



Efectos de stevia rebaudiana bertonii sobre músculo liso de rata

Andrés Menara.

Tesina de Grado-Carrera de Medicina.

Aprobada: 2017

Este documento está disponible para su consulta y descarga en RDU (Repositorio Digital de la Universidad Nacional de Córdoba). El mismo almacena, organiza, preserva, provee acceso libre y da visibilidad a nivel nacional e internacional a la producción científica, académica y cultural en formato digital, generada por los miembros de la Universidad Nacional de Córdoba. Para más información, visite el sitio <https://rdu.unc.edu.ar/>

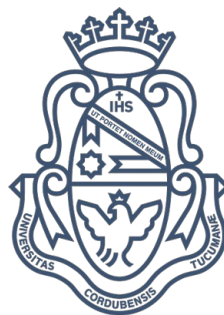
Esta iniciativa está a cargo de la OCA (Oficina de Conocimiento Abierto), conjuntamente con la colaboración de la Prosecretaría de Informática de la Universidad Nacional de Córdoba y los Nodos OCA. Para más información, visite el sitio <http://oca.unc.edu.ar/>

Esta obra se encuentra protegida por una Licencia Creative Commons 4.0 Internacional



Efectos de stevia rebaudiana bertonii sobre músculo liso de rata by Andrés Menara is licensed under a Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License.

Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Córdoba
Año 2017



EFECTOS DE STEVIA
REBAUDIANA BERTONI
SOBRE MÚSCULO LISO DE
RATA.

Tesina para la carrera de medicina.

Andrés Menara
Directora: Prof. Dra. Nilda Brizuela

Agradecimientos.

A mis padres Alicia y Juan Carlos, a mi abuela Teresita, a mis hermanos Agustín y Emanuel y a mi novia Florencia por la eterna paciencia.

A la Doctora Nilda Brizuela, por su confianza y sus enseñanzas.

Al personal de la Cátedra de Fisiología, a la Doctora Grigorjev, y a todos los que en algún momento me ayudaron con este proyecto.

CERTIFICO que el presente trabajo de Tesina del Alumno Andrés Menara, fue realizado en la Cátedra de Farmacología General de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. -----

Córdoba, 29 de marzo de 2017.

“LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS NO SE HACE SOLIDARIAS CON LAS OPINIONES DE ESTA TESINA”

Reglamento para Tesinas para Estudiantes de Ciencias Médicas, FCM, UNC.

ÍNDICE

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
OBJETIVOS	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
RESULTADOS	27
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES	34
REFERENCIAS	35
BIBLIOGRAFÍA	36

Resumen

Introducción. La *Stevia rebaudiana* Bertoni es un herbáceo perenne, nativo de la región oriental del Paraguay, utilizado desde la antigüedad por los aborígenes locales. Es frecuentemente usada por sus propiedades medicinales así como también por su capacidad edulcorante. Sus hojas contienen sustancias endulzantes como steviósidos, rebaudiósidos A, B, C, D, E y dulcósidos A y B. También contiene flavonoides y componentes fenólicos. Dentro de las propiedades de la *Stevia* se enumeran su capacidad antihiperlipidémica, la inducción de hipotensión, diuresis, natriuresis y kaliuresis, la capacidad espasmolítica a nivel GI, la actividad antiinflamatoria en lesión pulmonar aguda en ratones y su efecto neuroprotector frente a lesión isquémica cerebral.

Objetivos. Determinar el tipo de efectos de *Stevia rebaudiana* Bertoni sobre la contractilidad del músculo liso del sistema digestivo y reproductor en órganos aislados de rata (duodeno y útero).

Materiales y métodos. Se emplearon 12 hembras de rata vírgenes de la cepa Wistar con un peso entre 220-250 gramos y de entre 2-3 meses de edad, mantenidas en una habitación con temperatura controlada y acceso libre a alimento balanceado y agua. Un día antes de realizar el experimento se quita el alimento balanceado. Se sacrificó a los animales de acuerdo al protocolo establecido por la SeCyT. Se utilizó tintura madre de *Stevia* en solución alcohólica en dilución al 30% para conocer el efecto de los principios activos sobre los tejidos a estudiar. Se utilizó un modelo experimental de órgano aislado (baño de órgano) en el que se busca simular las condiciones fisiológicas en las que se encuentra el tejido en el organismo. Se extrajo duodeno y útero del animal sacrificado y se los colocó en el baño de órgano hasta que se estabilizó su actividad contráctil, luego se agregó al baño de órgano 150 microlitros de tintura madre de *Stevia* en dilución al 30%. Se registraron las variaciones en la tensión muscular a través de un transductor de tensión conectado a un electrofisiógrafo Beckman Type RB. A partir de dichos registros se realizó la comparación estadística de los resultados utilizando el método de T de Student.

Resultados. La exposición de duodeno a extracto de *Stevia* produjo disminución significativa de tono basal y frecuencia de las contracciones ($p < 0,05$), y disminución no significativa de la amplitud de las contracciones. La exposición de útero a extracto de *Stevia* produjo disminución significativa de tono basal, frecuencia y amplitud de las contracciones uterinas ($p < 0,05$).

Conclusiones. *Stevia* presenta capacidad inhibitoria frente a musculatura lisa de duodeno y de útero de rata en sistema de órgano aislado.

INTRODUCCIÓN

Desde el principio de los tiempos el hombre aprovechó de la mejor forma posible todos los recursos que tenía a su disposición para prolongar y mejorar su existencia. Entre los recursos aprovechados por distintas culturas a través de la historia se encuentran compuestos de origen mineral, animal y vegetal. Hasta principios y mediados del siglo XX éstos constituyeron los recursos terapéuticos por excelencia. (Barrientos Felipa 2013)

De forma obligada los individuos y las sociedades prehistóricas mantenían un fuerte contacto con la naturaleza; al principio esto repercutía de forma accidental en las personas, ya fuera por la ingesta de plantas tóxicas o venenosas, picaduras de insecto, etc. Dichas situaciones pasaban a formar parte de la experiencia de las comunidades antiguas que se hacían eco de qué les dañaba pero también, y del mismo modo de una forma accidental, comprendían que la naturaleza era fuente de sustancias con propiedades curativas. (Hernández Chávez 2014) (Figura 1)

Desde la antigüedad las personas han recurrido a las plantas en busca de curación o alivio para sus afecciones, con el conocimiento de que las especies vegetales poseen variadas propiedades medicinales. Las plantas no sólo han sido la principal fuente de alimentación y de medicinas, sino también de muchas de las aspiraciones, de los mitos, de los significados simbólicos y de las conductas rituales humanas. (Hernández Chávez 2014)

Fue así como cada región del mundo desarrolló su forma de curar a partir de plantas medicinales, que es única y característica, puesto que se utilizaban especies endémicas de las regiones en cuestión. Con el tiempo estas terapias características locales pasaron a conformar la llamada medicina tradicional y al ser preservada por los pueblos originarios fue llamada medicina aborígen o autóctona. (Barrientos Felipa 2013)

El descubrimiento de los fármacos sintéticos como las sulfas, la penicilina y otros antibióticos durante principios y mediados del siglo XX, hizo declinar la popularidad de la medicina herbolaria en la farmacoterapia. (Hernández Chávez 2014) Sin embargo en la actualidad se está produciendo un cambio de paradigma y de percepción con respecto a la fitofarmacología, sobre todo en las últimas dos décadas, y se está observando con renovado interés el estudio y la utilización de hierbas y plantas medicinales.



Figura 1 - Perspectiva histórica de la fitofarmacología.

En la actualidad aproximadamente 80% de la población mundial depende exclusivamente o en buena medida de diferentes plantas o hierbas para mantener o recuperar su salud. En los últimos años cada vez más gente está complementando los tratamientos de medicina convencional con suplementos naturales. (Shukla y col. 2012) El creciente interés por la fitofarmacología hace necesaria la evaluación de las propiedades de las plantas utilizadas, ya que cada una de ellas posee capacidad potencial para una gran variedad de usos y de aplicaciones terapéuticas y es escaso el conocimiento acerca de sus mecanismos de acción.

La *Stevia rebaudiana* Bertoni es un herbáceo perenne, nativo de la región oriental del Paraguay, utilizado desde la antigüedad por los aborígenes locales para contrarrestar el sabor agrio de varias hierbas medicinales y brebajes (Melis y col. 2009) así como por sus múltiples propiedades medicinales, e incluso se la ha utilizado como herramienta para el control de la fertilidad. (Ulbricht y col. 2010)

El botánico suizo Moisés Santiago Bertoni describió la planta de *Stevia* en 1899. En 1931 dos químicos franceses aislaron los glicósidos que le dan a la *Stevia* su característico sabor dulce. (Ulbricht y col. 2010) La planta fue llamada primero *Eupatorium rebaudianum* Bert. en honor a Rebaudi, el primer químico en estudiar las características químicas de las sustancias extraídas. Luego su nombre fue cambiado por el actual. (Ruiz-Ruiz y col. 2015)

Históricamente el uso de esta planta fue muy difundido en una buena parte de Sudamérica. Japón fue el primer país en Asia en comercializar glicósidos de steviol en la industria alimenticia. (Ruiz-Ruiz y col. 2015) Posteriormente el cultivo de esta planta se extendió a varios países en Asia, incluyendo China, Malasia, Singapur, Corea del Sur, Taiwan y Tailandia. Actualmente también se lo cultiva con éxito en Estados Unidos, Canadá y Europa. (Chatsudhipong y col. 2009)

Características de la planta

La *Stevia rebaudiana* Bertoni (familia Asteraceae) es una de los 154 miembros del género *Stevia* y una de las sólo dos especies que producen glicósidos de steviol dulces. (Madan y col. 2010)

Es una planta nativa del valle del río Monday en las tierras del noreste de Paraguay, donde crece en terrenos arenosos cerca de corrientes de agua en los bordes de pantanos o de arenas ácidas. (Madan y col. 2010)

Es un semi-arbusto perenne que puede alcanzar hasta 30 centímetros de altura. Sus hojas son sésiles, de 3-4 centímetros de longitud, elongadas-lanceoladas con forma de espátula, con lámina que presenta punta roma y márgenes serrados desde el medio hasta la punta. La superficie superior de la hoja es ligeramente glandular pubescente (que tiene vello). El tallo es ligeramente pubescente y leñoso. El rizoma tiene raíces ligeramente ramificadas. Las flores son compuestas, de color violeta claro, pentaméricas. El fruto presenta forma de huso con cinco nervaduras. (Madan y col. 2010) (Figura 2)



Figura 2 - Planta de Stevia rebaudiana Bertoni.

La distribución de los cultivos en el mundo está marginada por los límites climáticos, por defecto o por exceso de las necesidades vitales para los individuos que conforman los distintos biotipos. Desde que se efectúa la siembra las plantas están sometidas a las variaciones asincrónicas de los elementos componentes del clima y es el clima el principal factor determinantes de la probabilidad de éxito del cultivo así como también de los niveles de presencia de los diferentes compuestos que se encuentran en la planta.

Se logró delimitar el bioclima de la Stevia rebaudiana Bertoni en nuestro país, y la zona correspondiente abarca la totalidad de la provincia de Misiones, norte y centro de la provincia de Corrientes, sureste de la provincia de Chaco y noreste de la provincia de Santa Fe. (Falasca y col. 2004) (Figura 3)



Figura 3 - Zona apta para el cultivo de *Stevia rebaudiana* Bertoni en Argentina.

Características fitoquímicas

Stevia rebaudiana contiene glicósidos diterpénicos y muchísimos otros compuestos, incluyendo diterpenos no glicosídicos, triterpenoides, flavonoides, ácido cafeico, ácido clorogénico y una variedad de aceites volátiles (Ferreira y col. 2006), ésteres de lupeol y esteroides como stigmasterol, sitosterol y campesterol. (Madan y col. 2010)

Dentro de los glicósidos presentes en la planta se destaca el steviósido, un glicósido diterpenoide formado por tres moléculas de glucosa y una molécula de un alcohol carboxílico diterpénico, el steviol. (Lailerd y col. 2004) Aparte de steviósido, varios otros compuestos dulces como steviobiosido, rebaudiósidos A, B, C, D, E y dulcósido A pudieron aislarse de la hoja de *Stevia*. Todos estos glicósidos diterpenoides aislados tienen la misma estructura química básica (steviol) pero difieren en los residuos de carbohidratos en posición C13 y C19. (Chatsudthipong y col. 2009) Isosteviol es un diterpenoide tetracíclico obtenido por hidrólisis ácida de steviósido. (Wong y col. 2006) (Figura 4)

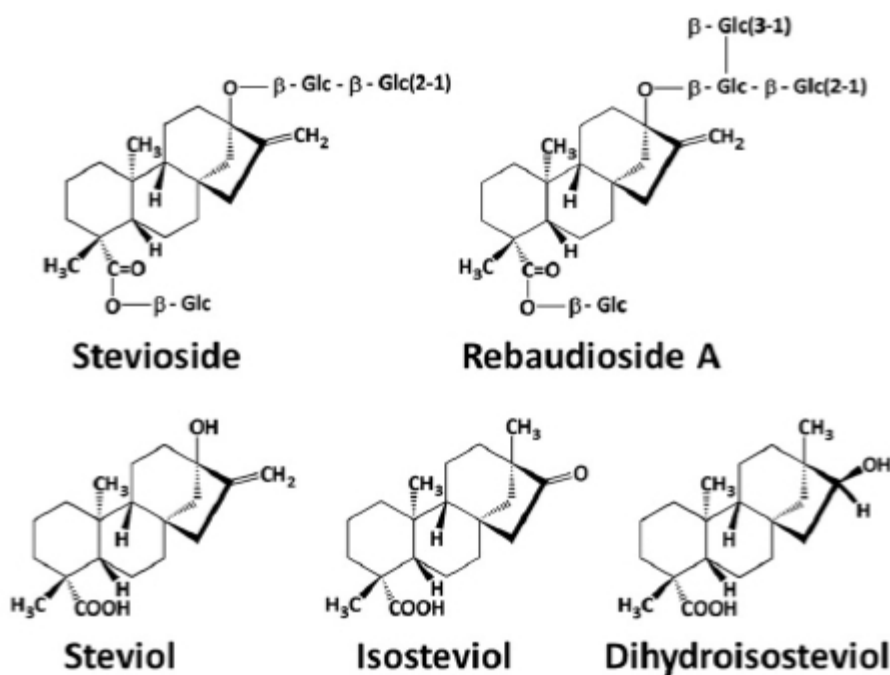


Figura 4 - Estructura química de steviósido y componentes relacionados.

Los mayores componentes de la hoja son steviósido (5-10% del peso total seco), rebaudiósido A (2-4%), rebaudiósido C (1-2%) y dulcósido A (0,4-0,7%). (Chatsudthipong y col. 2009)

Como endulzante y sustituto del azúcar, el sabor de Stevia tiene un comienzo lento y una duración más prolongada que la del azúcar. (Uchiyama y col. 2010) La dulzura de estos glicósidos en comparación con sacarosa se ha determinado como dulcósido A 50-120 veces más dulce, rebaudiósido A 250-450 veces, rebaudiósido B 300-350 veces, rebaudiósido C 50-120 veces, rebaudiósido D 250-450 veces, rebaudiósido E 150-300 veces, steviobiosido 100-125 veces y steviósido 300 veces más dulce que la sacarosa. (Chatsudthipong y col. 2009) (Figura 5)

Aparte de los glicósidos diterpenoides, en la composición de la planta se incluyen minerales como cobalto, magnesio, hierro, potasio y fósforo (Ruiz-Ruiz y col. 2015), siendo potasio el mineral con mayor presencia. (Wölwer-Rieck 2012) Ácido fólico es la vitamina soluble con más presencia en la hoja de Stevia, seguido por ácido ascórbico y vitamina B2. (Wölwer-Rieck 2012) La Stevia presenta bajo contenido graso y considerable contenido proteico. La fracción lipídica es rica en ácidos grasos insaturados. (Wölwer-Rieck 2012)

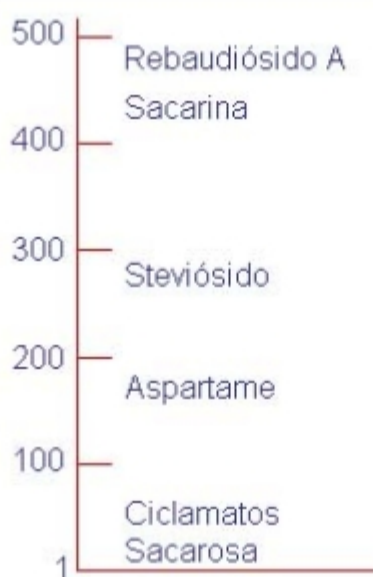


Figura 5 - Comparación relativa de la capacidad edulcorante de steviósido y rebaudiósido A.

Características farmacocinéticas

En una ingestión oral de steviósido, es el steviol el que es absorbido por el intestino hacia la sangre. (Chatsudthipong y col. 2009), aunque es poco probable que steviol se absorba a nivel intestinal. El jugo gástrico y las enzimas digestivas de animales y humanos no pueden degradar al steviósido. Sin embargo la flora bacteriana intestinal de ratas, ratones, cerdos y humanos pueden convertir el steviósido en su aglicona, el steviol. Parte del steviol es expulsado con las heces, el resto es absorbido por el colon. Dentro de la flora intestinal bacteroides suele ser el microorganismo más eficiente al hidrolizar los componentes de stevia a steviol. (Ulbricht y col. 2010)

En administración oral de steviósido se encontró que la máxima concentración en sangre en ratas se alcanza a las 8 horas de la ingesta, con una vida media de eliminación de 24 horas. Sin embargo, in vivo la captación de steviol desde el colon es despreciable y el mismo es más bien adsorbido a los compuestos presentes en el colon, los cuales tienden a concentrarse por la retirada de agua de dicho medio. (Geuns 2003)

En administración intravenosa de steviósido la conversión metabólica a steviol en ratas se produce en hígado, y existen dos vías de excreción, vía biliar y vía urinaria. (Chatsudthipong y col. 2009) La metabolización de steviol parece llevarse a cabo a nivel hepático, sugiriendo un metabolismo de fase I de oxidación (monohidroxi y dihidroxi) a través del citocromo P450. En adición al

metabolismo de fase I el steviol atraviesa un metabolismo de fase II en la que su parte mayor es conjugada con glucurónido antes de ser eliminada por orina. (Chatsudthipong y col. 2009) No existen acumulaciones de derivados en el cuerpo. En sangre sólo puede detectarse glucurónido de steviol, pero no steviol libre. (Geuns 2011)

Los glicósidos de steviol son muy estables y pueden ser cocinados y horneados a temperaturas de 200°C sin llegar a su descomposición. (Geuns 2011)

El consumo de steviósido no influencia la captación de otros nutrientes esenciales como aminoácidos, vitaminas y minerales, (Geuns 2003), así como no se producen interacciones ni alteraciones sobre la biodisponibilidad de los nutrientes en una dieta. (Geuns 2011)

Propiedades biológicas

Los productos naturales de *Stevia rebaudiana* Bertoni tienen capacidad para actuar a varios niveles dentro del organismo. A modo general se puede decir que inhiben la fosforilación oxidativa, la actividad ATPasa, la actividad NADH-oxidasa, la actividad succinato-oxidasa, succinato-deshidrogenasa y L-glutamato deshidrogenasa. (Ulbricht y col. 2010)

Stevia rebaudiana Bertoni presenta varias propiedades de interés medicinal. Una de ellas es su capacidad antihipertensiva. Un leve efecto hipotensor fue notado en sujetos humanos que recibieron un té preparado con *Stevia* de forma diaria durante 30 días. (Lee y col. 2001) El efecto antihipertensivo del extracto crudo de *stevia* ingerido oralmente es dependiente de tiempo y requiere administración prolongada. El efecto hipotensor agudo de steviósido puede ser visto sólo cuando se lo administra directamente a la circulación sistémica. En humanos con hipertensión leve a moderada se demostró que el consumo continuo de steviósido (750 mg/día) por un año reduce la presión sanguínea tanto sistólica como diastólica. La ingesta oral de steviósido por períodos prolongados es bien tolerada y puede ser considerada como una alternativa o como terapia suplementaria para pacientes hipertensos. (Chatsudthipong y col. 2009)

Steviósido es conocido por su actividad antiespasmogénica en aorta de rata (Shiozaki y col. 2006) tanto en presencia como en ausencia de endotelio. (Ruiz-Ruiz y col. 2015) Esta misma sustancia purificada induce hipotensión, diuresis y natriuresis en ratas. Steviósido reduce la presión arterial media afectando tanto el volumen plasmático como la resistencia vascular. Sin embargo parece no tener ningún impacto significativo en la presión sanguínea en sujetos con presión normal o baja.

(Chatsudthipong y col. 2009) La respuesta hipotensora a steviósido parece ocurrir a través de un mecanismo de antagonismo al calcio similar al del verapamilo. El efecto de descenso de la presión sanguínea podría también depender de la actividad de prostaglandinas. (Lee y col. 2001) La relajación parece ser sinérgica cuando Stevia y verapamilo son administrados en forma conjunta sobre tejido aórtico. (Yesmine y col. 2013)

Isosteviol tiene la capacidad de inhibir la proliferación de células de músculo liso inducida por la actividad de angiotensina II. Inhibe la secreción de endotelina I en células de músculo liso inducida por angiotensina II. También disminuye los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno inducidas por angiotensina II en células de músculo liso. (Wong y col. 2006) y produce la relajación de anillos de aorta contraídos por inducción con vasopresina. (Wong y col. 2004)

La apertura del canal de potasio dependiente de ATP (K_{atp}) o del canal de potasio de pequeña conductancia activado por calcio (SK_{ca}) por parte de isosteviol puede considerarse uno de los mecanismos responsables de la reducción de calcio intracelular en células de músculo liso de aorta. (Wong y col. 2004) La hiperpolarización causada por la corriente de salida de potasio lleva al cierre de los canales de calcio dependientes de voltaje, lo que reduce el calcio intracelular e induce la relajación vascular. (Yesmine y col. 2013)

Stevia actúa además disminuyendo la concentración intracelular de calcio en los cardiomiocitos, por lo tanto atenuando la fuerza de contracción, acortando la fase de repolarización del potencial de acción y disminuyendo la amplitud pico promedio de la despolarización inicial y la duración de la sístole. Stevia podría tener potencial para mejorar parámetros electrofisiológicos cardíacos. (Yesmine y col. 2013)

Tanto steviósido como steviol poseen efecto insulínico y antihiper glucémico, pero steviol es más potente en este sentido que steviósido. (Chatsudthipong y col. 2009) Steviósido y steviol aumentan la secreción de insulina de forma dosis dependiente. De la misma forma, los extractos acuosos y de éter de Stevia presentan actividad antihiper glucémica dosis dependiente. (Kujur y col. 2010)

Steviósido mejora la sensibilidad a insulina en todo el cuerpo y la actividad de transporte de glucosa estimulada por insulina en músculo esquelético. El tratamiento agudo con steviósido en un modelo animal de insulinoresistencia produce un aumento de la sensibilidad a insulina en todo el organismo. (Lailerd y col. 2004) Steviósido también disminuye la velocidad de la gluconeogénesis en hígado, llevando a un descenso en los niveles plasmáticos de glucosa en ratas diabéticas. (Chatsudthipong y col. 2009) (Ferreira y col. 2006) Steviósido es capaz de reducir la resistencia a la

insulina a través de una disminución de la inflamación en tejido adiposo regulando el TNF α . (Mohd-Radzman y col. 2013)

Stevia actúa en tejido pancreático para elevar los niveles de insulina y ejerce efectos antihiper glucémicos a través de mecanismos dependientes de PPAR γ y de las propiedades antioxidantes de sus componentes. (Assaei y col. 2016) Stevia presenta también efecto hipolipemiante, produciendo reducción significativa de colesterol, triglicéridos y LDL, y aumentando HDL. (Ruiz-Ruiz y col. 2015) Stevia tiene a su vez un rol significativo en aliviar el daño hepático y renal en ratas diabéticas, aparte de su capacidad hipoglucémica. El polvo de las hojas de Stevia y el extracto de sus polifenoles causan una disminución significativa en los niveles de transaminasas plasmáticas y presentan un efecto protector a nivel hepático en ratas diabéticas. (Shivanna y col. 2012)

Rebaudiósido A es bien tolerado y carece de efecto farmacológico en la homeostasis de la glucosa in vivo. (Chatsudthipong y col. 2009)

Isosteviol mejora el perfil lipídico y estimula la expresión de genes clave de células beta, incluyendo factores de transcripción reguladores de insulina, mejorando por lo tanto la homeostasis de la glucosa y aumentando la sensibilidad a insulina. (Chatsudthipong y col. 2009)

La administración oral de extracto acuoso de Stevia induce vasodilatación sistémica y renal, causando hipotensión, diuresis y natriuresis. Tanto steviósido como steviol inhiben el transporte transepitelial de para-aminohipurato en túbulo renal proximal interfiriendo la entrada basolateral. (Madan y col. 2010)

La infusión intravenosa de steviósido en ratas induce natriuresis, diuresis y flujo plasmático renal aumentado, pero no afecta la tasa de filtrado glomerular. (Chatsudthipong y col. 2009)

Steviol por su parte, es un agente diurético que carece de actividad hipotensora. Es secretado por el epitelio tubular, causando diuresis, natriuresis, kaliuresis y descenso en la reabsorción tubular de glucosa. (Melis y col. 2009) Puede interactuar con transportadores de aniones y cationes orgánicos a nivel renal, con el potencial de ser usado para desarrollar moduladores de la eficacia terapéutica de las drogas. (Bunprajun y col. 2012)

El extracto del tallo de Stevia es espasmolíticamente activo actuando como antagonista cálcico. El mismo inhibe la entrada de calcio a las células de íleo aislado de conejillos de indias. (Shiozaki y col. 2006) (Madan y col. 2010) Los extractos de la planta son efectivos en los desórdenes gástricos,

y el principal mecanismo de protección se debe a su actividad antiespasmogénica similar a la de los bloqueantes de canales cálcicos. Steviósido fue la única sustancia espasmolítica en el extracto que presenta actividad gastroprotectora en animales con una dieta con histamina. (Shiozaki y col. 2006) (Yesmine y col. 2013)

El mecanismo de acción de Stevia es multimodal ya que muestra efectos moduladores beneficiosos en tejido cardíaco y gastrointestinal que pueden relacionarse con bloqueo de canales de calcio, activación de receptores muscarínicos M2 y por estimulación vía NO. (Yesmine y col. 2013)

Stevia rebaudiana Bertoni y sus diversos componentes presentan también importante actividad antiinflamatoria y antioxidante. Cuatro glicósidos (steviósido, rebaudiósidos A y C y dulcósido A) mostraron fuerte actividad inhibitoria frente a un modelo de inflamación inducida por 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato (TPA) en ratones. Steviósido disminuye la liberación y la síntesis de mediadores inflamatorios como TNF α e IL-1B inducida por lipopolisacáridos. También fue efectivo aumentando la actividad fagocítica, el título de anticuerpos de hemaglutinación e hipersensibilidad de tipo retardado. (Madan y col. 2010) (Bunprajun y col. 2012)

Isosteviol inhibe la ADN polimerasa y la ADN topoisomerasa II, objetivo celular para la farmacoterapia del cáncer así como de las enfermedades inflamatorias. (Chatsudthipong y col. 2009) (Madan y col. 2010)

Steviósido, junto con steviobiosido, isosteviol y steviol causan inhibición de la fosforilación oxidativa en la mitocondria de hígado de rata. Aparte de este efecto inhibitorio, los productos de Stevia podrían actuar como desacopladores de la fosforilación oxidativa. (Madan y col. 2010) Esta actividad antioxidante no fue detectada para steviósido, sino que es llevada a cabo por otros tipos de componentes de la Stevia, como los polifenoles y los componentes flavonoides. (López y col. 2016) (Gopalakrishnan y col. 2006) (Wölwer-Rieck y col. 2012) (Shukla y col. 2011) De esta forma, Stevia rebaudiana Bertoni se constituye como una fuente considerable de componentes antioxidantes.

Estudios realizados en varias líneas celulares han demostrado los efectos inhibitorios de los extractos de la hoja de Stevia y sus constituyentes polifenólicos en la promoción y la iniciación tumoral. (Ruiz-Ruiz y col. 2015) Steviósido y componentes relacionados inhibieron el edema inflamatorio y la actividad carcinogénica en un modelo experimental de tumor de piel en ratas. (Yasukawa y col. 2002)

Stevia y sus componentes también son capaces de desarrollar actividad antimicrobiana. Un extracto de Stevia exhibió fuerte actividad bactericida contra un amplio rango de bacterias patogénicas, incluyendo ciertas cepas de *Escherichia coli*. (Madan y col. 2010) (Ulbricht y col. 2010) La solubilidad, la concentración y la composición de los metabolitos secundarios son los responsables de la actividad antimicrobiana de dichos extractos. (Ruiz-Ruiz y col. 2015) Los extractos de Stevia también son potentes agentes anti-rotavirus tanto in vitro como in vivo. (Madan y col. 2010)

Stevia ha demostrado ser no cariogénica, a través de diferentes mecanismos entre los cuales se pueden mencionar el efecto antibacterial, el bajo potencial acidogénico y el efecto antiplaca. (Ruiz-Ruiz y col. 2015)

Tratamiento previo con isosteviol en un modelo experimental de isquemia cerebral en ratas permite reducir el volumen de infarto, la muerte celular y la inflamación que sigue a la lesión por isquemia-reperusión. Isosteviol puede revertir la inhibición sobre superóxido dismutasa y reducir la superoxidación de lípidos, contribuyendo a sus propiedades protectoras frente a la isquemia-reperusión. El tratamiento con isosteviol permitió mejorar el aspecto histológico del tejido cerebral dañado, en el cual el número de neuronas sobrevivientes fue mayor y el número de células inflamatorias disminuyó comparado con los controles. (Xu y col. 2008)

A su vez, tratamiento previo con steviósido logró atenuar el daño de una lesión aguda pulmonar producida por lipopolisacáridos en ratones. Steviósido disminuyó el filtrado de líquido sérico a tejido pulmonar, disminuyó la producción de citoquinas pro inflamatorias, disminuyó el número total de células, de neutrófilos y macrófagos y disminuyó la expresión de COX-2 en el pulmón. (Yingkun y col. 2013)

Por último, existe evidencia de que steviósido podría alterar el proceso normal de apoptosis, acelerando la apoptosis inducida por deprivación plasmática. (Takahashi y col. 2012)

Toxicidad y mutagenicidad

En general es aceptado que el consumo de Stevia rebaudiana Bertoni así como de sus componentes no representa riesgo para el ser humano. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) estableció la ingesta diaria promedio (ADI) para los glicósidos de steviol en 4 mg/kg por día. (López y col. 2016)

Steviósido tiene muy baja toxicidad oral en ratón, rata y hamster. Para administración oral se encontró una dosis letal 50 (LD50) entre 8,2 y 17 g/kg. (Geuns 2003) La ingesta de steviósido (750 mg/día por 3 meses) por individuos sanos o por aquellos con patología de base como diabetes mellitus o hipertensión no produjo efectos adversos o anormalidades en la función hepática o renal. (Chatsudthipong y col. 2009)

Aunque se encontró una débil actividad degenerativa de steviol y algunos derivados sobre una cepa sensible de *Salmonella typhimurium*, se concluyó que la ingesta diaria de steviósido como endulzante es segura. (Geuns 2003) (Matsui y col. 1996) (Ulbricht y col. 2010) (Suttajit y col. 1993) No se ha demostrado ningún tipo de reacción directa con ADN por parte de steviósido ni de steviol. Ninguno de los dos componentes ha demostrado daño genotóxico en organismos relevantes para el ser humano. (Brusick y col. 2008) Estudios in vitro con líneas celulares de riñón e intestino indicaron que steviol reduce significativamente la viabilidad celular, posiblemente por interrupción del metabolismo mitocondrial. Sin embargo las dosis aplicadas son muy superiores a las ingeridas en situación normal. (Chatsudthipong y col. 2009)

Steviósido administrado por vía oral no aumentó la incidencia de cáncer en ratas ni en ratones. (Chatsudthipong y col. 2009) (Brusick y col. 2008) En 1999 el Comité Mixto de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) en conjunto con la OMS estableció que no hay indicios de potencial carcinogénico en los steviósidos. (Geuns 2003)

Un número de estudios han demostrado que la ingesta oral de steviósido no tiene efecto sobre la fertilidad de ratones, ratas y hamsters, así como tampoco produce cambios en la espermatogénesis o la proliferación de células intersitiales. (Chatsudthipong y col. 2009) El extracto de la hoja de *Stevia* y steviósido no alteraron las etapas o la duración del ciclo estro en ratones suizos albinos. No hubo cambios significativos en las características histológicas de útero ni de ovario en los ratones tratados con extracto de *Stevia* y con steviósido comparados con el grupo control. No presentaron ninguna toxicidad sobre el sistema reproductor femenino ni tampoco ninguna complicación sobre el embarazo. (Kumar y col. 2008) La exposición prenatal a steviósido y steviol no resultó tóxica para embriones de pollo. (Geuns 2003)

No hay registros en la literatura de la existencia de reacciones alérgicas a *Stevia* o sus compuestos. (Madan y col. 2010) En teoría, pacientes con alergia conocida o hipersensibilidad a la familia de las margaritas (*Asteraceae/Compositae*) deberían evitar la *Stevia*. (Ulbricht y col. 2010)

Aplicaciones y comercialización

En los últimos años *Stevia rebaudiana* Bertoni comenzó a ser aprobada y utilizada como edulcorante en forma refinada o como aditivo en alimentos y bebidas en varios países como Brasil, Japón (Shiozaki y col. 2006), Nueva Zelanda, Australia, Estados Unidos, Francia (Geuns 2011) e incluso en Argentina, donde se utiliza la hoja como aditivo de la yerba mate, su extracto como aditivo en bebidas alcohólicas y su forma refinada como edulcorante (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca 2012).

Recientemente se comenzó a estudiar la capacidad de los derivados de *Stevia* para ser utilizados como excipientes en compuestos farmacéuticos, con resultados muy positivos. La preparación de compuestos asociados a derivados de *Stevia* se perfila como un método prometedor para mejorar la disolución y aumentar la biodisponibilidad de drogas insolubles en medio acuoso. (Uchiyama y col. 2010).

Por todo lo anteriormente expuesto se puede ver que la *Stevia rebaudiana* Bertoni es una planta que ofrece múltiples beneficios y cuya importancia está creciendo rápidamente debido a las propiedades que presenta y a su creciente consumo a nivel mundial. Si bien existen estudios sobre el efecto de *Stevia* y sus derivados sobre tracto gastrointestinal, no existe en la literatura evidencia del efecto de estas sustancias sobre musculatura lisa de duodeno. De la misma forma, existen estudios histopatológicos que se encargan de evaluar la toxicidad de *Stevia* sobre sistema reproductor femenino, pero no existen estudios que evalúen la actividad contráctil de útero en presencia de *Stevia* y sus derivados. Por estos motivos hemos considerado relevante realizar una investigación sobre dichos efectos.

OBJETIVO GENERAL

1. Determinar el tipo de efectos de Stevia rebaudiana Bertoni sobre la contractilidad de músculo liso de sistema digestivo y reproductor en órganos aislados de rata (duodeno y útero).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar y registrar tono de relajación, frecuencia y amplitud de las contracciones de músculo liso de duodeno y útero de rata en presencia del extracto de Stevia rebaudiana Bertoni.
2. Comparar los registros obtenidos del tejido expuesto al extracto de Stevia rebaudiana Bertoni con los resultados obtenidos del tejido de control.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Se emplearon un total de 12 ejemplares de hembras de rata vírgenes de la cepa Wistar con un peso entre 220-250 gramos y 2-3 meses de edad. Las mismas se alojaban en el bioterio utilizado por la Cátedra de Fisiología Humana en la Escuela Práctica de la Facultad de Ciencias Médicas de la UNC y fueron mantenidas bajo condiciones de medio ambiente estrictamente controladas.

Los ejemplares se alojaban en jaulas adecuadas, con un área mínima de piso de 200 cm² por animal, evitando la sobrecarga de animales por jaula. Los lechos eran de materiales absorbentes libres de sustancias químicas tóxicas que puedan dañar a los animales y/o interferir en las respuestas biológicas.

Se mantuvo una temperatura controlada entre los 20°C y 25°C, con una humedad relativa ambiente que osciló entre el 40% y 70%. No hubo entrada de luz exterior en las áreas donde se mantuvieron los animales, que fueron sometidos a un régimen de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con acceso libre a alimento balanceado y agua (Secretaría de Ciencia y Tecnología, FCM, UNC 2009).

Veinticuatro horas antes de realizar el experimento se quitaba el alimento balanceado manteniendo a los ejemplares en las mismas condiciones de luz, temperatura y agua.

Extracto de Stevia rebaudiana Bertoni

Se utilizó tintura madre de Stevia rebaudiana Bertoni en solución alcohólica en dilución al 30% para conocer el efecto de los principios activos sobre los tejidos a estudiar.

La tintura madre fue adquirida en una farmacia homeopática especializada en la producción de estos compuestos.

La tintura madre se guardó en refrigeración hasta el momento de su utilización.

Obtención del material

Antes de sacrificar a los animales se realizó citología vaginal para confirmar el estado de estro de las hembras.

Posteriormente se procedió a sacrificar a los animales mediante decapitación, respetando el Reglamento para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación emitido por la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Facultad de Ciencias Médicas. Luego se procedió a extraer el duodeno y ambos cuernos uterinos. Del total de los 12 ejemplares utilizados, a 4 se les extrajo duodeno y a 8 se les extrajo útero.

Una vez obtenida la muestra se la montaba inmediatamente al sistema de órgano aislado. De no ser posible el montaje inmediato, las muestras se mantenían en solución Krebs-Ringer.

Modelo experimental de órgano aislado

Las muestras obtenidas fueron estudiadas dentro de un sistema de órgano aislado. Este es un sistema en el que se busca simular las condiciones fisiológicas en las que se encuentra un tejido en el organismo. Para esto fue necesario establecer una serie de condiciones experimentales, entre las que destacan el mantener la temperatura óptima (32-34° C) por medio de un baño de agua, la cual se hace circular mediante una bomba peristáltica, desde un baño y a través de las cámaras de órgano aislado (que presentan un sistema de “doble camisa”), por la camisa externa. El interior de la cámara contiene solución de Krebs-Ringer con burbujeo continuo de gas carbógeno (95% O₂ + 5% CO₂). (Figura 6)



Figura 6 - Sistema de órgano aislado.

El tejido en experimentación se mantiene fijo por sus dos extremos, su extremo inferior conectado con un soporte y su extremo superior conectado a un transductor de tensión, que se mantiene conectado a un polígrafo para el registro de la actividad contráctil. En este caso se registraron las variaciones en la tensión muscular a través de un transductor de tensión conectado a un electrofisiógrafo Beckman Type RB. (Figura 7)



Figura 7 - Electrofisiógrafo Beckman Type RB.

Calibración y medición de los registros

Para interpretar la magnitud de la contracción expresada por el tejido, se llevó a cabo una calibración que consistió en colgar pesas de diferente valor (100 a 500 mg) del transductor para obtener un desplazamiento expresado en unidades de longitud que sirve para expresarlo en unidades de masa. Para el presente trabajo se calibró el sistema de modo que una tensión equivalente a 500 mg corresponda a una deflexión en los registros de 5 mm.

Después de colocar los tejidos en las cámaras de órgano aislado se esperó 20-25 minutos para permitir la estabilización del tejido y se tomó el registro control de las contracciones espontáneas; posteriormente se agregó el extracto de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Desde el momento en que se agregó el extracto, se consideraron los 14 minutos previos como registro de control, y los 14 minutos posteriores como registro del efecto del extracto.

Del registro obtenido se midió tono muscular de relajación, frecuencia y amplitud de la contracción en condiciones basales, comparadas con la actividad en presencia del extracto.

El tono muscular de relajación es el estado de tensión que presenta el músculo en condiciones basales. En este caso, cuando el músculo se encuentra relajado, antes y después de cada contracción (inicio y final de la onda). Esta propiedad se mide en miligramos, comparando el registro antes y después de la agregación de 150 microlitros de tintura madre de Stevia.

La frecuencia de la contracción es el número de contracciones (ondas) que ocurren en una unidad de tiempo, en este caso un minuto, y se cuantificó a partir de la base (valle) de una onda hasta la base de la siguiente, o de cima (cresta) a cima. La duración de la contracción se consideró como el tiempo que existe entre el inicio de ésta y el final de la relajación. Este parámetro se puede tomar en diferentes niveles de la amplitud de la onda; en este trabajo, las mediciones se llevaron a cabo al 100% de amplitud de la contracción, comparando el registro antes y después de la agregación de 150 microlitros de tintura madre de Stevia.

La amplitud de las contracciones implica la intensidad con que se contrae el tejido estudiado, y se cuantificó calculando la diferencia entre el valle (tono de relajación) y el pico (tono máximo de contracción) registrado en cada contracción. Este parámetro se mide en miligramos, comparando el registro antes y después de la agregación de 150 microlitros de tintura madre de Stevia.

Los registros fueron asentados en papel a partir del cual se realizaron las mediciones y las correlaciones estadísticas correspondientes. (Figura 8)

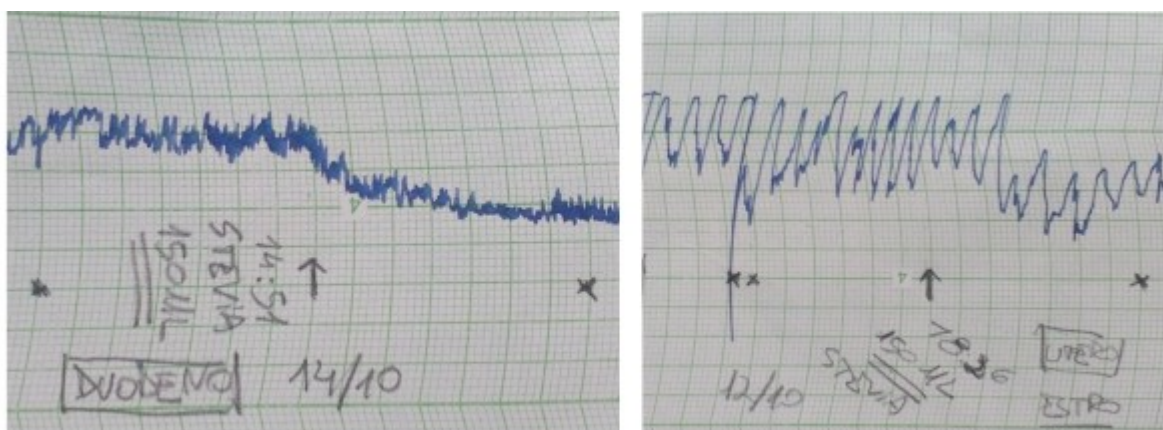


Figura 8 - Registros gráficos de la actividad contráctil de duodeno y de útero.

Análisis estadístico

Todos los valores son presentados como media \pm error estándar de la media. Se realizó Test t de Student para muestras apareadas para evaluar las diferencias entre los grupos estudiados. Se consideró como significativa una $p < 0,05$.

RESULTADOS

En duodeno (N=4), si comparamos la media del tono basal antes de ser expuesto al extracto de Stevia y después de ser expuesto al mismo, se observa un descenso en el tono basal que correspondería a un 23,21%, con una $p=0,0058$. (Figura 9) Los valores absolutos se pueden apreciar en la Tabla 1.

	N	Tono basal (mg)			Frecuencia (contracciones/minuto)			Amplitud (mg)		
		Sin Stevia	Con Stevia	% Disminución	Sin Stevia	Con Stevia	% Disminución	Sin Stevia	Con Stevia	% Disminución
Duodeno	4	3152,75 ± 191,95	2421 ± 108,78*	23,21%	1,69 ± 0,12	1,34 ± 0,06*	21,24%	515 ± 84,09	408,75 ± 48,06	20,63%
Útero	8	2997,36 ± 394,51	2692,46 ± 431,27*	10,17%	0,77 ± 0,1	0,59 ± 0,11*	23,38%	2066,12 ± 471,52	1711,01 ± 551,75*	17,19%

Tabla 1 – Valores de tono basal, frecuencia de contracciones y amplitud de contracciones de duodeno y útero de rata antes y después de ser expuestos a extracto de Stevia. Los valores se expresan como media ± error estándar de la media. *= $p<0,05$

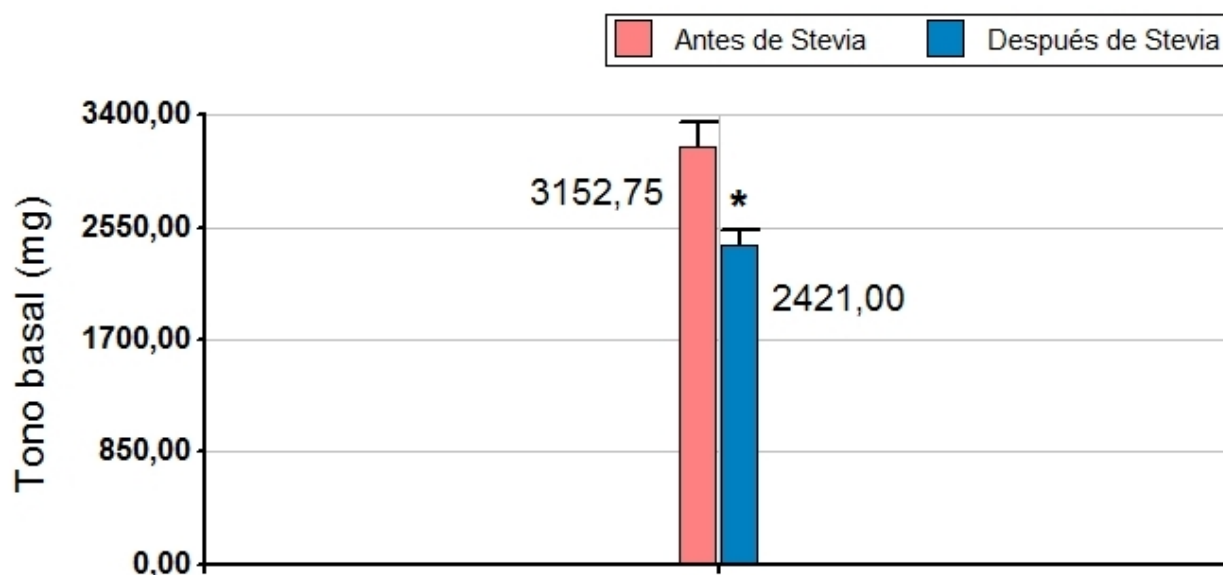


Figura 9 - Tono basal de duodeno.
Medias de tono basal de duodeno antes y después de ser expuesto a Stevia. *= $p<0,05$

Si comparamos la frecuencia de contracciones por minuto en duodeno antes y después de ser expuesto al extracto de Stevia, se observa una disminución en la frecuencia de las contracciones que correspondería a un 21,24%, con una $p=0,0111$. (Figura 10)

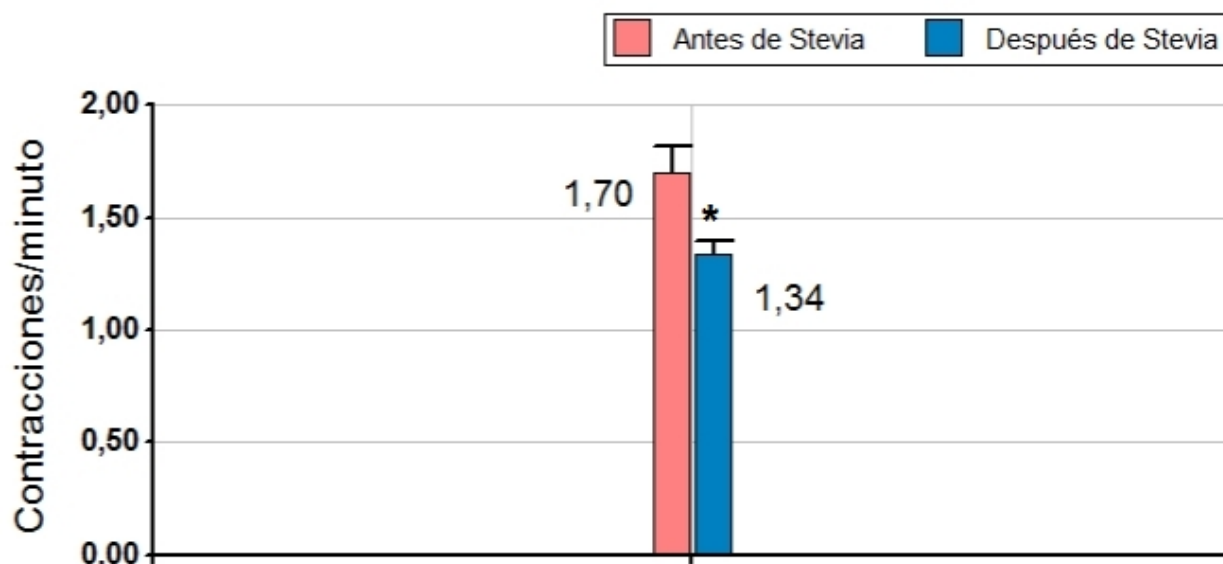


Figura 10 - Frecuencia de contracciones de duodeno.
Medias de frecuencia de contracciones por minuto antes y después de ser expuesto a Stevia. $*=p<0,05$

Comparando los valores de amplitud de las contracciones de duodeno antes de ser expuesto a Stevia y después de ser expuesto a la misma, se observa un descenso en la amplitud de las contracciones de un 20,63%, con una $p=0,069$. En este caso la diferencia no resultó significativa. (Figura 11)

En cuanto a útero (N=8), se puede observar un descenso del 10,17% en el tono basal de dicho órgano después de ser expuesto al extracto de Stevia, con una $p=0,007$. (Figura 12)

Por su parte, el número de contracciones por minuto en el útero se ve disminuido en un 23,38% después de ser expuesto al extracto de Stevia, con una $p=0,0064$. (Figura 13)

Por último, la amplitud de las contracciones de útero después del agregado de Stevia al baño de órgano se ve disminuida en un 17,19%, con una $p=0,0412$. (Figura 14)

Se observa entonces que todos los parámetros medidos se vieron disminuidos al ser expuestos a la acción de la tintura madre de Stevia rebaudiana Bertoni, resultando significativas todas las

diferencias obtenidas, excepto la diferencia entre las amplitudes de contracción de duodeno, cuya p resultó mayor a 0,05.

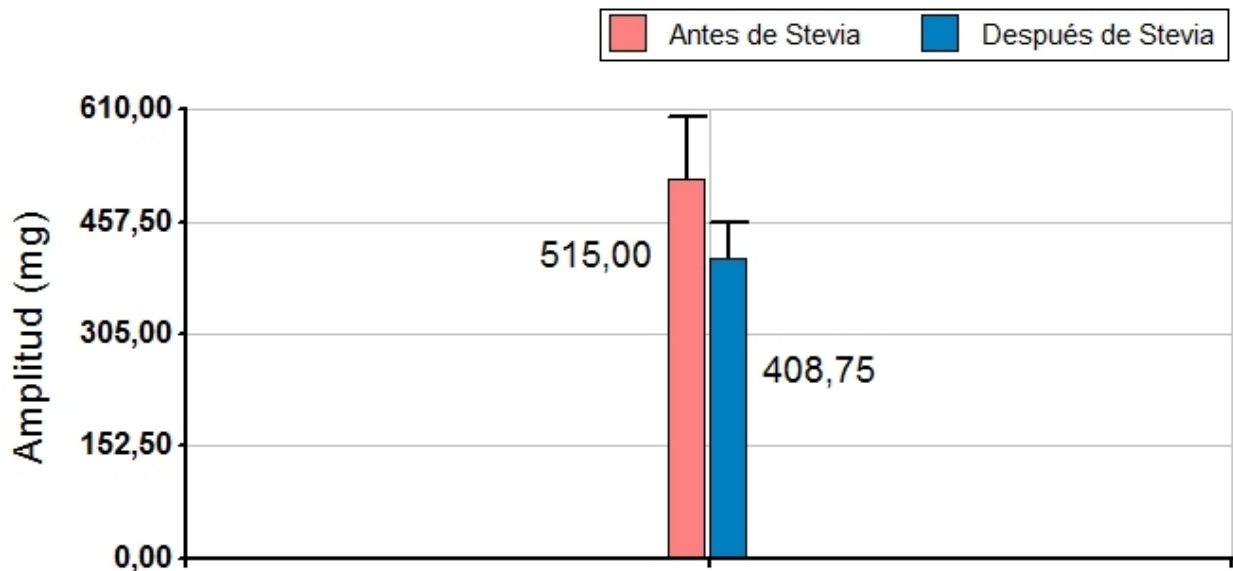


Figura 11 - Amplitud de contracciones de duodeno.
Medias de amplitud de contracciones de duodeno antes y después de ser expuesto a Stevia.

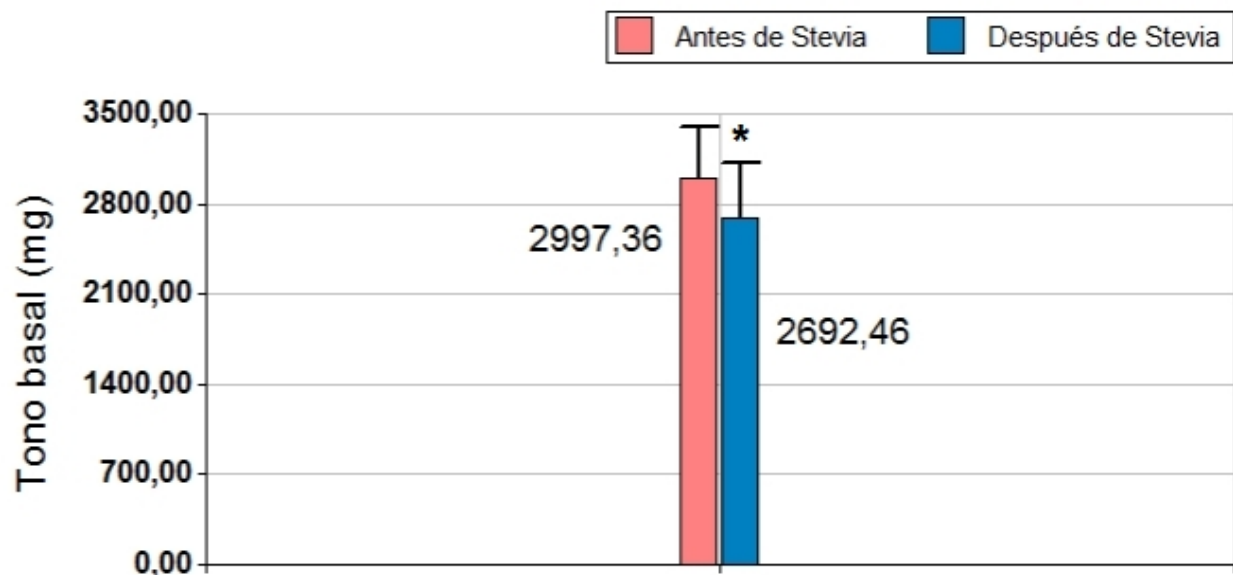


Figura 12 - Tono basal de útero.
Medias de tono basal de útero antes y después de ser expuesto a Stevia. *= $p < 0,05$

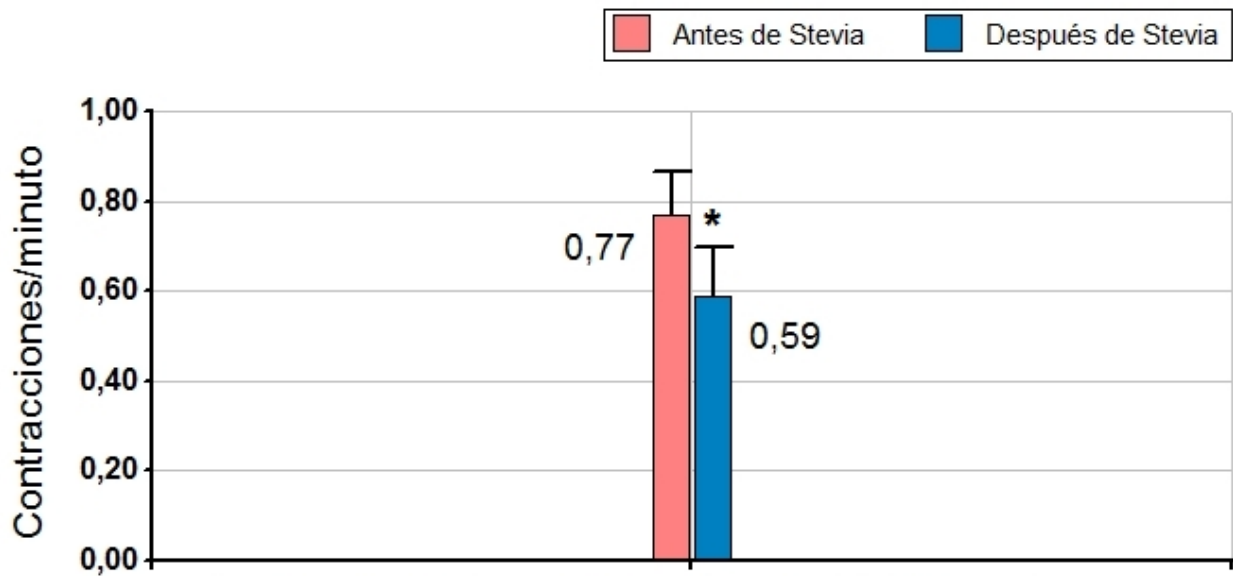


Figura 13 - Frecuencia de contracciones de útero.

Medias de frecuencia de contracciones por minuto antes y después de ser expuesto a Stevia. $*=p<0,05$

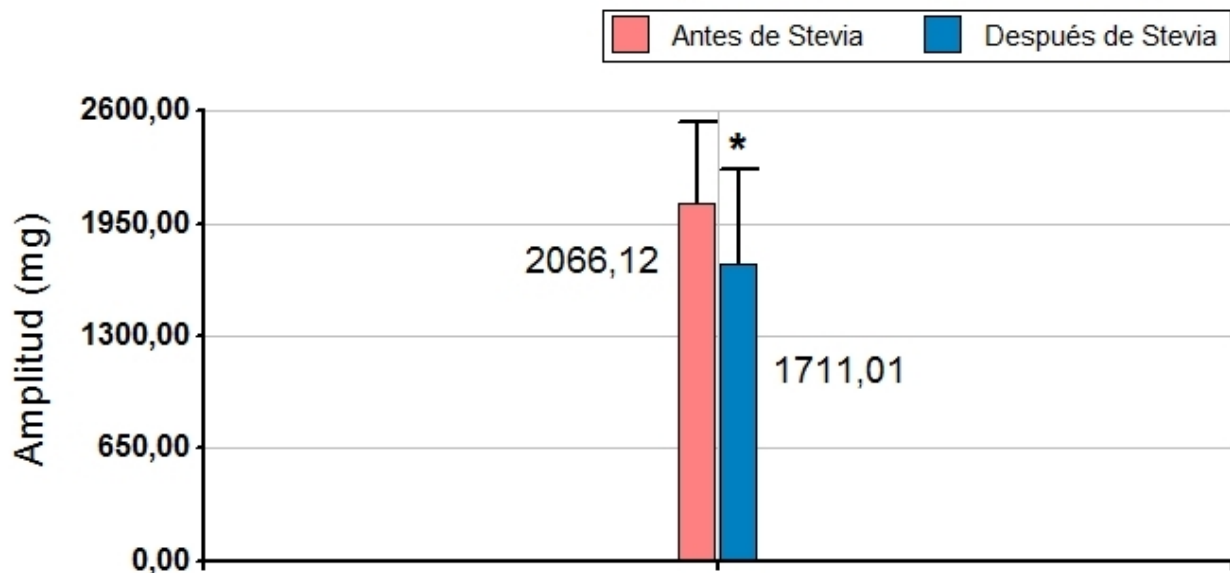


Figura 14 - Amplitud de contracciones de útero.

Medias de amplitud de contracciones de útero antes y después de ser expuesto a Stevia. $*=p<0,05$

DISCUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos podemos afirmar que *Stevia rebaudiana* Bertoni presenta efecto inhibitorio sobre la musculatura lisa de duodeno y útero de rata.

En el caso del efecto inhibitorio producido por *Stevia* sobre duodeno se observa que todos los parámetros evaluados presentaron una disminución significativa al ser expuestos a *Stevia*, excepto la amplitud de las contracciones del duodeno ($p=0,0695$).

En la literatura se pueden encontrar diferentes estudios en los que se evalúa la actividad de *Stevia* sobre musculatura lisa. Shiozaki en 2006 realizó un estudio para valorar el efecto del extracto acuoso del tallo de *Stevia* sobre la actividad contráctil de íleo de conejillo de indias. En dicho trabajo se comparó el efecto inhibitorio de *Stevia* sobre la musculatura lisa de tubo digestivo estimulada con acetilcolina e histamina. Se llegó a la conclusión en ese caso de que el extracto acuoso de *Stevia* produce inhibición de la actividad muscular a nivel digestivo, que dicho efecto es dosis dependiente y que el posible mecanismo de acción de dicho efecto sería el bloqueo de los canales de calcio, probablemente por acción de steviósido.

En el trabajo realizado por Yasmine en 2013 se estudió en profundidad la actividad gastromoduladora de *Stevia*. A partir de los resultados obtenidos se observó que el efecto antiespasmódico de *Stevia* está mediado por la inhibición del flujo intracelular de calcio a través de los canales de calcio dependientes de voltaje tipo L. El bloqueo de estos canales se produciría por la disminución de los niveles de AMP cíclico a partir de la activación de los receptores muscarínicos M2 y M4. Por lo tanto ese estudio concluye que *Stevia* desarrolla su efecto espasmolítico a través de la activación de dichos receptores muscarínicos, que producirían el bloqueo de los canales de calcio en tejido muscular de íleo, dando como resultado la relajación de la musculatura lisa.

En el presente trabajo no se realizaron las mediciones a partir de un tejido muscular previamente estimulado (ya sea con acetilcolina o histamina), sino que el efecto se estudió a partir de la actividad basal de la musculatura de duodeno. Tampoco se realizaron mediciones sucesivas de la respuesta muscular a dosis crecientes de extracto de *Stevia*, por lo que no podemos afirmar que el efecto inhibitorio sobre la musculatura de duodeno sea dosis dependiente.

A partir de los trabajos de Shiozaki y de Yasmine, y dada la similitud de los tejidos estudiados por ellos (íleo) y el estudiado en el presente trabajo (duodeno), podríamos deducir entonces que probablemente el mecanismo de acción que produce la inhibición de la contractilidad de la

musculatura lisa de duodeno en este caso sería el bloqueo de los canales de calcio de la musculatura lisa. Posiblemente exista algún grado de activación de los receptores muscarínicos del duodeno. Sería interesante profundizar en este punto y desarrollar un modelo experimental que permita conocer específicamente el mecanismo de acción responsable, así como también poder evaluar si el efecto de Stevia sobre duodeno es dosis dependiente o no.

En base a estas observaciones se puede pensar que Stevia rebaudiana Bertoni presenta potencial para ser utilizada como agente antiespasmódico o incluso antidiarreico.

En cuanto al efecto inhibitorio producido por el extracto de Stevia sobre la actividad contráctil de útero de rata se observa que tanto el tono basal, la frecuencia de contracciones y la amplitud de las contracciones fueron disminuidos de forma significativa al entrar en contacto con Stevia.

Las mediciones se realizaron sobre la actividad basal de la musculatura de útero, sin ningún tipo de estímulo extra. Tampoco se realizaron mediciones sucesivas con dosis crecientes de extracto de Stevia para valorar el efecto de la variación de dosis sobre la contractilidad uterina, por lo que no se puede afirmar que el efecto inhibitorio de Stevia sobre útero sea dosis dependiente.

En la bibliografía consultada hay varios estudios que investigan los efectos de Stevia sobre la fertilidad, la espermatogénesis, la influencia de la planta y sus componentes sobre los ciclos reproductivos, sobre la histología de útero y de ovario tanto de ratones, como de ratas y hamsters. (Chatsudthipong y col. 2009) (Kumar y col. 2008) Todos estos trabajos descartan la toxicidad de Stevia y sus componentes sobre el sistema reproductor.

Sin embargo no hay, por lo menos hasta el momento de la realización de este estudio, datos en la bibliografía que se refieran al efecto de Stevia rebaudiana Bertoni sobre músculo liso uterino, lo que aumenta la trascendencia de los resultados encontrados en el presente trabajo. A partir de los estudios realizados sobre otros tipos de musculatura lisa (gastrointestinal, vascular) podría sospecharse algún mecanismo similar al responsable del efecto espasmolítico en tubo digestivo, mediante bloqueo de canales de calcio. Resultaría interesante poder profundizar e intentar dilucidar el o los mecanismos de acción que intervienen en la relajación de la musculatura uterina a partir de la exposición al extracto de Stevia, así como también realizar pruebas comparativas con sustancias que presenten efecto espasmogénico a nivel uterino, y realizar mediciones con diferentes dosis de extracto para determinar si los efectos del mismo son dosis dependiente o no.

En base a estas observaciones y a la capacidad relajante que presenta *Stevia rebaudiana* Bertoni sobre musculatura uterina podría presentarse a esta planta con sus componentes como un potencial agente uteroinhibidor.

CONCLUSIONES

Como conclusión podemos decir entonces que la exposición de duodeno de rata a un extracto de Stevia rebaudiana Bertoni en un sistema de órgano aislado produce inhibición de la musculatura lisa de dicho tejido, con descenso significativo del tono basal y de la frecuencia de las contracciones, y un descenso no significativo de la amplitud de las contracciones.

Por otro lado podemos afirmar que la exposición de útero de rata en estro a un extracto de Stevia rebaudiana Bertoni en un sistema de órgano aislado también produce inhibición de la actividad muscular de dicho órgano, con descenso significativo tanto del tono basal como de la frecuencia y la amplitud de las contracciones uterinas.

Por lo pronto, podría decirse que Stevia rebaudiana Bertoni se presenta como un potencial agente espasmolítico y uteroinhibidor. Debería sin embargo profundizarse en estos hallazgos para intentar dilucidar los mecanismos de acción involucrados en estos efectos.

REFERENCIAS

- Figura 1 obtenida de Hernández Chávez A. “Farmacología General. Una guía de estudio.” Capítulo 3: Fitofarmacología. McGraw-Hill Interamericana Editores. 2014. ISBN: 978-607-15-1052-5.
- Figura 2 obtenida de <http://www.aldeademascotas.com/producto/stevia-rebaudiana/>
- Figura 3 obtenida de Falasca S, Ulberich A. “El bioclima de Stevia rebaudiana Bertoni en Argentina.” X Reunión Argentina y IV Latinoamericana de Agrometeorología. 2004.
- Figura 4 obtenida de Chatsudhipong V, Muanprasat C. “Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness.” *Pharmacol Ther.* 2009 Jan;121(1):41-54. doi: 10.1016/j.pharmthera.2008.09.007. Epub 2008 Oct 27.
- Figura 5 obtenida de <http://www.herbotecnia.com.ar/c-biblio007-06.html>

BIBLIOGRAFÍA

- Assaei R, Mokarram P, Dastghaib S, Darbandi S, Darbandi M, Zal F, Akmal M, Ranjbar Omrani GH. “Hypoglycemic Effect of Aquatic Extract of Stevia in Pancreas of Diabetic Rats: PPAR γ -dependent Regulation or Antioxidant Potential.” *Avicenna J Med Biotechnol.* 2016 Apr-Jun;8(2):65-74.
- Barrientos Felipa J. “Fitofarmacología. Seminario” Facultad de Medicina Humana “Daniel Alcides Carrión”, Universidad Nacional San Luis Gonzaga, 2013.
- Brusick DJ. “A critical review of the genetic toxicity of steviol and steviol glycosides.” *Food Chem Toxicol.* 2008 Jul;46 Suppl 7:S83-91. doi: 10.1016/j.fct.2008.05.002. Epub 2008 May 16.
- Bunprajun T, Yimlamai T, Soodvilai S, Muanprasat C, Chatsudthipong V. “Stevioside enhances satellite cell activation by inhibiting of NF- κ B signaling pathway in regenerating muscle after cardiotoxin-induced injury.” *J Agric Food Chem.* 2012 Mar 21;60(11):2844-51. doi: 10.1021/jf203711d. Epub 2012 Mar 7.
- Chatsudthipong V, Muanprasat C. “Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness.” *Pharmacol Ther.* 2009 Jan;121(1):41-54. doi: 10.1016/j.pharmthera.2008.09.007. Epub 2008 Oct 27.
- Falasca S, Ulberich A. “El bioclima de Stevia rebaudiana Bertoni en Argentina.” X Reunión Argentina y IV Latinoamericana de Agrometeorología. 2004.
- Ferreira EB, de Assis Rocha Neves F, da Costa MA, do Prado WA, de Araújo Funari Ferri L, Bazotte RB. “Comparative effects of Stevia rebaudiana leaves and stevioside on glycaemia and hepatic gluconeogenesis.” *Planta Med.* 2006 Jun;72(8):691-6. Epub 2006 May 29.
- Geuns JM. “Estevia y Glucósidos de Esteviol: Propiedades, técnicas, usos, exposición, toxicología, efectos farmacológicos.” 2011.
- Geuns JM. “Stevioside.” *Phytochemistry.* 2003 Nov;64(5):913-21.
- Gopalakrishnan B, Bawane A, Kusum S, Hukkeri VI. “Free radical scavenging activity of flavonoid containing leaf extracts of Stevia rebaudiana Bert.” *Ancient Science of Life Vol : XXV (3&4) January, February, March, April, May, June 2006 pages 46-48.*

- Hernández Chávez A. “Farmacología General. Una guía de estudio.” Capítulo 3: Fitofarmacología. McGraw-Hill Interamericana Editores. 2014. ISBN: 978-607-15-1052-5.
- Kujur RS, Singh V, Ram M, Yadava HN, Singh KK, Kumari S, Roy BK. “Antidiabetic activity and phytochemical screening of crude extract of *Stevia rebaudiana* in alloxan-induced diabetic rats.” *Pharmacognosy Res.* 2010 Jul;2(4):258-63. Doi: 10.4103/0974-8490.69128.
- Kumar RD, Oommen OV. “*Stevia rebaudiana* Bertoni does not produce female reproductive toxic effect: Study in Swiss albino mouse.” *J Endocrinol Reprod* 12 (2008) 1:57-60.
- Lailerd N, Saengsirisuwan V, Sloniger JA, Toskulkao C, Henriksen EJ. “Effects of stevioside on glucose transport activity in insulin-sensitive and insulin-resistant rat skeletal muscle.” *Metabolism.* 2004 Jan;53(1):101-7.
- Lee CN, Wong KL, Liu JC, Chen YJ, Cheng JT, Chan P. “Inhibitory effect of stevioside on calcium influx to produce antihypertension.” *Planta Med.* 2001 Dec;67(9):796-9.
- López V, Pérez S, Vinuesa A, Zorzetto C, Abian O. “*Stevia rebaudiana* ethanolic extract exerts better antioxidant properties and antiproliferative effects in tumour cells than its diterpene glycoside stevioside.” *Food Funct.* 2016 Apr;7(4):2107-13. doi: 10.1039/c5fo01586c.
- Madan S, Ahmad S, Singh GN, Kohli K, Kumar Y, Singh R, Garg M. “*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni – A Review.” *Indian Journal of Natural Products and Resources*, Vol I (3), September 2010, pp. 267-286.
- Matsui M, Matsui K, Kawasaki Y, Oda Y, Noguchi T, Kitagawa Y, Sawada M, Hayashi M, Nohmi T, Yoshihira K, Ishidate M, Sofuni T. “Evaluation of the genotoxicity of stevioside and steviol using six in vitro and one in vivo mutagenicity assays.” *Mutagenesis* vol.11 no.6 pp.573-579, 1996.
- Melis MS, Rocha ST, Augusto A. “Steviol effect, a glycoside of *Stevia rebaudiana*, on glucose clearances in rats.” *Braz. J. Biol.*, 69(2): 371-374, 2009.
- Mohd-Radzman NH, Ismail WI, Adam Z, Jaapar SS, Adam A. “Potential Roles of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Abrogating Insulin Resistance and Diabetes: A Review.” *Evid Based*

- Complement Alternat Med. 2013;2013:718049. doi: 10.1155/2013/718049. Epub 2013 Nov 12.
- Ruiz-Ruiz JC, Moguel-Ordoñez YB, Segura-Campos MR. “Biological Activity of Stevia Rebaudiana Bertoni and Their Relationship to Health.” *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2015 Oct 19:0. [Epub ahead of print]
 - Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, Secretaría de Políticas, Regulación e Institutos “CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO - Resolución Conjunta 86/2012 y 273/2012.”
 - Secretaría de Ciencia y Tecnología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba “Reglamentación para el cuidado y uso de animales de experimentación en dependencias de la Facultad de Ciencias Médicas y Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Córdoba”, RHCD 674/09
 - Shiozaki K, Fukii A, Nakano T, Yamaguchi T, Sato M. “Inhibitory Effects of Hot Water Extract of the Stevia Stem on the Contractile Response of the Smooth Muscle of the Guinea Pig Ileum,” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70 (2), 489–494, 2006.
 - Shivanna N, Naika M, Khanum F, Kaul VK. “Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of Stevia rebaudiana.” *J Diabetes Complications*. 2013 Mar-Apr;27(2):103-13. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2012.10.001. Epub 2012 Nov 7.
 - Shukla S, Mehta A, Mehta P, Bajpai VK. “Antioxidant ability and total phenolic content of aqueous leaf extract of Stevia rebaudiana Bert.” *Exp Toxicol Pathol*. 2012 Nov;64(7-8):807-11. doi: 10.1016/j.etp.2011.02.002. Epub 2011 Mar 5.
 - Suttajit M, Vinitketkaumnuen U, Meevatee U, Buddhasukh D. “Mutagenicity and human chromosomal effect of stevioside, a sweetener from Stevia rebaudiana Bertoni.” *Environ Health Perspect*. 1993 Oct;101 Suppl 3:53-6.
 - Takahashi K, Sun Y, Yanagiuchi I, Hosokawa T, Saito T, Komori M, Okino T, Kurasaki M. “Stevioside enhances apoptosis induced by serum deprivation in PC12 cells.” *Toxicol Mech Methods*. 2012 May;22(4):243-9. doi: 10.3109/15376516.2012.658978. Epub 2012 Feb 9.
 - Uchiyama H, Tozuka Y, Imono M, Takeuchi H. “Transglycosylated stevia and hesperidin as pharmaceutical excipients: dramatic improvement in drug dissolution and bioavailability.”

- Eur J Pharm Biopharm. 2010 Oct;76(2):238-44. doi: 10.1016/j.ejpb.2010.07.006. Epub 2010 Jul 15.
- Ulbricht C, Isaac R, Milkin T, Poole EA, Rusie E, Grimes Serrano JM, Weissner W, Windsor RC, Woods J. “An evidence-based systematic review of stevia by the Natural Standard Research Collaboration.” *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2010 Apr;8(2):113-27.
 - Wölwer-Rieck U. “The leaves of *Stevia rebaudiana* (Bertoni), their constituents and the analyses thereof: a review.” *J Agric Food Chem*. 2012 Feb 1;60(4):886-95. doi: 10.1021/jf2044907. Epub 2012 Jan 24.
 - Wong KL Lin JW, Liu JC, Yang HY, Kao PF, Chen CH, Loh SH, Chiu WT, Cheng TH, Lin JG, Hong HJ. “Antiproliferative effect of isosteviol on angiotensin-II-treated rat aortic smooth muscle cells.” *Pharmacology*. 2006;76(4):163-9. Epub 2006 Feb 9.
 - Wong KL Yang HY, Chan P, Cheng TH, Liu JC, Hsu FL, Liu IM, Cheng YW, Cheng JT. “Isosteviol as a potassium channel opener to lower intracellular calcium concentrations in cultured aortic smooth muscle cells.” *Planta Med*. 2004 Feb;70(2):108-12.
 - Wong KL, Chan P, Yang HY, Hsu FL, Liu IM, Cheng YW, Cheng JT. “Isosteviol acts on potassium channels to relax isolated aortic strips of Wistar rat.” *Life Sci*. 2004 Mar 26;74(19):2379-87.
 - Xu D, Du W, Zhao L, Davey AK, Wang J. “The neuroprotective effects of isosteviol against focal cerebral ischemia injury induced by middle cerebral artery occlusion in rats.” *Planta Med*. 2008 Jun;74(8):816-21. doi: 10.1055/s-2008-1074557. Epub 2008 Jun 13.
 - Yasukawa K, Kitanaka S, Seo S. “Inhibitory effect of stevioside on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin.” *Biol Pharm Bull*. 2002 Nov;25(11):1488-90.
 - Yesmine S, Connolly K, Hill N, Coulson FR, Fenning AS. “Electrophysiological, vasoactive, and gastromodulatory effects of stevia in healthy Wistar rats.” *Planta Med*. 2013 Jul;79(11):909-15. doi: 10.1055/s-0032-1328706. Epub 2013 Jul 5.
 - Yingkun N, Zhenyu W, Jing L, Xiuyun L, Huimin Y. “Stevioside protects LPS-induced acute lung injury in mice.” *Inflammation*. 2013 Feb;36(1):242-50. doi: 10.1007/s10753-012-9540-8.