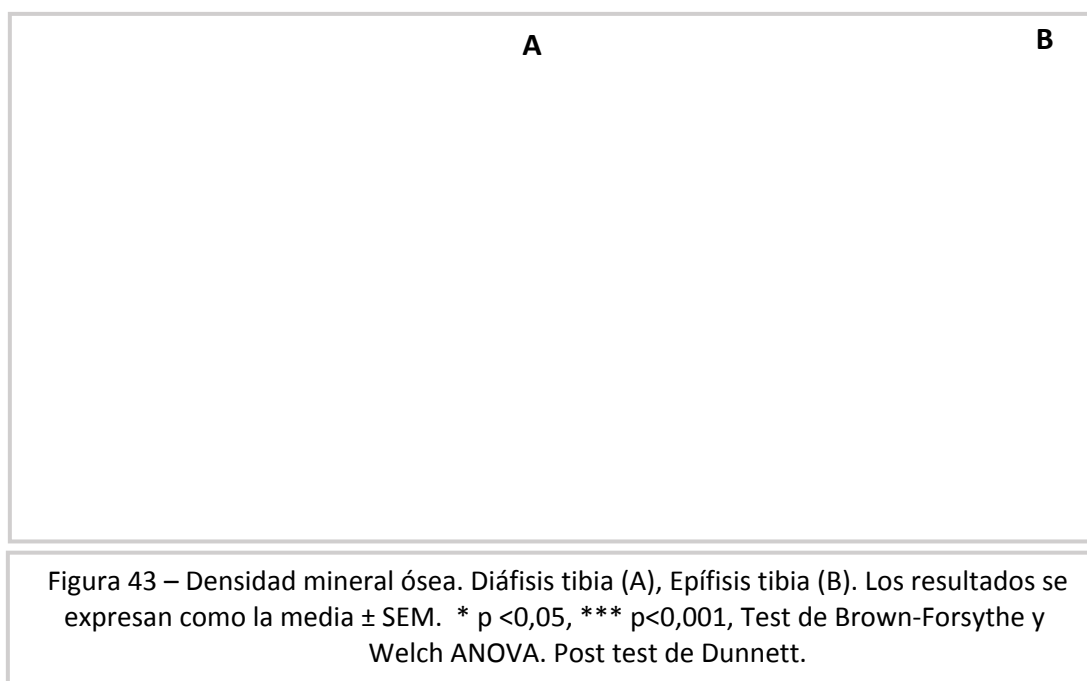


Figura 42 – Cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-eosina utilizados para la evaluación de fracción de volumen trabecular en metáfisis de tibia. Aumento 40X.

Evaluación de la densidad mineral ósea y el contenido mineral óseo

Respecto a la DMO se halló una disminución en la diáfisis del grupo YM+ comparado con el control (Figura 43A), y una disminución en la epífisis para ambos grupos tratados (Figura 43B).



Vértebras

Medidas morfométricas macroscópicas

En la evolución morfométricas de vértebras L1 solo se observó una disminución significativa del ancho anteroposterior de la vértebra para el grupo YM sin diferencias para el grupo YM+ cuando se compara contra el control, representando un 6,6% de cambio (Tabla 6).

Tabla 6 – Medidas morfométricas en la primera vértebra lumbar

	Control	YM	YM+
Ancho lateromedial de la vértebra (mm)	6,58 $\pm$ 0,11	6,43 $\pm$ 0,18	6,35 $\pm$ 0,17
Ancho anteroposterior de la vértebra (mm)	4,69 $\pm$ 0,08	4,38 $\pm$ 0,05*	4,56 $\pm$ 0,07
Diámetro mayor del canal medular (mm)	1,31 $\pm$ 0,06	1,78 $\pm$ 0,25	1,32 $\pm$ 0,05
Diámetro menor del canal medular (mm)	2,44 $\pm$ 0,21	2,14 $\pm$ 0,24	2,43 $\pm$ 0,11
Área del canal medular (mm ²)	3,14 $\pm$ 0,17	3,12 $\pm$ 0,20	3,06 $\pm$ 0,14

Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM. * $p < 0,05$, Test Kruskal-Wallis. Post-test Dunnett.

Evaluación de la resistencia ósea

Los valores de energía absorbida, rigidez y fuerza máxima en hueso trabecular de la primera vértebra lumbar no presentaron diferencias significativas entre los grupos (Tabla 7).

Tabla 7 – Variables biomecánicas primer vértebra lumbar

	Control	YM	YM+
Energía absorbida (mJ)	40,46 ± 3,64	38,26 ± 3,02	38,22 ± 2,34
Rigidez (N/mm)	63,23 ± 4,33	62,58 ± 3,01	63,86 ± 3,85
Fuerza máxima (N)	48,08 ± 2,33	45,86 ± 2,11	44,95 ± 2,13

Los resultados se expresan como media ± SEM. Test ANOVA $p > 0,05$

Los valores de energía absorbida, rigidez y fuerza máxima en hueso trabecular de la cuarta vértebra torácica no presentaron diferencias significativas entre los grupos (Tabla 8).

Tabla 8– Variables biomecánicas cuarta vértebra torácica

	Control	YM	YM+
Energía absorbida (mJ)	44,25 ± 2,63	42,71 ± 2,38	42,59 ± 2,33
Rigidez (N/mm)	60,31 ± 1,63	59,65 ± 1,68	64,63 ± 2,24
Fuerza máxima (N)	58,33 ± 1,35	58,02 ± 1,79	60,41 ± 1,13

Los resultados se expresan como media ± SEM. Test ANOVA $p > 0,05$,

Histomorfometría estática

Para la segunda vértebra lumbar se halló un aumento del 37,1% en la fracción de volumen trabecular en el grupo YM comparado con el grupo control, y un aumento no significativo para el grupo YM+ (Figura 44 y Figura 45).

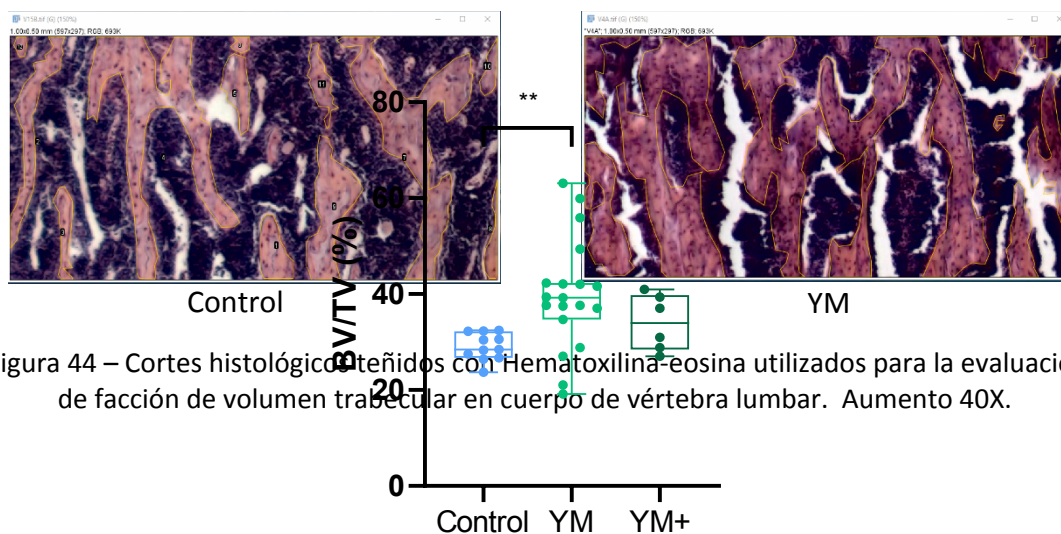


Figura 44 – Cortes histológicos teñidos con Hematoxilina-eosina utilizados para la evaluación de fracción de volumen trabecular en cuerpo de vértebra lumbar. Aumento 40X.

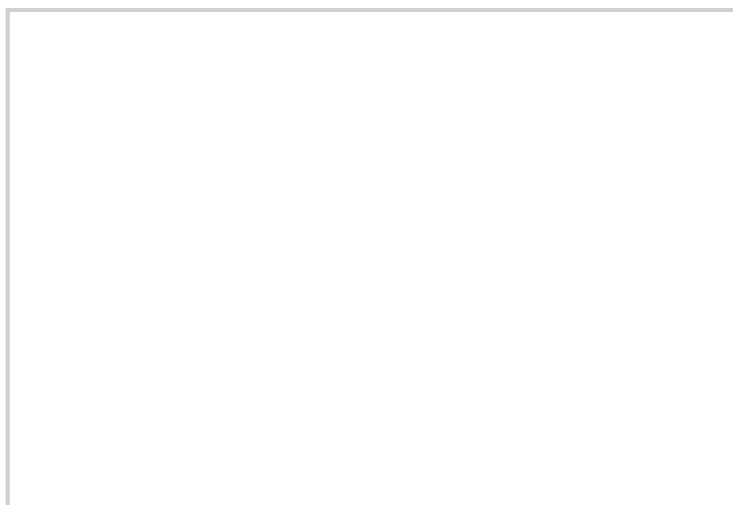


Figura 45 - Volumen de hueso trabecular en cuarta vértebra lumbar (BV/TV%). Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM. ** $p < 0,01$, Test Kruskal-Wallis. Post-test Dunnet.

Evaluación de la densidad mineral ósea y el contenido mineral óseo

No se hallaron diferencias en la DMO entre los grupos tratados y el control en la cuarta vértebra lumbar (Tabla 9).

Tabla 9 – DMO en cuarta vértebra lumbar

	Control	YM	YM+
DMO (mg Ca/mm ²)	13,03 $\pm$ 0,74	12,01 $\pm$ 1,02	14,00 $\pm$ 1,60

Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. Test ANOVA $p > 0,05$,

Hemimandíbula

Medidas morfométricas macroscópicas

Al evaluar las medidas morfométricas en hemimandíbula, no se hallaron cambios significativos a nivel morfológico macroscópico en ninguna de las longitudes obtenidas para los diferentes grupos (Tabla 10).

Tabla 10 – Medidas morfométricas en Hemimandíbula

	Control	YM	YM+
O - Cóndilo (OC) (mm)	19,37 $\pm$ 0,17	19,36 $\pm$ 0,13	19,61 $\pm$ 0,20
O - Base (OB) (mm)	17,49 $\pm$ 0,12	17,64 $\pm$ 0,20	17,45 $\pm$ 0,16
O - Apófisis (OA) (mm)	20,48 $\pm$ 0,13	20,43 $\pm$ 0,13	20,59 $\pm$ 0,21
Área OAB (mm)	85,70 $\pm$ 1,50	85,88 $\pm$ 1,69	85,49 $\pm$ 1,68

Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM. Test ANOVA $p > 0,05$,

Evaluación de la resistencia ósea

Se hallaron valores significativamente mayores de fuerza máxima y punto de fractura solo para los grupos YM y YM+ comparado con el control, mientras que la energía absorbida solo mostró diferencias significativas en el grupo YM+. No se hallaron diferencias en los valores de rigidez (Figura 46).

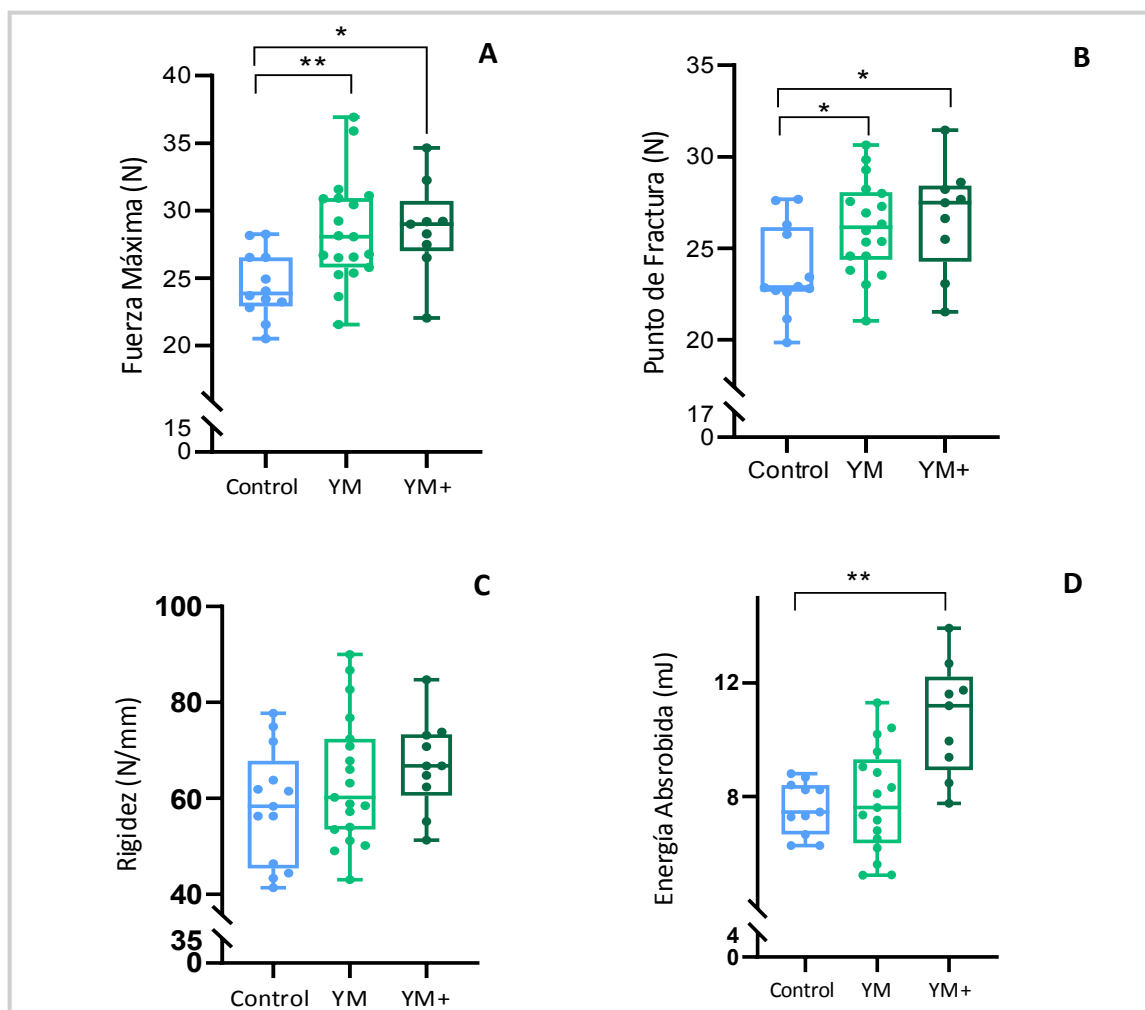


Figura 46 – Evaluación de resistencia ósea por ensayo de flexión a 3 puntos en hemimandíbula: Fuerza Máxima (A), Punto de Fractura (B), Rigidez (C), Energía absorbida (D). Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Test de ANOVA. Post-test Dunnet.

Evaluación de la densidad mineral ósea y el contenido mineral óseo

No se hallaron diferencias significativas en los valores obtenidos de DMO evaluadas en radiografías de hemimandíbulas evaluada a nivel del cóndilo (Tabla 11).

Tabla 11 – DMO en cóndilo

	Control	YM	YM+
DMO (mg Ca/mm ²)	6,84 $\pm$ 0,259	6,55 $\pm$ 0,156	6,23 $\pm$ 0,256

Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM. Test ANOVA $p > 0,05$,

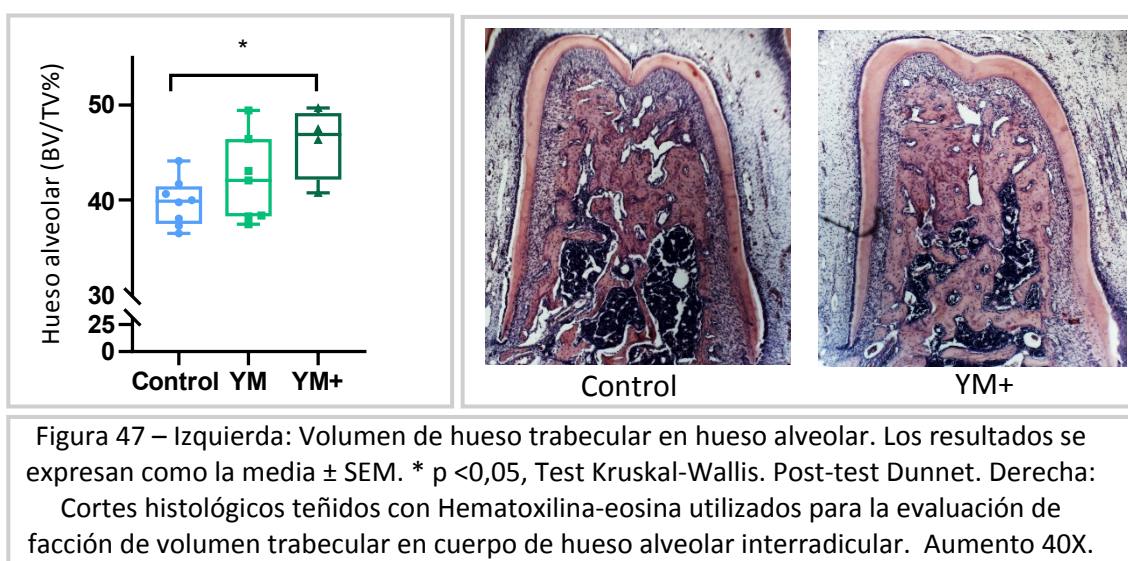
Objetivo 2

Identificar modificaciones en la composición, crecimiento y estructura del tejido dentario en las crías de ratas gestantes consumidoras de infusiones de yerba mate.

Hueso alveolar interradicular

Histomorfometría estática

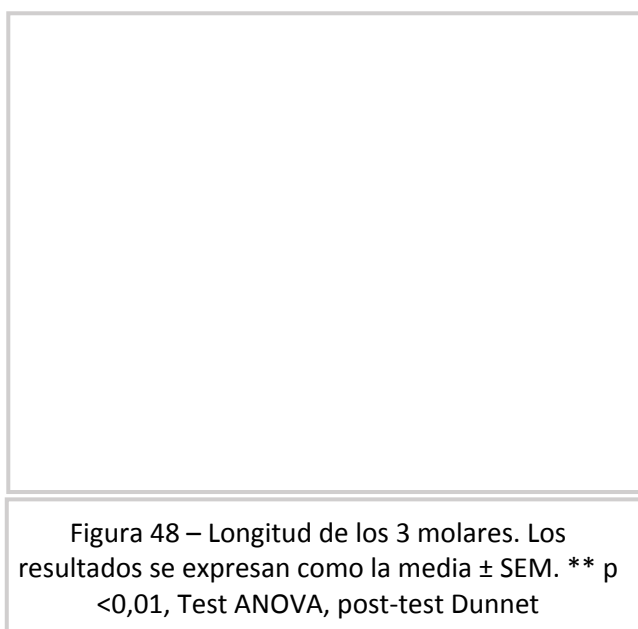
En el grupo YM+ se obtuvo un aumento del 15,9% en la fracción de hueso trabecular en hueso alveolar respecto al control. No se hallaron variaciones significativas respecto al control en el caso del grupo YM (Figura 47).



Molares

Medidas macroscópicas

Al evaluar el ancho de los 3 molares se halló una disminución en la longitud con diferencias significativas en ambos grupos tratados respecto al control:



Evaluación de la densidad mineral ósea

Se halló una disminución significativa en la DMO en el grupo YM+ respecto al control, sin variaciones significativas en el grupo YM (Figura 49).

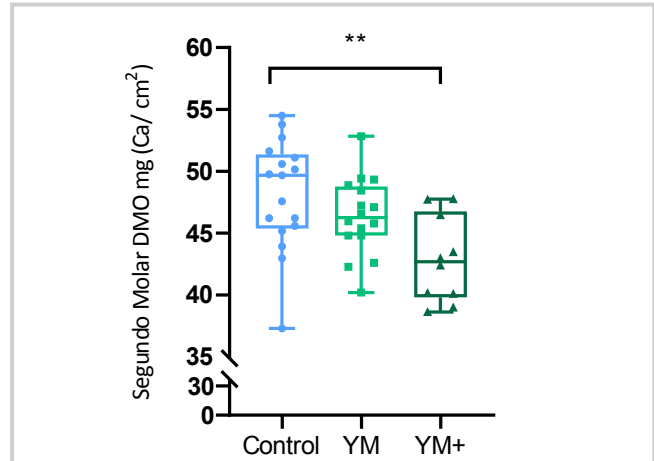


Figura 49 – Densidad mineral ósea en segundo molar. Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM. ** $p < 0,01$, Test ANOVA, post-test Dunnet.

Análisis histológico

Al analizar la densidad de osteoblastos, el ancho de la dentina y pre-dentina y la altura del hueso alveolar, no se hallaron diferencias significativas entre los grupos tratados respecto al control para ninguna de las variables (Tabla 12).

Tabla 12 – Medidas histológicas del primer molar

	Control	YM	YM+
Odontoblastos (células/mm ²)	10305 $\pm$ 431	11621 $\pm$ 761	9564 $\pm$ 102
Altura hueso interradicular (mm)	0,41 $\pm$ 0,02	0,43 $\pm$ 0,01	0,38 $\pm$ 0,02
Ancho dentina (mm)	0,27 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,01	0,32 $\pm$ 0,02
Ancho pre-dentina (mm)	0,016 $\pm$ 0,002	0,014 $\pm$ 0,0006	0,016 $\pm$ 0,002

Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM. Test ANOVA, $p > 0,05$,

Histomorfometría dinámica

La tasa de aposición mineral (MAR) tampoco se hallaron diferencias significativas entre los grupos (Tabla 13). Dado que la superficie activa de mineralización (MS/BS) fue del 100% para todos los grupos por el alto recambio de la dentina y por la etapa de crecimiento, la tasa de formación ósea, producto de estos dos parámetros, tampoco presentó variaciones.

Tabla 13 – Histomorfometría dinámica en primer molar

Tasa de aposición mineral ($\mu\text{m}/\text{día}$)	Control	YM	YM+
26 a 39 días de vida	$4,48 \pm 0,22$	$4,97 \pm 0,18$	$4,25 \pm 0,30$
26 a 36 días de vida	$8,57 \pm 0,39$	$9,35 \pm 0,33$	$7,90 \pm 0,58$
36 a 39 días de vida	$6,87 \pm 0,80$	$8,16 \pm 0,69$	$7,29 \pm 0,83$

Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM. Test ANOVA, $p > 0,05$,

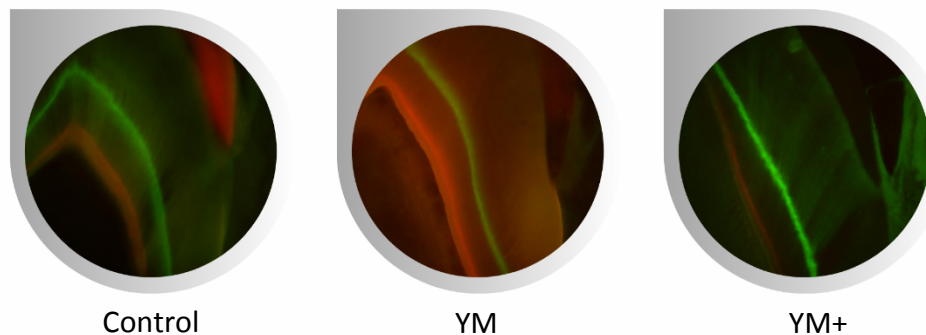


Figura 50 - Cortes histológicos de los grupos analizados por histomorfometría dinámica. Las figuras corresponden a cortes del primer molar, la línea roja corresponde a la marcación con Alizarin Red para el día 26 de vida, mientras que la línea verde contigua corresponde a la tetraciclina al día 36 de vida. Se observa que ambas líneas son continuas para todos los casos. Aumento 100X.

Objetivo 3

Establecer si el consumo de infusiones de yerba mate en ratas gestantes afecta parámetros plasmáticos relacionados al tejido óseo y parámetros de estrés oxidativo en las crías.

Determinaciones bioquímicas

Proteínas totales

En muestras de plasma se determinaron proteínas totales al día 17 y 39 de vida de las crías. Al día 17 se observa una mayor concentración de proteínas en el grupo YM+ respecto al control (Figura 51 - Día 17) sin diferencias para el grupo YM, y para el día 39 se hayan valores disminuidos en ambos grupos tratados respecto al control (Figura 51 - Día 39).

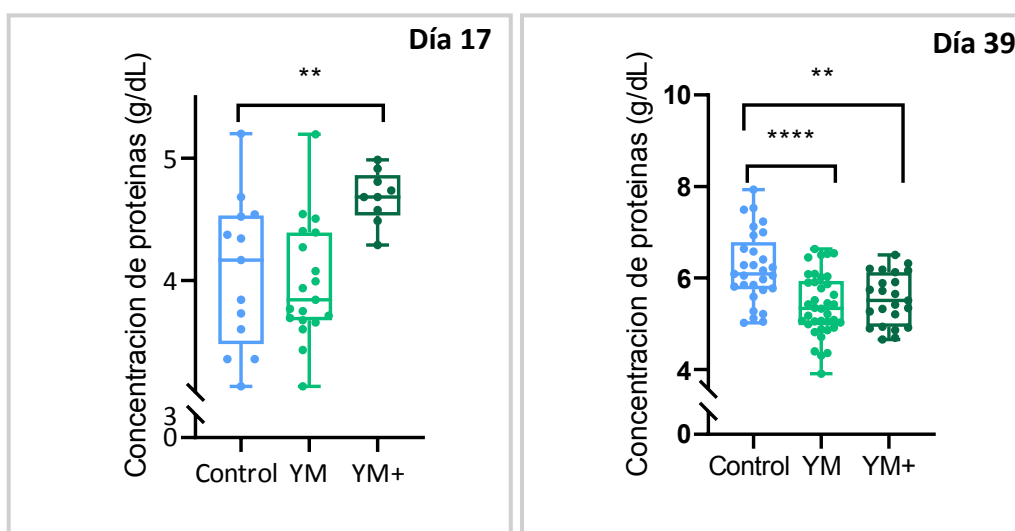
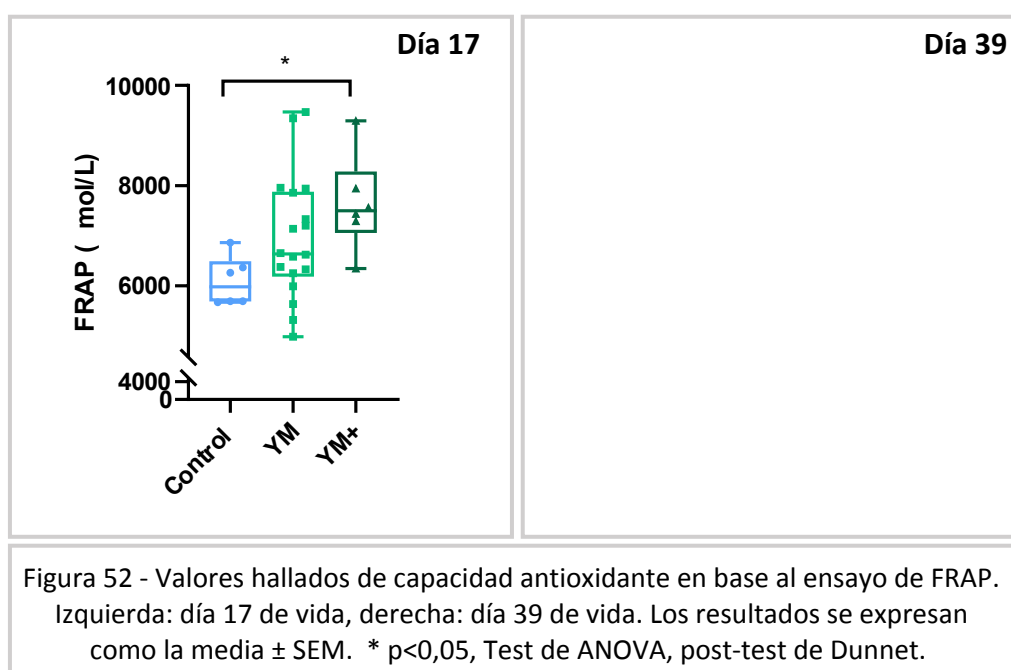


Figura 51 – Valores hallados de proteínas plasmáticas. Izquierda: día 17 de vida, derecha: día 39 de vida. Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Test de Brown-Forsythe y Welch ANOVA. Post test de Dunnett.

Capacidad antioxidante

En muestras de plasma se obtuvo capacidad antioxidante total para los días 17 y 39 de vida de las crías y se halló una tendencia con aumento para los grupos tratados. Para el día 17 de vida el grupo YM+ presentó un aumento significativo respecto al control (Figura 52 – Día 17) con la misma tendencia al día 39 (Figura 52 – Día 39).



Para el resto de las determinaciones bioquímicas relacionadas al estado oxidativo fisiológico de las crías tales como lipoperoxidación y polifenoles totales en plasma, no se hallaron diferencias significativas entre los grupos tratados y el control (Tabla 14).

Tabla 14 – Determinaciones bioquímicas en plasma de crías.

	Control	YM	YM+
Lipoperoxidación (nmol/mL)	5,2 $\pm$ 0,3	4,8 $\pm$ 0,2	5,5 $\pm$ 0,4
Polifenoles totales (Eq. Ácido gálico μ g/mL)	120,1 $\pm$ 5,2	118,5 $\pm$ 4,8	122,3 $\pm$ 6,1

Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM. Test ANOVA, $p > 0,05$,

Creatinina y GOT

Los valores de GOT en plasma presentaron un aumento con diferencia significativa en el grupo YM+ respecto al control, sin diferencias en el grupo YM (Figura 53). Los valores de creatinina en plasma de los grupos tratados no presentaron diferencias significativas respecto al control (C: $0,90 \pm 0,05$ mg/L; YM: $0,95 \pm 0,04$ mg/L; YM+: $0,87 \pm 0,06$ mg/L).

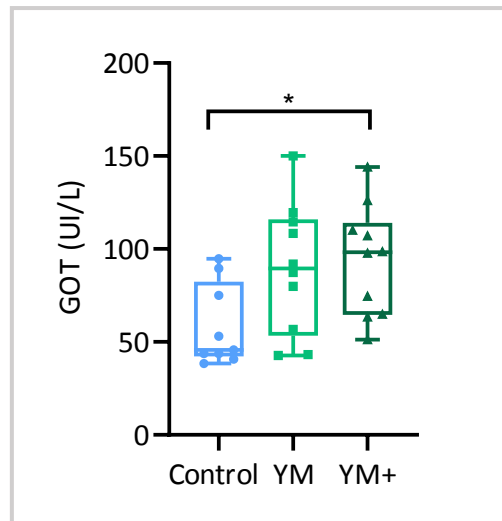


Figura 53 – Valores de GOT en plasma. Los resultados se expresan como la media $\pm$ SEM. * $p < 0,05$, Test Kruskal-Wallis. Post-test Dunnet.

10 Discusión

La YM obtenida de la especie arbórea *Ilex paraguariensis* es consumida diariamente en países de América Latina para la preparación de infusiones. Se estima una ingesta de cafeína a través de la YM que puede alcanzar hasta 300 mg diarios [32,34,46]. Al ser una actividad cultural y parte de la rutina diaria de estas poblaciones, el consumo de infusiones de YM continua incluso durante el período de gestación. Si bien se han realizado estudios sobre el efecto de estas infusiones sobre población adulta tanto en modelos animales como en humanos observando efectos beneficiosos en la salud ósea [62,88,108, 109], poco se sabe que influencia podrían tener sobre el proceso de gestación y el desarrollo óseo de la descendencia. Considerando que se han hallado diferentes efectos biológicos por parte de sus componentes en estas etapas, como un menor peso al nacer a causa del consumo de la cafeína [115], o un efecto neutro por parte de las infusiones de YM sobre el crecimiento del feto y de otras infusiones con niveles elevados de polifenoles en el desarrollo óseo [124,125], el presente trabajo tuvo como objetivo generar nuevos conocimientos que aporten a la información para la salud en la población.

En base a esto diseñamos un modelo experimental en ratas Sprague-Dawley a las que se les administraron infusiones de YM, con el objetivo de evaluar los efectos de estos tratamientos sobre el desarrollo óseo y los procesos de osificación endocondral e intramembranosa en las crías, se analizaron diversos parámetros mecánicos, estructurales, e histológicos en huesos con distintos tipos de osificación. Se realizó un enfoque integrador en el que se analizaron huesos largos y vertebras para evaluar el proceso de osificación endocondral, y hemimandíbulas para evaluar el proceso de osificación intramembranosa, además de incluir diferentes muestras para el análisis del tejido dentario.

En este trabajo de tesis se estudiaron los efectos de infusiones preparadas de dos formas diferentes, una fue preparada con 50 g de YM en 1 L de agua a 70 °C y otra preparada a partir de 100 g de YM en 1 L de agua a 90 °C, esta última con mayor capacidad antioxidante, contenido total de polifenoles y cafeína [88].

En primer lugar, se midió el volumen de líquidos consumidos durante el último día experimental en los 3 grupos y se observó una tendencia a un mayor consumo en ambos grupos tratados, alcanzando una diferencia significativa para el grupo YM+. Este mayor consumo de líquidos puede estar relacionado al efecto diurético causado por la YM, pero además podría estar asociado con el efecto estimulante generado por la cafeína que produce un aumento en la actividad física [36]. Por otro lado, se midieron parámetros de función hepática y renal. Si bien la concentración plasmática de GOT se halló incrementada en el grupo YM+ respecto al control, los valores se encuentran dentro del rango fisiológico normal. Finalmente, los valores de creatinina no presentaron diferencias significativas entre los grupos, indicando que la función renal normal no se vería afectada por los tratamientos [132].

Considerando el posible efecto negativo de la cafeína sobre el tejido óseo fue de interés en este trabajo analizar la dosis de cafeína administrada a cada grupo. El grupo YM recibió una infusión con una concentración de 0,32 g/L de cafeína (IC95% 0,3-0,41), lo que coincide con concentraciones utilizadas en trabajos realizados por otros grupos de investigación (0,31-0,34 g/L) y el consumo de cafeína diario promedio en la población argentina (0,288 g/L) [46]. Además, la dosis equivalente resultó similar a la estimada en humanos, con 7,43 mg/kg para el grupo YM y 20,2 mg/kg en el grupo YM+ respecto a los 5 mg/kg consumidos diariamente en humanos [41].

Consumo de YM sobre el crecimiento corporal

Se evaluó el peso de las crías durante los días 17, 25, 33 y 39 de vida para los 3 grupos. Se obtuvo un aumento con diferencia significativa en el peso a lo largo del tiempo para todos los grupos, acorde a la etapa de crecimiento, y no se hallaron diferencias al evaluar el peso según los tratamientos o el sexo de las crías para cada uno de los días analizados. Esto indica que las infusiones de YM empleadas no afectaron el crecimiento de los animales comparado con el grupo control.

Por este motivo los resultados se presentan sin discriminar por sexo dentro de los grupos experimentales. Además, si bien el sexo de las crías conduce a un dimorfismo sexual en el sistema esquelético que debe tenerse en cuenta en este tipo de experimentos, estas diferencias se evidencian principalmente en la etapa pospuberal

[133]. En ratas Sprague-Dawley hembras el inicio de la etapa puberal se da aproximadamente a partir del día 32-34 de vida, mientras que para los machos esto sucede a partir del día 45-48 [134], por lo que las ratas con 39 días de edad aún se encuentran en el periodo inicial de la etapa puberal. Por otro lado, la distribución de animales por grupo y la cantidad de piezas óseas obtenidas, no nos permitió tener un número suficiente de muestras para la evaluación estadística de los resultados separada por sexo para todas las variables analizadas. Estudios en los últimos años han demostrado que el dimorfismo sexual del esqueleto también estaría influenciado por el componente sexual cromosómico, no obstante, estos efectos fueron observados en ratones a partir de los 60 días de vida [135].

Como ya se mencionó, parte de los objetivos de este trabajo fue evaluar si la exposición a los componentes de la YM desde la concepción tendría un efecto sobre el peso de las crías y el tamaño de los huesos. Trabajos previos con dosis similares de cafeína a las de este ensayo (5 mg/kg de peso corporal) administradas durante la gestación y el periodo postnatal, no causó una disminución en el peso de las crías. Dosis mayores a 10 mg/kg tampoco causaron diferencias en el peso corporal, pero si se halló una disminución en el peso de las mandíbulas y en las medidas morfométricas de las hemimandíbulas y fémures [119]. Contrariamente en una revisión sistemática se halló que cada 100 mg de cafeína consumidos por día en humanos se aumenta un 13% el riesgo de bajo peso al nacer [116]. Sin embargo, en el resto de los estudios con dosis administradas de hasta 10 mg/kg de peso corporal, no se hallaron diferencias en el peso causadas por el consumo de cafeína, coincidiendo con nuestros resultados en los que tampoco se observaron diferencias en el peso a lo largo del experimento [119,121].

Sin embargo, en este trabajo al igual que en el experimento mencionado previamente, donde se utilizaron dosis de 10 mg/kg de peso corporal desde el periodo prenatal hasta los 56 días de vida de las crías, también se hallaron variaciones morfométricas en los huesos. En el caso del fémur tanto el ancho cortical como el área cortical se vieron significativamente disminuidos en el grupo YM en comparación con el grupo control, con una reducción del 9,5% en el ancho cortical y un 10,3% en el área cortical respectivamente. En el caso del radio del hueso, el perímetro perióstico, el diámetro

externo y el área total no hubo diferencias respecto al control para ninguno de los dos tratamientos evaluados, si bien el radio y los diámetros presentaron una tendencia con valores disminuidos en el grupo YM, no se alcanzaron una diferencia significativa, sin embargo, esta tendencia es geoméricamente consistente, ya que sí el área y el ancho cortical están disminuidos, el radio y los diámetros también deberían ser menores. Por otra parte, se halló una disminución en el área medular, el perímetro endóstico y el diámetro interno para el grupo YM+, representando un 13,4%, 9,7% y un 5,4% de cambio respectivamente, comparados con el grupo control.

Para la tibia se halló una disminución significativa en el grupo YM+ del diámetro que representa un 4,3% de cambio respecto al control, sin diferencias en el largo del hueso entre los diferentes grupos.

Finalmente, en la evaluación morfométrica de las vértebras L1 solo se observó una disminución significativa del ancho anteroposterior para el grupo YM, representando un 6,6% de cambio respecto del control.

Considerando los datos en conjunto y la evidencia previa de un estudio realizado en Brasil en 5300 mujeres que no encontró una asociación entre el crecimiento intrauterino del feto y el consumo de infusiones de YM [124], estas variaciones morfométricas no resultarían relevantes a nivel biológico. Por otro lado, llama la atención de que algunas variables mostraron diferencias significativas solo en el grupo YM, sin diferencias en el grupo YM+, algo no esperable si consideramos un efecto dosis dependiente de los tratamientos. Finalmente, las variaciones halladas podrían explicarse en el caso del fémur en el procesamiento de las muestras y la técnica empleada, donde las medidas realizadas fueron obtenidas posterior a los ensayos de biomecánica y el sitio evaluado puede haber sido variable.

Consumo de YM y propiedades biomecánicas del hueso

Se evaluó la resistencia biomecánica en diáfisis de fémur a través del ensayo de flexión a 3 puntos y no se hallaron diferencias significativas en la mayoría de las variables excepto por un aumento en la energía absorbida del grupo YM respecto al control, sin diferencias para el grupo YM+. Este ensayo se utilizó para obtener información sobre

las propiedades estructurales del hueso, evaluando principalmente el **tejido cortical**. Los datos obtenidos refuerzan el hecho de que las variaciones morfométricas obtenidas no repercuten en las propiedades biomecánicas del fémur, ya que este ensayo responde a cambios estructurales del tejido, pero también a cambios en la geometría.

Finalmente, tampoco se observó diferencias entre los grupos YM y el control en lo que respecta al momento de inercia que es un parámetro relacionado con la geometría del hueso que indica cómo está distribuida la masa alrededor del eje de flexión dando más información respecto a la relación entre la resistencia a la fractura y la geometría del hueso [136].

Coincidentemente, un experimento previo donde se evaluó el efecto de del consumo de polifenoles de arándanos en las propiedades biomecánicas de ratas de 5 meses ovariectomizadas, no se halló una variación en los parámetros, excepto por un mayor esfuerzo máximo en el grupo tratados, por lo que el efecto no se consideró biológicamente relevante [137].

Por su parte, la evaluación biomecánica del hueso **trabecular** se realizó a través del ensayo de compresión en vértebras donde los valores de energía absorbida, rigidez y fuerza máxima de la primera vértebra lumbar no presentaron diferencias significativas entre los grupos, indicando que el tratamiento tampoco afectaría las propiedades biomecánicas del tejido trabecular, coincidiendo con los resultados obtenidos previamente en nuestro grupo cuando se trataron ratas adultas con infusiones con una infusión única más diluida (25 g YM/L) a la empleada en este trabajo [108]. En este experimento las ratas expuestas a dietas bajas en calcio no resultaron con pérdida de hueso trabecular como era de esperar por la baja dieta en calcio, indicando que el efecto de una dieta baja en calcio es revertido con el consumo de YM en ratas adultas [108].

Consumo de YM y osificación endocondral

La osificación endocondral es un proceso biológico mediante el cual un molde compuesto por cartílago es reemplazado por tejido óseo durante el desarrollo

embrionario y el crecimiento posnatal. Este mecanismo es esencial para la formación de los huesos largos y ciertos huesos cortos del esqueleto. De esta manera, en este trabajo tibias, fémures y vértebras fueron evaluados.

Tanto en tibia como en vértebras se halló un volumen de fracción trabecular incrementado en los grupos tratados respecto al grupo control. Sin embargo, este incremento no se vio reflejado en la DMO obtenida para estas piezas. En el caso de las vértebras, este resultado junto a la información brindada por el ensayo de biomecánica donde tampoco se hallaron diferencias significativas entre los grupos, puede darnos un indicio de que, si bien el BV/TV se encuentra aumentado, este tejido aun no posee un grado de mineralización suficiente para que se vea reflejado a nivel de la DMO o en las propiedades biomecánicas de las trabéculas óseas. Esto nos lleva a pensar que la YM podría estar aumentando la producción de tejido óseo en los grupos tratados respecto al control, pero que por el estado de vida en el que se encuentran las crías, aun no sea tejido maduro y que por lo tanto no se encuentra totalmente mineralizado. De hecho, este fenómeno sucede en humanos durante la pubertad, donde la tasa de crecimiento en altura es tan acelerada que el proceso de mineralización se retrasa con respecto al crecimiento de los huesos, con desfases de hasta 8 meses para alcanzar la completa mineralización del tejido. también se ha observado una relación inversa entre la DMO y la actividad de remodelado óseo, ya que el tejido se halla menos mineralizado ante las elevadas tasas de recambio óseo [138,139].

La DMO fue determinada por medio de una técnica desarrollada y validada previamente en nuestro laboratorio [108]. Un factor a tener en cuenta es que la técnica utilizada no posee la misma resolución que equipos de microtomografía computarizada, por lo que podríamos en ciertas condiciones la resolución podría no ser suficiente para detectar cambios entre los grupos. Si bien en el caso de las vértebras no se detectaron cambios en la DMO, si hallamos una disminución en la DMO en la diáfisis y metáfisis de las tibias, así como un aumento en la BV/TV%. Los datos obtenidos sugieren que existe una influencia de estos tratamientos en el proceso de mineralización y síntesis en del tejido óseo trabecular durante la exposición al consumo de YM. Futuras estrategias para confirmar ese hecho serán realizar

microtomografías computarizadas de las piezas óseas, y un análisis de la fracción del tejido óseo mineralizado por medio de cortes histológicos mineralizados teñidos con Von Kossa donde se podrá obtener la fracción del tejido óseo sin mineralizar u osteoide respecto a la fracción mineralizada para obtener datos sobre el estado del proceso de mineralización en estas muestras [140].

En síntesis, una mayor fracción de volumen óseo trabecular tanto en metáfisis de tibia como en el cuerpo de las vértebras, sin cambios en las propiedades biomecánicas y con una menor DMO para el caso de las tibias, no tendría una implicación negativa respecto al efecto de los tratamientos, si no que se relacionaría con la estimulación de la síntesis ósea durante la etapa de crecimiento activo en la que se hayan las crías.

Teniendo en cuenta los resultados expuestos anteriormente, los tratamientos con YM podrían estimular la síntesis ósea durante la etapa de crecimiento. Esta mayor producción ósea se vería reflejada en la adultez resultando congruente con lo observado en ratas adultas donde el tratamiento con YM previene la pérdida ósea causada por dietas bajas en calcio [108].

Por otro lado, resultados recientes de nuestro grupo de investigación han demostrado un efecto positivo de los componentes de la YM y de un extracto de dicha infusión [88]. Los componentes de YM (rutina, ácido clorogénico y cafeína) afectaron positivamente a las células óseas, principalmente a las células pre-osteoblásticas. Además, el extracto acuoso de YM aumentó significativamente la viabilidad de las células MLO-Y4, MC3T3-E1 y MC3T3-E1 diferenciadas. Estos efectos positivos podrían explicarse por observaciones previas en las que se demostró que los polifenoles serían capaces de modular la expresión de factores de transcripción como Runx2, Osterix y el factor nuclear κ B, y podrían actuar sobre la señalización intracelular como las proteínas MAPK y BMP y los receptores OPG/RANKL afectado las células óseas, en este caso promoviendo la función osteoblástica [141].

Crecimiento aposicional de huesos largos:

Respecto al crecimiento en el diámetro del hueso cortical, los ensayos de histomorfometría dinámica realizados en diáfisis de huesos largos no hallaron diferencias entre los grupos tratados y el control en la tasa de aposición mineral, o en

tasa de formación ósea durante los lapsos evaluados. Esto es llamativo considerando el hecho de que tanto en fémur como en tibia se observaron disminuciones morfométricas en diámetro, sin embargo, esto puede explicarse por el hecho de que en este ensayo solo fueron evaluados lapsos de tiempo determinados, por lo que estos cambios morfométricos inducidos por los tratamientos podrían estar ocurriendo en etapas previas a las analizadas. En síntesis, la exposición a la YM podría estar afectando el crecimiento aposicional con una disminución en el diámetro en los huesos largos durante etapas tempranas del desarrollo y crecimiento.

Consumo de YM y osificación intramembranosa

La osificación intramembranosa es un proceso de formación ósea que ocurre directamente sobre el tejido mesenquimatoso sin la participación de un modelo cartilaginoso. Este tipo de desarrollo ocurre de los huesos planos del cráneo, la clavícula y la mandíbula, sobre la cual se realizaron los análisis.

Durante la evaluación de medidas morfométricas en hemimandíbula no se hallaron cambios significativos a nivel macroscópico en ninguna de las variables evaluadas para los diferentes grupos. Contrario a nuestros hallazgos, en trabajos previos donde se evaluaron dosis mayores (10 mg de cafeína por cada kg de peso corporal) desde la gestación hasta el día 56 de vida de las crías, si encontraron diferencias, con disminuciones en las medidas morfométricas de la hemimandíbula [121]. En congruencia a estos resultados, tampoco se hallaron diferencias en la rigidez durante los ensayos de flexión a 3 puntos. Esta variable se halla relacionada a la geometría y la distribución del material óseo que como se mencionó previamente, no presentaron cambios en este ensayo [142].

Por otro lado, se hallaron mayores valores de fuerza máxima soportada, fuerza de fractura y energía absorbida para el grupo YM+ comparado con el control. La energía absorbida se encuentra relacionada con la composición y la integridad del tejido óseo [142], una mayor energía absorbida puede estar indicando que los tratamientos mejorarían la calidad del tejido óseo sin afectar los parámetros morfométricos de los huesos, lo cual es coincidente a los resultados obtenidos a nivel del tejido trabecular

alveolar en la mandíbula, donde se evidenció un aumento del 15,9% en el BV/TV% para el grupo YM+ indicando una mayor fracción de tejido óseo trabecular, y por lo tanto una mayor producción de tejido óseo por parte de las células. Finalmente, en el ensayo de DMO realizado en cóndilo mandibular no se observaron diferencias entre los grupos.

Los resultados hallados indicarían que los tratamientos con YM afectarían positivamente el proceso de osificación intramembranosa, promoviendo un beneficio a nivel estructural, sin causar variaciones morfométricas o en la DMO en los huesos que presentan este patrón de osificación.

En base a los resultados obtenidos y experimentos realizados por otros grupos donde la estructura y composición del tejido dentarios se vio afectado por la exposición de ratas a la cafeína en dosis mayores a 10 mg/kg de peso corporal [120,123], se continuo este trabajo de investigación estudiando la calidad del tejido dentario para poder esclarecer los hallazgos a nivel del hueso mandibular.

Consumo de YM y tejido dentario

Durante el análisis realizado en la morfometría de la mandíbula en radiografías digitalizadas se decidió evaluar la medida comprendida desde el inicio del primer molar hasta el límite posterior del tercer molar ya que el contraste de estas estructuras permitía obtener medidas consistentes. Los resultados obtenidos fueron llamativos ya que para ambos grupos tratados se obtuvo una disminución en la longitud evaluada. De esta manera se procedió a realizar diferentes ensayos para poder establecer el posible efecto de estos tratamientos sobre el desarrollo y composición de los molares. Sobre las mismas radiografías se realizó una evaluación de la DMO sobre los molares, y se observó una disminución en los valores hallados para el grupo YM+. Si bien como se mencionó anteriormente este tipo de análisis no tienen una resolución ideal para poder establecer resultados precisos, esto es coincidente con lo hallado en estudio previos donde se evaluó el efecto de la cafeína sobre piezas dentarias y se encontró que la exposición prenatal a este compuesto afectaría la formación normal del esmalte del primer molar durante la etapa fetal [123], dándonos un indicio de que la composición mineral del tejido dentario de los molares podría estar siendo afectado

por acción de los compuestos presente en las infusiones. Por otra parte, se realizó un análisis histológico sobre el primer molar con el objetivo de evaluar la estructura y crecimiento del tejido, por lo que se obtuvo la densidad de odontoblastos (encargados de producir la dentina) en la capa odontoblástica, el ancho de la dentina y la pre-dentina, así como la altura del hueso alveolar interradicular, y no se hallaron diferencias significativas en ninguna de estas variables entre los grupos tratados y el control. Al analizar la tasa de formación ósea y la tasa de aposición mineral por medio del ensayo de histomorfometría dinámica, no se hallaron diferencia entre los grupos, lo cual nos indicaría que al menos durante las etapas evaluadas no hay diferencias en el crecimiento de los molares, indicando que el consumo de YM durante el periodo de vida evaluado, no afectaría el desarrollo normal de los molares, pero podría influir en la composición mineral de los molares. Sería adecuado en análisis futuros incluir la evaluación del componente mineral del tejido para comprobar efectivamente, si hay cambios significativos en la DMO de los molares ante una exposición a YM.

Consumo de YM y estado oxidativo

En muestras de plasma se determinaron proteínas totales al día 17 y 39 de vida de las crías. Para todos los grupos se observó un aumento de proteínas plasmáticas al comparar la concentración entre ambos días (17 vs 39), un resultado esperable considerando que las crías se encuentran en una etapa de crecimiento activo que demanda una mayor síntesis de proteínas [143]. Al comparar la concentración entre los grupos, para el día 17 se observa una mayor concentración de proteínas en el grupo YM+ respecto al control, y para el día 39 se hallaron valores disminuidos en ambos grupos tratados respecto al control. Resultados similares se obtuvieron en un estudio realizado en terneros donde la dieta fue suplementada con YM [144]. Sin embargo, no está clara la causa de este hallazgo, por un lado, podría ser debido al mayor consumo de líquido por parte de los grupos tratados, o bien porque el hígado estaría sintetizando una menor cantidad de proteínas al encontrarse con una alta demanda metabólica en las crías tratadas para procesar la cafeína y otros componentes de la YM presente en el organismo.

Sin embargo, a diferencia de lo que pasa *in vivo*, estudios en mujeres postmenopáusicas que consumieron más de un litro de mate al día no presentaron menores niveles de proteínas en plasma cuando se las comparo con el control [62].

Para la evaluar el estado oxidativo del plasma, se determinó la capacidad antioxidante total para los días 17 y 39 de vida de las crías y se halló una tendencia con aumento en los valores, siendo significativo en ambos días para el tratamiento YM+ respecto al control. Coincidente con estudios previos, esto nos revela que los tratamientos con infusiones de YM promueven un efecto antioxidante en el organismo [68,69]. Esto representaría un beneficio para tejido óseo ya que el sistema presenta la capacidad de contrarrestar el efecto de los oxidantes, promoviendo de esta manera la diferenciación de celular, el proceso de mineralización y disminuyendo la actividad osteoclástica [73].

Respecto a los polifenoles totales y lipoperoxidación oxidativa, las pruebas utilizadas para determinarlos no arrojaron diferencias significativas entre los grupos. Sin embargo, trabajos previos han demostrado la influencia beneficiosa de estas infusiones sobre el perfil oxidativo en plasma, observando una disminución en los valores de TBARS tanto en ratas adultas tratadas durante 3 semanas con infusiones preparadas con 20g de YM en 1L de agua [145], y en ratas destetadas tempranamente en el que se halló un aumento de lipoperoxidación que fue contrarrestado por los tratamientos con infusiones preparadas con extractos de YM liofilizada [146]. Las diferencias observadas podrían explicarse por la diferente edad de los grupos evaluados en este trabajo y los mencionados, y porque debe tenerse en cuenta que en el caso de TBARS el ensayo posee baja especificidad para MDA, dando lugar a resultados inespecíficos en ciertas situaciones que deben evaluarse teniendo en cuenta el estado oxidativo general del sistema [147].

El estado oxidativo general del organismo debe evaluarse de manera que se tengan en todas las variables observadas. En base a esta consideración y la evidencia presentada en trabajos previos donde se demostró un beneficio en el estado oxidativo de los parámetros plasmáticos [68,69,88], podemos decir que el tratamiento con YM promueve un estado anti-oxidativo en el organismo.

11 Conclusiones

- Los tratamientos con infusiones de YM promueven un efecto antioxidante en el organismo.
- La YM podría estar aumentando la producción de tejido óseo por medio del proceso de osificación endocondral del hueso trabecular, con un desfase en el proceso de mineralización.
- La exposición a la YM podría afectar negativamente el crecimiento aposicional de los huesos largos en etapas tempranas del desarrollo y crecimiento.
- Los tratamientos con YM afectarían positivamente el proceso de osificación intramembranosa, promoviendo un beneficio nivel estructural, sin causar variaciones morfométricas en los huesos con este patrón de osificación.
- El consumo de YM durante estas etapas de crecimiento no afectaría el desarrollo normal de los molares, pero podría estar afectando la composición mineral.

Finalmente, los hallazgos de este estudio evidencian que la exposición a YM durante la etapa embrionaria y postnatal, no produciría un efecto negativo biológicamente relevante a nivel del tejido cortical, mientras que se observa un incremento del tejido óseo trabecular que a largo plazo podría ser beneficioso para la salud ósea de las crías.

12 Citas Bibliográficas

- 1 Burr DB. Chapter 1: Bone morphology and organization. Burr DB, Allen MR. Basic and Applied Bone Biology. Elsevier Inc, 2013,
- 2 Standring S, ed. Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice. Forty-first edition. Elsevier Limited; 2016,
- 3 Ross MH, Pawlina W. Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology. 8th ed. Ciudad: LWW; 2018, ISBN-13: 978-1496383426,
- 4 Meruane, M., Smok, C., & Rojas, M. (2012). Desarrollo de Cara y Cuello en Vertebrados. International Journal of Morphology, 30(4), 1373–1388,
- 5 Gómez de Ferraris ME, Campos Muñoz A. "Bases conceptuales y terminológicas." Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental, capítulo 1, 4ª ed., noviembre 2019
- 6 Gheron Robey P, Fedarko NS, Hefferan TE, Bianco P, Vetter UK, Grzesik W et al. Structure and molecular regulation of bone matrix proteins. J Bone Miner Res 1993;8:483-7,
- 7 Schonau E, Rauch F. Markers of bone and collagen metabolism. Problems and perspectives in Pediatrics. Horm Res 1997;48:50-9,
- 8 Nahian A, Davis DD. Histology, Osteoprogenitor Cells. [Updated 2022 Dec 29]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559160/>
- 9 Rutkovskiy A, Stenslkken KO, Vaage IJ. Osteoblast Differentiation at a Glance. Med Sci Monit Basic Res. 2016 Sep 26;22:95-106,
- 10 Brown, J. L., Kumbar, S. G., & Laurencin, C. T. (2013). Bone Tissue Engineering. Biomaterials Science: An Introduction to Materials: Third Edition, 1194–1214,
- 11 Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simes MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. Biomed Res Int. 2015; 2015:421746,
- 12 Tresguerres, F. G. F., Torres, J., Lpez-Quiles, J., Hernández, G., Vega, J. A., & Tresguerres, I. F. (2020). The osteocyte: A multifunctional cell within the bone. Annals of Anatomy, 227, 151422,
- 13 Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. Bone 2008; 42:606-15,
- 14 Plotkin LI. Bisfosfonatos, conexinas y apoptosis de osteoblastos y osteocitos: nuevo mecanismo de accin con implicancias teraputicas. Actual Osteol 2010; 6(1):16-23,

-
- 15 Yahara Y, Nguyen T, Ishikawa K, Kamei K, Alman BA. The origins and roles of osteoclasts in bone development, homeostasis and repair. *Development*. 2022 Apr 15;149(8):dev199908,
 - 16 Silver IA, Murrills RJ, Etherington DJ. Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp Cell Res* 1988; 175(2):266-76,
 - 17 Teitelbaum SL. RANKing c-Jun in osteoclast development. *J Clin Invest*. 2004;114(4):463-5,
 - 18 Rudnicki MA, Williams BO. Wnt signaling in bone and muscle. *Bone*, 80: 60-66, 2015
 - 19 Canalis E, Giustina A, Bilezikian JP. Mechanisms of Anabolic Therapies for Osteoporosis. *N Engl J Med* 2007; 357(9):905-16,
 - 20 Krishnan V, Bryant HU, MacDougald A. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest* 2006; 226(5):1202-9,
 - 21 Rosen CJ, Rosen V, Keen RW, Mccauley LK. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 8° Ed. Willey-Blackwell. 2013,
 - 22 Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423:337-42,
 - 23 Xu J, Yu L, Liu F, Wan L, Deng Z. The effect of cytokines on osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling in osteoporosis: a review. *Front Immunol*. 2023 Jul 5;14:1222129,
 - 24 Blumer MJF. Bone tissue and histological and molecular events during development of the long bones. *Ann Anat*. 2021 May;235:151704,
 - 25 Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004; 22(4):233-41,
 - 26 Goswami R. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. *Indian J Med Res*. 2016 Sep;144(3):489–90,
 - 27 Fu R, Liu C, Yan Y, Li Q, Huang RL. Bone defect reconstruction via endochondral ossification: A developmental engineering strategy. *J Tissue Eng*. 2021 Mar 30;12:20417314211004211,
 - 28 Parfitt, A.M. (2003). *New Concepts of Bone Remodeling: A Unified Spatial and Temporal Model with Physiologic and Pathophysiologic Implications*. In: Agarwal, S.C., Stout, S.D. (eds) *Bone Loss and Osteoporosis*. Springer, Boston, MA.
 - 29 Burr DB. Chapter 5: Bone Growth, Modeling, and Remodeling. Burr DB, Allen MR. *Basic and Applied Bone Biology*. Elsevier Inc, 2013,
 - 30 Reznikov N, Shahar R, Weiner S. Bone hierarchical structure in three dimensions. *Acta Biomater*. 2014; 10(9):3815-26,
 - 31 Robey PG, Boskey AL. Extracellular matrix and biomineralization of bone. Cap 3, Pag 12-19, *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. 6ª Edición. 2006,

-
- 32 Diputados de Uruguay. Plantación de yerba mate. Disponible en: <http://www.diputados.gub.uy/noticias/plantacion-de-yerba-mate/#:~:text=En%20el%20informe%20se%20se%C3%B1ala,mate%20per%20c%C3%A1pita%20al%20a%C3%B1o>.
- 33 INYM. Informe del sector yerbatero. Abril 2024, Disponible en: <https://inym.org.ar/descargar/publicaciones/estadisticas/2024,html>.
- 34 Gawron-Gzella A, Chanaj-Kaczmarek J, Cielecka-Piontek J. Yerba Mate-A Long but Current History. *Nutrients*. 2021 Oct 21;13(11):3706,
- 35 Instituto Nacional de la Yerba Mate (INYM). Récord histórico: la yerba mate confirmó su buen momento y el consumo superó los 325 millones de kilos en 2023 [Internet].
- 36 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): R138-51,
- 37 Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Revisión Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutr Hosp*, 27(1), 76–89,
- 38 Heck CI, Schmalko M, Gonzalez de Mejia E. Effect of growing and drying conditions on the phenolic composition of mate teas (*Ilex paraguariensis*). *J Agric Food Chem*. 2008 Sep 24;56(18):8394-403,
- 39 Gugliucci A, Bastos DH. Chlorogenic acid protects paraoxonase 1 activity in high density lipoprotein from inactivation caused by physiological concentrations of hypochlorite. *Fitoterapia*. 2009; 80(2):138-42,
- 40 Butiuk, A. P., Martos, M. A., Adachi, O., & Hours, R. A. (2015). Study of the chlorogenic acid content in yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): Effect of plant fraction, processing step and harvesting season. *Journal of Dermatological Science*, 3, 27–33,
- 41 Mazzafera, P. (1997). Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake. *Food Chemistry*, 60(1), 67–71,
- 42 D'Archivio M, Filesi C, Vari R, Scazzocchio B, Masella R. Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *Int J Mol Sci*. 2010 Mar 31;11(4):1321-42,
- 43 Stromsnes K, Lagzdina R, Olaso-Gonzalez G, Gimeno-Mallench L, Gambini J. Pharmacological Properties of Polyphenols: Bioavailability, Mechanisms of Action, and Biological Effects in In Vitro Studies, Animal Models, and Humans. *Biomedicines*. 2021 Aug 23;9(8):1074,

-
- 44 Kunihiro, A. G., Luis, P. B., Frye, J. B., Chew, W., Chow, H. H., Schneider, C., & Funk, J. L. (2020). Bone-Specific Metabolism of Dietary Polyphenols in Resorptive Bone Diseases. *Molecular Nutrition & Food Research*, 64(14), 2000072,
- 45 Carregosa D, Silva IP, Teixeira C, Baltazar M, García-Villalba R, Vieira FS, Marçal M, Tuna M, Santos CN. (Poly)phenols in Human Breast Milk and their health benefits for the newborn. *medRxiv*. 2023,03,27,23287781
- 46 Olmos V, Bardoni N, Ridolfi AS, Villaamil Lepori EC. Caffeine levels in beverages from Argentina's market: application to caffeine dietary intake assessment. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*. 2009 Mar;26(3):275-81,
- 47 Knapik, J. J., Steelman, R. A., Trone, D. W., Farina, E. K., & Lieberman, H. R. (2022). Prevalence of caffeine consumers, daily caffeine consumption, and factors associated with caffeine use among active duty United States military personnel. *Nutrition Journal*, 21(1), 1–19,
- 48 Panzl, M. V., Menchaca, D., Rodríguez-Haralambides, A. Analysis of polyphenols and xanthines in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) infusions by high-pressure extraction and ultra-high performance liquid chromatography. *Applied Food Research*, vol. 2, no. 2, 2022, article 100192,
- 49 Institute of Medicine (US) Committee on Military Nutrition Research. Caffeine for the Sustainment of Mental Task Performance: Formulations for Military Operations. Washington (DC): National Academies Press (US); 2001,
- 50 Mateos, R., Baeza, G., Martínez-López, S., Sarriá, B., & Bravo, L. (2017). LC–MSn characterization of saponins in mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil) and their quantification by HPLC-DAD. *Journal of Food Composition and Analysis*, 63, 164–170,
- 51 Burris KP, Harte FM, Davidson PM, Stewart CN, Zivanovic S. Composition and bioactive properties of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.): a review. *Chilean Journal of Agricultural Research*. 72, 268- 274,
- 52 Markowicz Bastos DH, Moura de Oliveira D, Lobato Teixeira Matsumoto R, de Oliveira Carvalho P, Lima Ribeiro M. Pharmacological Properties, Research and Biotechnology. [Online]. Available: www.isiknowledge.com
- 53 Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: minireview. *J Ethnopharmacol*. 2011; 136(3):378-84,
- 54 Rząsa-Duran E, Kryczyk-Poprawa A, Drabicki D, Podkowa A, Sułkowska-Ziaja K, Szewczyk A, Kała K, Opoka W, Zięba P, Fidurski M, Muszyńska B. Yerba Mate as a Source of Elements

-
- and Bioactive Compounds with Antioxidant Activity. Antioxidants (Basel). 2022 Feb 12;11(2):371,
- 55 Dickel ML, Rates SM, Ritter MR. Plants popularly used for losing weight purposes in Porto Alegre, South Brazil. J Ethnopharmacol. 2007; 109(1):60-71,
- 56 Bellido T, Jilka RL, Boyce BF, Girasole G, Broxmeyer H, Dalrymple SA, Murray R, Manolagas SC. Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis and bone mass by androgens: the role of the androgen receptor. J Clin Invest 1995; 95:2886-89,
- 57 Messina D, Soto C, Méndez A, Corte C, Kemnitz M, Avena V, Del Balzo D, Pérez Elizalde R. Efecto hipolipemiante del consumo de mate en individuos dislipidémicos. Nutr Hosp 2015; 31(5):2131-9,
- 58 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 (Silver Spring) 2009; 17(12):2127-33,
- 59 Gambero A, Ribeiro ML. The positive effects of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) in obesity. Nutrients 2015; 7(2):730-50,
- 60 Ferreira, Fernando & Vazquez, Alvaro & Güntner, Carlos & Moyna, Patrick. (1997). Inhibition of the passive diffusion of cholic acid by *Ilex paraguariensis* St. Hil. saponins. Phytotherapy Research. 11, 79 - 81,
- 61 Uecker, J. N., Schneider, J. P., Cerqueira, J. H., Rincón, J. A. A., Campos, F. T., Schneider, A., Barros, C. C., Andreazza, R., Jaskulski, I. B., & Pieniz, S. (2019). *Ilex paraguariensis* extract prevents body weight gain in rats fed a high-fat diet. Food Science and Technology (Brazil), 39(3), 620–626,
- 62 da Veiga DTA, Bringhenti R, Copes R, Tatsch E, Moresco RN, Comim FV, Premaor MO. Protective effect of yerba mate intake on the cardiovascular system: a post hoc analysis study in postmenopausal women. Braz J Med Biol Res. 2018;51(6):e7253,
- 63 Quintanar-Escorza, M. & Calderon, Victor. (2009). LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL. BASES Y APLICACIONES. Revista de Educación Bioquímica. 28, 89-101,
- 64 Domazetovic V, Marcucci G, Iantomasi T, Brandi ML, Vincenzini MT. Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants. Clin Cases Miner Bone Metab. 2017 May-Aug;14(2):209-216,
- 65 Carocho M, Ferreira IC. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Food Chem Toxicol. 2013 Jan;51:15-25,

-
- 66 Dabulici CM, Sârbu I, Vamanu E. The Bioactive Potential of Functional Products and Bioavailability of Phenolic Compounds. *Foods*. 2020 Jul 18;9(7):953,
- 67 Pecorari M, Villaño D, Testa MF, Schmid M, Serafini M. Biomarkers of antioxidant status following ingestion of green teas at different polyphenol concentrations and antioxidant capacity in human volunteers. *Mol Nutr Food Res*. 2010 Jul;54 Suppl 2:S278-83,
- 68 Matsumoto RL, Bastos DH, Mendonça S, Nunes VS, Bartchewsky W, Ribeiro ML, de 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 Mar 11;57(5):1775-80,
- 69 Boaventura BC, Di Pietro PF, Stefanuto A, Klein GA, de Morais EC, de 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 Jun;28(6):657-64,
- 70 Lean JM, Jagger CJ, Kirstein B, Fuller K, Chambers TJ. Hydrogen peroxide is essential for estrogen-deficiency bone loss and osteoclast formation. *Endocrinology*. 2005;146:728–735
- 71 Lean JM, Davies JT, Fuller K, Jagger CJ, Kirstein B, Partington GA, Urry ZL, Chambers TJ. A crucial role for thiol antioxidants in estrogen-deficiency bone loss. *J Clin Invest*. 2003;112:915–923,
- 72 Baek KH, Oh KW, Lee WY, Lee SS, Kim MK, Kwon HS, Rhee EJ, Han JH, Song KH, Cha BY, Lee KW, Kang MI. 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 Sep;87(3):226-35,
- 73 Romagnoli C, Marcucci G, Favilli F, Zonefrati R, Mavilia C, Galli G, Tanini A, Iantomasi T, Brandi ML, Vincenzini MT. Role of GSH/GSSG redox couple in osteogenic activity and osteoclastogenic markers of human osteoblast-like SaOS-2 cells. *FEBS J*. 2013;280:867–879,
- 74 Jun JH, Lee SH, Kwak HB, Lee ZH, Seo SB, Woo KM, Ryoo HM, Kim GS, Baek JH. N-acetylcysteine stimulates osteoblastic differentiation of mouse calvarial cells. *J Cell Biochem*. 2008;103:1246–1255,
- 75 Reid IR, Ibbertson HK. Evidence for decreased tubular reabsorption of calcium in glucocorticoid-treated asthmatics. *Horm Res* 1987; 27:200-4,
- 76 Ueno T, Yamada M, Igarashi Y, Ogawa T. N-acetyl cysteine protects osteoblastic function from oxidative stress. *J Biomed Mater Res A*. 2011;99:523–531,
- 77 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-e42,

-
- 78 Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL. Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57:385-409,
- 79 Shen CL, Yeh JK, Cao JJ, Chyu MC, Wang JS. Green tea and bone health: Evidence from laboratory studies. *Pharmacol Res.* 2011;64(2):155–161,
- 80 Zhang J, Lazarenko OP, Blackburn ML, Badger TM, Ronis MJ, Chen JR. Blueberry consumption prevents loss of collagen in bone matrix and inhibits senescence pathways in osteoblastic cells. *Age (Dordr)* 2013;35:807–820,
- 81 Shen CL, Yeh JK, Cao JJ, Tatum OL, Dagda RY, Wang JS. Green tea polyphenols mitigate bone loss of female rats in a chronic inflammation-induced bone loss model. *J Nutr Biochem.* 2010;21:968–974,
- 82 Wauquier F, Leotoing L, Coxam V, Guicheux J, Wittrant Y. Oxidative stress in bone remodelling and disease. *Trends Mol Med.* 2009 Oct;15(10):468-77,
- 83 Sendur OF, Turan Y, Tastaban E, Serter M. Antioxidant status in patients with osteoporosis: a controlled study. *Joint Bone Spine.* 2009;76:514–8,
- 84 Hall SL, Greendale GA. The relation of dietary vitamin C intake to bone mineral density: results from the PEPI study. *Calcif Tissue Int.* 1998;63:183–189,
- 85 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;86:1243–1247,
- 86 Zhou Y, Guan XX, Zhu ZL, Guo J, Huang YC, Hou WW, Yu HY. Caffeine inhibits the viability and osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Br J Pharmacol.* 2010 Dec;161(7):1542-52,
- 87 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,
- 88 Villarreal L, Sanz N, Fagalde FB, D’Andrea F, Lombarte M, Rico MJ, Rozados VR, Scharovsky OG, Plotkin LI, Di Loreto VE, Brun LR. Increased Osteoblastic and Osteocytic in Vitro Cell Viability by Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*). *J Bone Metab.* 2024;31(2):101-113,
- 89 Duarte PM, Marques MR, Bezerra JP, Bastos MF. The effects of caffeine administration on the early stage of bone healing and bone density A histometric study in rats. *Arch Oral Biol.* 2009 Aug;54(8):717-22,
- 90 Wikoff D, Welsh BT, Henderson R, Brorby GP, Britt J, Myers E, Goldberger J, Lieberman HR, O'Brien C, Peck J, Tenenbein M, Weaver C, Harvey S, Urban J, Doepker C. Systematic review of the potential adverse effects of caffeine consumption in healthy adults, pregnant women, adolescents, and children. *Food Chem Toxicol.* 2017 Nov;109(Pt 1):585-648,

-
- 91 Harris SS, Dawson-Hughes B. Caffeine, and bone loss in healthy postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 1994; 60:573-8,
- 92 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,
- 93 Ilich JZ, Brownbill RA, Tamborini L, Crncevic-Orlic Z. To drink or not to drink: how are alcohol, caffeine and past smoking related to bone mineral density in elderly women? *J Am Coll Nutr* 2002; 21:536-44,
- 94 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,
- 95 Hallström H, Wolk A, Glynn A, Michaëlsson K. Coffee, tea and caffeine consumption in relation to osteoporotic fracture risk in a cohort of Swedish women. *Osteoporos Int*. 2006;17(7):1055-64,
- 96 Hallström H, Byberg L, Glynn A, Lemming EW, Wolk A, Michaëlsson K. Long-term coffee consumption in relation to fracture risk and bone mineral density in women. *Am J Epidemiol*. 2013 Sep 15;178(6):898-909,
- 97 Barbour KE, Zmuda JM, Strotmeyer ES, Horwitz MJ, Boudreau R, Evans RW, Ensrud KE, Petit MA, Gordon CL, Cauley JA; Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) Research Group. Correlates of trabecular and cortical volumetric bone mineral density of the radius and tibia in older men: the Osteoporotic Fractures in Men Study. *J Bone Miner Res*. 2010 May;25(5):1017-28,
- 98 Rapuri PB, Gallagher JC, Kinyamu HK, Ryschon KL. Caffeine intake increases the rate of bone loss in elderly women and interacts with vitamin D receptor genotypes. *Am J Clin Nutr*. 2001 Nov;74(5):694-700,
- 99 Hallström H, Melhus H, Glynn A, Lind L, Syvänen AC, Michaëlsson K. Coffee consumption and CYP1A2 genotype in relation to bone mineral density of the proximal femur in elderly men and women: a cohort study. *Nutr Metab (Lond)*. 2010 Feb 22;7:12,
- 100 Nicolin V, De Tommasi N, Nori SL, Costantinides F, Berton F, Di Lenarda R. Modulatory Effects of Plant Polyphenols on Bone Remodeling: A Prospective View From the Bench to Bedside. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Jul 23;10:494,
- 101 Kwak SC, Lee C, Kim JY, Oh HM, So HS, Lee MS, Rho MC, Oh J. Chlorogenic acid inhibits osteoclast differentiation and bone resorption by down-regulation of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand- induced nuclear factor of activated T cells c1 expression. *Biol Pharm Bull*. 2013; 36(11):1779-86,

-
- 102 Hu X, Wang L, He Y, Wei M, Yan H, Zhu H. Chlorogenic Acid Promotes Osteogenic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells Through Wnt Signaling. *Stem Cells Dev.* 2021 Jun 15;30(12):641-650,
- 103 Messina M. A brief historical overview of the past two decades of soy and isoflavone research. *J Nutr.* (2010) 140:1350S–4S.
- 104 Welch AA, Hardcastle AC. The Effects of Flavonoids on Bone. *Curr Osteoporos Rep* 2014; 12, 205-10,
- 105 Hardcastle AC, Aucott L, Reid DM, Macdonald HM. Associations between dietary flavonoid intakes and bone health in a Scottish population. *J Bone Miner Res.* 2011;26(5):941–7,
- 106 Chun OK, Lee SG, Wang Y, Vance T, Song WO. Estimated flavonoid intake of the elderly in the United States and around the world. *J Nutr Gerontol Geriatr.* 2012;31(3):190–205,
- 107 Welch A, MacGregor A, Jennings A, Fairweather-Tait S, Spector T, Cassidy A. Habitual flavonoid intakes are positively associated with bone mineral density in women. *J Bone Miner Res.* 2012;27(9):1872–8,
- 108 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(5):527-34,
- 109 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,
- 110 da Veiga DTA, Bringhenti R, Bolignon AA, Tatsh E, Moresco RN, Comim FV, Premaor MO. The yerba mate intake has a neutral effect on bone: A case-control study in postmenopausal women. *Phytother Res.* 2018; 32(1):58-64,
- 111 Christian MS, Brent RL. Teratogen update: evaluation of the reproductive and developmental risks of caffeine. *Teratology.* 2001 Jul;64(1):51-78,
- 112 Caffeine for the Sustainment of Mental Task Performance. (2001). <http://www.nap.edu/catalog/10219.html>
- 113 Chen L-W, Fitzgerald R, Murrin CM, Mehegan J, Kelleher CC, Phillips CM. Associations of maternal caffeine intake with birth outcomes: results from the Lifeways Cross Generation Cohort Study. *Am J Clin Nutr* 2018;108:1301-8,
- 114 Van Dam RM, Hu FB, Willett WC. Coffee, Caffeine, and Health. *N Engl J Med.* 2020 Jul 23;383(4):369-378,
- 115 Nehlig A. Interindividual differences in caffeine metabolism and factors driving caffeine consumption. *Pharmacol Rev* 2018;70:384-411

-
- 116 Chen L-W, Wu Y, Neelakantan N, Chong MF-F, Pan A, van Dam RM. Maternal caffeine intake during pregnancy is associated with risk of low birth weight: a systematic review and dose-response meta-analysis. *BMC Med* 2014;12:174
- 117 Klebanoff MA, Levine RJ, DerSimonian R, Clemens JD, Wilkins DG. Maternal serum paraxanthine, a caffeine metabolite, and the risk of spontaneous abortion. *N Engl J Med*. 1999 Nov 25;341(22):1639-44,
- 118 Drugs and Lactation Database (LactMed®) [Internet]. Bethesda (MD): National Institute of Child Health and Human Development; 2006—. Caffeine. 2024 Jan 15,
- 119 Nakamoto T, Grant S, Yazdani M. The effects of maternal caffeine intake during pregnancy on mineral contents of fetal rat bone. *Res Exp Med (Berl)*. 1989;189(4):275-80,
- 120 Valdes M, Shaye R, Joseph F Jr, Nakamoto T. The effects of caffeine on the maxillary composition in the newborn rat. *Calcif Tissue Int*. 1992 Feb;50(2):165-8,
- 121 Schneider PE, Miller HI, Nakamoto T. Effects of caffeine intake during gestation and lactation on bones of young growing rats. *Res Exp Med (Berl)*. 1990;190(2):131-6,
- 122 Reis AM, Ribeiro LG, Ocarino Nde M, Goes AM, Serakides R. Osteogenic potential of osteoblasts from neonatal rats born to mothers treated with caffeine throughout pregnancy. *BMC Musculoskelet Disord*. 2015 Feb 4;16(1):10,
- 123 Falster AU, Yoshino S, Hashimoto K, Joseph F Jr, Simmons WB, Nakamoto T. The effect of prenatal caffeine exposure on the enamel surface of the first molars of newborn rats. *Arch Oral Biol*. 1993 May;38(5):441-7,
- 124 Santos IS, Matijasevich A, Valle NC. Mate drinking during pregnancy and risk of preterm and small for gestational age birth. *J Nutr*. 2005 May;135(5):1120-3,
- 125 Yumol JL, McAlpine MD, Ward WE. Maternal Exposure to Red Rooibos Does Not Alter Bone Development in Male or Female Sprague-Dawley Rat Offspring. *Curr Dev Nutr*. 2023 Mar 30;7(5):100071,
- 126 Agoston DV. How to Translate Time? The Temporal Aspect of Human and Rodent Biology. *Front Neurol*. 2017 Mar 17;8:92,
- 127 Percie du Sert N, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M, Garner P, Holgate ST, Howells DW, Hurst V, Karp NA, Lazic SE, Lidster K, MacCallum CJ, Macleod M, Pearl EJ, Petersen OH, Rawle F, Reynolds P, Rooney K, Sena ES, Silberberg SD, Steckler T, Würbel H. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol*. 2020 Jul 14;18(7):e3000411,

-
- 128 Eratalay K, Simmons J, El-moftyK, Rosenberc D, Nelson W, Haus E, HalbergF. Bone growth in the rat mandible following every-day or alternate-day methylprednisolone treatment schedules. Arch's oral Biol1981; 26:769-777,
- 129 Serafini M, Maiani G, Ferro-Luzzi A. Alcohol-free red wine enhances plasma antioxidant capacity in humans. J Nutr 1998; 128(6):1003-1007,
- 130 Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979; 95:351-8,
- 131 Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. Anal Biochem 1996; 239: 70–76,
- 132 Petterino C, Argentino-Storino A. Clinical chemistry and haematology historical data in control Sprague-Dawley rats from pre-clinical toxicity studies. Exp Toxicol Pathol. 2006 Jan;57(3):213-9,
- 133 Sharma A, Michels LV, Pitsillides AA, Greeves J, Plotkin LI, Cardo V, Sims NA, Clarkin CE. Sexing Bones: Improving Transparency of Sex Reporting to Address Bias Within Preclinical Studies. J Bone Miner Res. 2023 Jan;38(1):5-13,
- 134 Lewis EM, Barnett JF Jr, Freshwater L, Hoberman AM, Christian MS. Sexual maturation data for Crl Sprague-Dawley rats: criteria and confounding factors. Drug Chem Toxicol. 2002 Nov;25(4):437-58,
- 135 Arnett M, Segvich D, Deosthale P, Okpara C. Chromosomal sex (XX vs XY) contributes to bone and muscle mass independently of the gonadal sex (ovaries vs testis) in the 4 core genotype mouse model. Presentation Number: FRI-030, Abstract presented at: ASBMR Meeting; 2023 Oct 13; Vancouver, Canada.
- 136 Hart NH, Newton RU, Tan J, Rantalainen T, Chivers P, Siafarikas A, Nimphius S. Biological basis of bone strength: anatomy, physiology and measurement. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2020 Sep 1;20(3):347-371,
- 137 Cladis DP, Swallow EA, Allen MR, Hill Gallant KM, Weaver CM. Blueberry Polyphenols do not Improve Bone Mineral Density or Mechanical Properties in Ovariectomized Rats. Calcif Tissue Int. 2022 Feb;110(2):260-265
- 138 Levine MA. Assessing bone health in children and adolescents. Indian J Endocrinol Metab. 2012 Dec;16(Suppl 2):S205-12,
- 139 Rauch F, Schoenau E. Changes in bone density during childhood and adolescence: an approach based on bone's biological organization. J Bone Miner Res. 2001 Apr;16(4):597-604,

-
- 140 Schneider MR. Von Kossa and his staining technique. *Histochem Cell Biol.* 2021 Dec;156(6):523-526,
- 141 Trzeciakiewicz A, Habauzit V, Horcajada MN. When nutrition interacts with osteoblast function: molecular mechanisms of polyphenols. *Nutr Res Rev.* 2009 Jun;22(1):68-81,
- 142 Wallace JM. Skeletal Hard Tissue Biomechanics. In: Burr DB, Allen MR, editors. *Basic and Applied Bone Biology*. 2nd ed. Academic Press; 2019, p. 125-40, ISBN: 9780128132593,
- 143 Mcnamara, Patrick & Alcorn, Jane. (2002). Protein binding predictions in infants. *AAPS pharmSci.* 4, E4,
- 144 Celi, Pietro & Robinson, Adam. (2010). Effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) supplementation on the performance of dairy calves. *Animal Production Science.* 50, 376-381, 10.1071/AN09169,
- 145 Maiztegui B, Villagarcía HG, Román CL, Flores LE, Prieto JM, Castro MC, Massa ML, Schinella GR, Francini F. Dietary Supplementation with Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Infusion Increases IRS-1 and PI3K mRNA Levels and Enhances Insulin Sensitivity and Secretion in Rat Pancreatic Islets. *Plants (Basel).* 2023 Jul 2;12(14):2620,
- 146 de Oliveira E, Lima NS, Conceição EPS, Peixoto-Silva N, Moura EG, Lisboa PC. Treatment with *Ilex paraguariensis* (yerba mate) aqueous solution prevents hepatic redox imbalance, elevated triglycerides, and microsteatosis in overweight adult rats that were precociously weaned. *Braz J Med Biol Res.* 2018;51(6):e7342,
- 147 Lykkesfeldt J, Svendsen O. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Vet J.* 2007 May;173(3):502-11,