

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica



**EFFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Stevia rebaudiana* (ESTEVEIA)
SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO Y LA EXPRESIÓN DEL
GEN iNOS EN MACRÓFAGOS MURINOS.**

Tesis presentada por el Bachiller:

Chang Espinoza, Ian Pierre

Para optar el Título Profesional de

Ingeniero Biotechnólogo

Asesor:

Mg. Arenas Chávez, Carlos

Arequipa- Perú

2019

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Programa Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 20170000030154

N° Trámite en Fac. 358-2017

Fecha Recep. Fac. 18-08-2017

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **CHANG ESPINOZA, Ian Pierre**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE ESTEVIA SOBRE LA PRODUCCION DE OXIDO NITRICO EN MACROFAGOS DE RATA"

DICTAMINADORES: 1) *Dr. José Villanueva Salas* 2) *Ing. Cinthia Córdova Barrios*

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis presentado por el recurrente, cumplimos con informar que se ha revisado, formulado las observaciones y corregido, debiendo cambiar el título a : **"EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Stevia rebaudiana* (*Stevia*) SOBRE LA PRODUCCION DE OXIDO NITRICO Y LA EXPRESION DEL GEN *Inos* EN MACRÓFAGOS MURINOS"**, luego de lo cual consideramos que se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente

FIRMAS :



(Devolver antes de 8 días hábiles)

FECHA

24/08/17

ASESOR: *Mgter. Carlos Arenas Chávez*

DICTAMEN ASESORÍA:

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesor de tesis presentado por el recurrente, cumpla con informar que he revisado y formulado las observaciones correspondientes, las que fueron atendidas por el tesisista, luego de lo cual considero que se encuentra apto para seguir el trámite.

FIRMA



FECHA *12/12/18*

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

1) *Dr. José Villanueva Salas*

3)

Ing. Cinthia Córdova Barrios

2) *Dr. Julio Cesar Bernabé Ortiz*

DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, habiendo revisado el presente Borrador de Tesis intitulado: **"EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Stevia rebaudiana* (*ESTEVIA*) SOBRE LA PRODUCCION DE OXIDO NITRICO Y LA EXPRESION DEL GEN *INOS* EN MACROFAGOS MURINOS"** y habiendo realizado las correcciones indicadas se considera APTO para que prosiga con el trámite en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

Atentamente

FIRMA



(Devolver antes de 15 días hábiles)

FECHA *28-12-18*

JURADOS: PRESIDENTE *DR. JOSE VILLANUEVA SALAS*
VOCAL *DR. JULIO CESAR BERNABE ORTIZ*
SECRETARIO *ING. CINTHIA CORDOVA BARRIOS*

FECHA

9/1/19

HORA *19.00*

LOCAL *C-401*

FIRMA DEL DECANO



FECHA

03/1/19



DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación va dedicado a las personas que más quiero, amo y forman parte de mi vida como son mis padres y mi hermano que siempre me ofrecen su apoyo incondicional en todo momento.

Ian Pierre Chang Espinoza



AGRADECIMIENTO

Agradezco a todas las personas que estuvieron pendiente de este trabajo de investigación, apoyándome y en especial al Dr. Fredy Zegarra Aragón por darme la idea de realizar este trabajo de investigación y a mi asesor Magister Carlos Arenas Chávez por su sabiduría y recomendaciones en este trabajo.

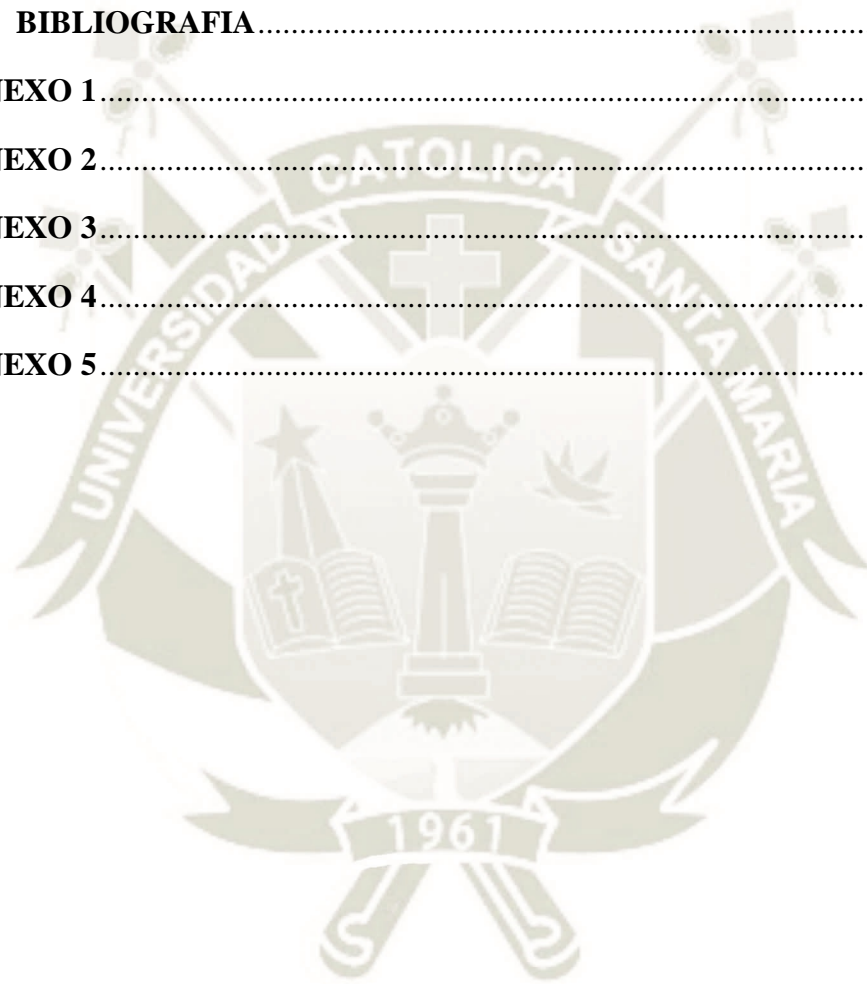
Ian Pierre Chang Espinoza

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| INTRODUCCIÓN | 5 |
| Hipótesis..... | 6 |
| Objetivos | 7 |
| CAPÍTULO I | 8 |
| 1. MARCO TEÓRICO | 8 |
| 1.1. <i>Stevia rebaudiana</i> | 8 |
| 1.1.1. Taxonomía..... | 10 |
| 1.1.2. Etimología | 11 |
| 1.1.3. Carcinogenicidad y genotoxicidad..... | 11 |
| 1.1.4. Control y legislación mundial y europea..... | 11 |
| 1.1.5. Ingesta diaria admisible (IDA) | 12 |
| 1.2. Óxido nítrico | 13 |
| 1.2.1. Sistema Cardiovascular..... | 16 |
| 1.2.2. Sistema Digestivo | 17 |
| 1.2.3. Sistema Nervioso | 18 |
| 1.2.4. Sistema Respiratorio | 19 |
| 1.2.5. Sistema Inmune..... | 20 |
| 1.3. Hipertensión..... | 22 |
| 1.4. Regulación de la expresión génica..... | 24 |
| CAPÍTULO II | 26 |

| | |
|--|----|
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS | 26 |
| 2.1. Material biológico | 26 |
| 2.2. Medio de cultivo celular | 26 |
| 2.3. Reactivos | 26 |
| 2.4. Equipos | 27 |
| 2.5. Materiales | 27 |
| 2.6. Metodología experimental..... | 28 |
| 2.6.1. Preparación del medio de cultivo..... | 28 |
| 2.6.2. Inducción de macrófagos murinos | 28 |
| 2.6.3. Obtención de macrófagos | 29 |
| 2.6.4. Cultivo celular..... | 29 |
| 2.6.5. Obtención del extracto acuoso de <i>Stevia rebaudiana</i> | 30 |
| 2.7. Prueba de citotoxicidad con MTT..... | 31 |
| 2.8. Prueba de óxido nítrico..... | 31 |
| 2.9. Extracción de RNA (Ácido ribonucleico) | 32 |
| 2.10. Síntesis de cDNA | 34 |
| 2.11. Preparación de Primers (iNOS y GADPH) | 35 |
| 2.12. PCR | 36 |
| 2.13. Electroforesis | 37 |
| CAPÍTULO III | 38 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIONES | 38 |
| 3.1. Obtención del extracto acuoso de <i>Stevia rebaudiana</i> | 38 |
| 3.2. Citotoxicidad con ensayo de MTT..... | 38 |
| 3.3. Óxido nítrico..... | 42 |

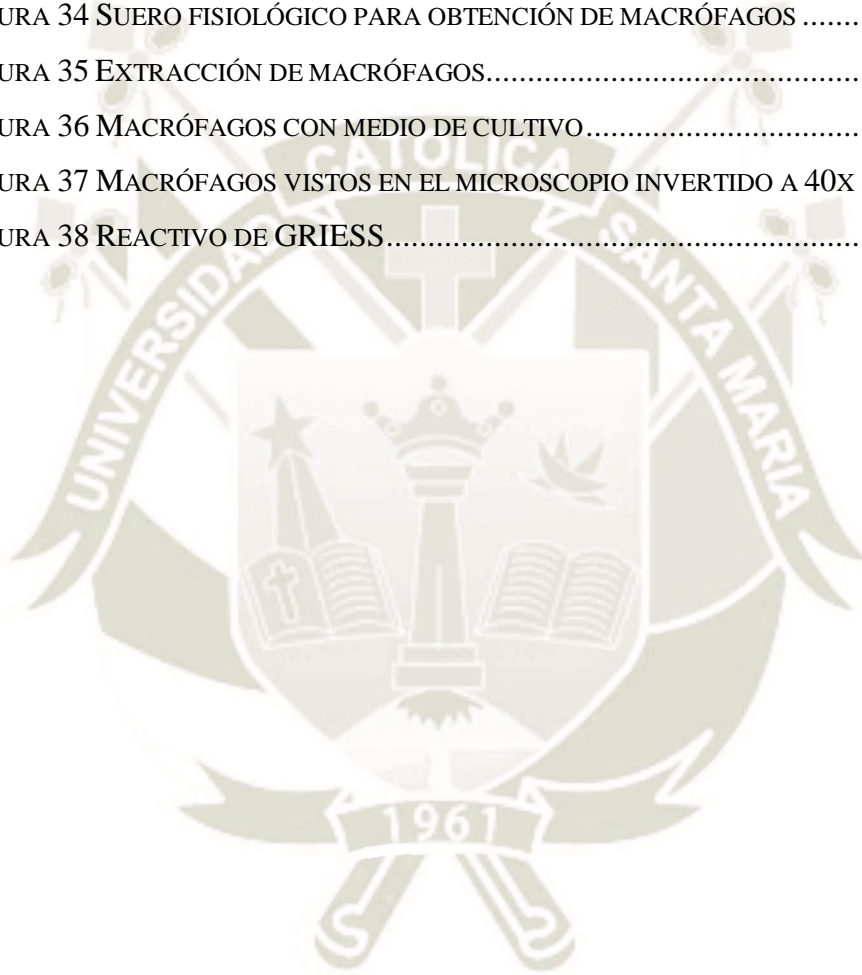
| | |
|--------------------------------|-----------|
| 3.4. Expresión génica..... | 47 |
| 3.4.1. Gen iNOS..... | 48 |
| 4. CONCLUSIONES..... | 49 |
| 5. RECOMENDACIONES..... | 49 |
| 6. BIBLIOGRAFIA..... | 50 |
| ANEXO 1..... | 55 |
| ANEXO 2..... | 57 |
| ANEXO 3..... | 60 |
| ANEXO 4..... | 62 |
| ANEXO 5..... | 63 |



ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 STEVIA REBAUDIANA ⁴³ | 8 |
| FIGURA 2 ESTRUCTURA MOLECULAR ÓXIDO NÍTRICO ¹³ | 13 |
| FIGURA 3 FORMACIÓN DE NO ⁴⁴ | 15 |
| FIGURA 4 EJERCICIO Y HOMEOSTASIS DEL ÓXIDO NÍTRICO ¹⁵ | 17 |
| FIGURA 5 ÓXIDO NÍTRICO SINTETASA NEURONAL ⁴⁵ | 19 |
| FIGURA 6 ESTIMULACIÓN INMUNOLÓGICA Y LIBERACIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO ¹³ | 22 |
| FIGURA 7 INDUCCIÓN DE MACRÓFAGOS | 28 |
| FIGURA 8 CONTEO CELULAR..... | 29 |
| FIGURA 9 CULTIVO CELULAR..... | 29 |
| FIGURA 10 SOLUCIÓN STOCK Y CONCENTRACIONES UTILIZADAS..... | 30 |
| FIGURA 11 ENSAYO MTT..... | 31 |
| FIGURA 12 PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO..... | 32 |
| FIGURA 13 MINI KIT RNA..... | 34 |
| FIGURA 14 KIT DE cDNA INVITROGEN | 35 |
| FIGURA 15 PRIMERS DEL GEN iNOS Y GAPDH..... | 36 |
| FIGURA 16 TERMOCICLADOR PCR..... | 37 |
| FIGURA 17 CÁMARA DE ELECTROFORESIS | 37 |
| FIGURA 18 VIABILIDAD A 12 HORAS | 39 |
| FIGURA 19 VIABILIDAD A 24 HORAS | 40 |
| FIGURA 20 VIABILIDAD A 48 HORAS | 41 |
| FIGURA 21 ÓXIDO NÍTRICO A 1.5 HORAS | 42 |
| FIGURA 22 ÓXIDO NÍTRICO A 3 HORAS | 43 |
| FIGURA 23 ÓXIDO NÍTRICO A 6 HORAS | 44 |
| FIGURA 24 ÓXIDO NÍTRICO A 12 HORAS | 45 |
| FIGURA 25 ÓXIDO NÍTRICO A 24 HORAS | 46 |
| FIGURA 26 EXPRESIÓN GEN iNOS..... | 48 |
| FIGURA 27 TRITURACIÓN DE STEVIA | 57 |
| FIGURA 28 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO POR ULTRASONIDO | 57 |

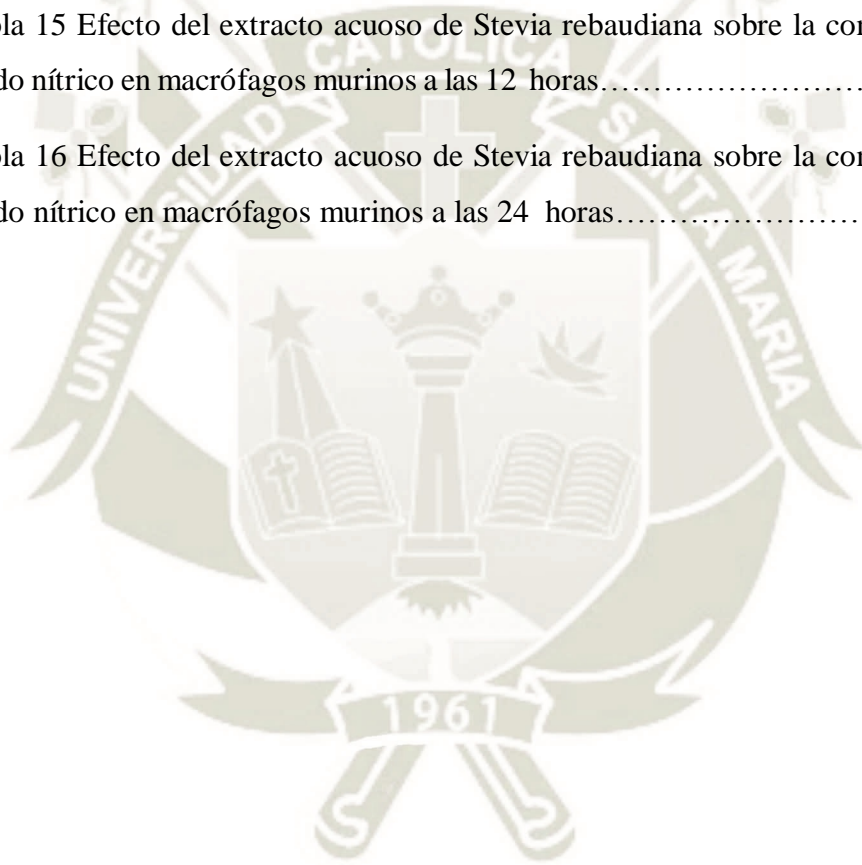
| | |
|---|----|
| FIGURA 29 CENTRIFUGACIÓN DEL EXTRACTO..... | 58 |
| FIGURA 30 FILTRACIÓN CON BOMBA AL VACÍO..... | 58 |
| FIGURA 31 EXTRACTO DE STEVIA REBAUDIANA | 58 |
| FIGURA 32 EVAPORACIÓN EN LA ESTUFA A 37 GRADOS | 59 |
| FIGURA 33 EXTRACTO PURO DE STEVIA REBAUDIANA | 59 |
| FIGURA 34 SUERO FISIOLÓGICO PARA OBTENCIÓN DE MACRÓFAGOS | 60 |
| FIGURA 35 EXTRACCIÓN DE MACRÓFAGOS..... | 60 |
| FIGURA 36 MACRÓFAGOS CON MEDIO DE CULTIVO..... | 61 |
| FIGURA 37 MACRÓFAGOS VISTOS EN EL MICROSCOPIO INVERTIDO A 40X | 61 |
| FIGURA 38 REACTIVO DE GRIESS..... | 62 |



ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1 Concentración del extracto de Stevia rebaudiana sobre la viabilidad de macrófagos murinos a las 12 horas..... | 39 |
| Tabla 2 Concentración del extracto de Stevia rebaudiana sobre la viabilidad de macrófagos murinos a las 24 horas..... | 40 |
| Tabla 3 Concentración del extracto de Stevia rebaudiana sobre la viabilidad de macrófagos murinos a las 48 horas..... | 41 |
| Tabla 4 Concentración del extracto acuoso de Stevia rebaudiana sobre la concentración de óxido nítrico en macrófagos murinos a las 1.5 horas..... | 42 |
| Tabla 5 Concentración del extracto acuoso de Stevia rebaudiana sobre la concentración de óxido nítrico en macrófagos murinos a las 3 horas..... | 43 |
| Tabla 6 Concentración del extracto acuoso de Stevia rebaudiana sobre la concentración de óxido nítrico en macrófagos murinos a las 6 horas..... | 44 |
| Tabla 7 Concentración del extracto acuoso de Stevia rebaudiana sobre la concentración de óxido nítrico en macrófagos murinos a las 12 horas..... | 45 |
| Tabla 8 Concentración del extracto acuoso de Stevia rebaudiana sobre la concentración de óxido nítrico en macrófagos murinos a las 24 horas..... | 46 |
| Tabla 9 Efecto del extracto acuoso de Stevia rebaudiana sobre la viabilidad de los macrófagos murinos a las 12 horas..... | 63 |
| Tabla 10 Efecto del extracto acuoso de Stevia rebaudiana sobre la viabilidad de los macrófagos murinos a las 24 horas..... | 63 |
| Tabla 11 Efecto del extracto acuoso de Stevia rebaudiana sobre la viabilidad de los macrófagos murinos a las 48 horas..... | 63 |

| | |
|---|----|
| Tabla 12 Efecto del extracto acuoso de Stevia rebaudiana sobre la concentración de óxido nítrico en macrófagos murinos a las 1.5 horas..... | 64 |
| Tabla 13 Efecto del extracto acuoso de Stevia rebaudiana sobre la concentración de óxido nítrico en macrófagos murinos a las 3 horas..... | 64 |
| Tabla 14 Efecto del extracto acuoso de Stevia rebaudiana sobre la concentración de óxido nítrico en macrófagos murinos a las 6 horas..... | 64 |
| Tabla 15 Efecto del extracto acuoso de Stevia rebaudiana sobre la concentración de óxido nítrico en macrófagos murinos a las 12 horas..... | 65 |
| Tabla 16 Efecto del extracto acuoso de Stevia rebaudiana sobre la concentración de óxido nítrico en macrófagos murinos a las 24 horas..... | 65 |



LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| °C | Grados centígrados |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ANOVA | Análisis de varianza |
| cDNA | ADN complementario |
| cm | Centímetros |
| CMPc | Citidina monofosfato cíclico |
| cNOS ó eNOS | Óxido nítrico sintetasa endotelial |
| CO ₂ | Dióxido de nitrógeno |
| COX | Ciclo oxigenasa |
| CYP | Citocromo P450 |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| EDTA | Ácido Etilendiaminotetracético |
| EFSA | <i>European Food Safety Authority</i> |
| ELA | Esclerosis Lateral Amiotrófica |
| FAB | Flavin Adenina Dinucleótido |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FMN | Flavinmononucleótido |
| GAPDH | Gliceraldehido-3-Fosfato Deshidrogenasa |
| GCs | Guanilato Ciclasa Soluble |
| GMPc | Guanosin-Monofosfato Cíclico |
| g | Gramos |

| | |
|-------------------------------|---|
| GRAS | <i>Generally Recognized As Safe</i> |
| GTP | Guanosina Trifosfato |
| H4B | Tetrahidrobiopterina |
| IDA | Ingesta diaria admisible |
| IFN-g | Interferón Gamma |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| IL-2 | Interleucina 2 |
| IL-4 | Interleucina 4 |
| iNOS | Óxido Nítrico Sintetasa Inducible |
| JECFA | <i>Joint Expert Committee on Food Additives</i> |
| KOH | Hidróxido de potasio |
| LADMA | N-N-dimetil-L-arginina asimétrica |
| L-NAME | L-nitro-arginina-metil-ester |
| L-NIO | Niminoetil-L-ornitina |
| L-NMMA | Nmonometil-L-arginina |
| L-NNA | Nnitro-L-arginina |
| mg | Miligramo |
| mL | Mililitro |
| mmHg | Milímetro De Mercurio |
| mRNA | RNA mensajero |
| MTT | Metil tiazol tetrazolium |
| N ₂ O ₃ | Dinitrógeno Trióxido |

| | |
|-----------------------------|--|
| NADPH | Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato |
| nm | Nanometro |
| nNOS | Óxido Nítrico Sintetasa Neuronal |
| NO | Óxido nítrico |
| NO ₂ | Dióxido De Nitrógeno |
| NOS | Óxido Nítrico Sintetasa |
| O ₂ ⁻ | Anión Superóxido |
| OH ⁻ | Radical Hidroxilo |
| ONOO | Peroxi Nitrito |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| PG | Prostaglandinas |
| RNA | Ácido Ribonucleico |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RPMI | Medio celular <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| SCF | <i>Scientific Committee on Food</i> |
| SH ⁻ | Radical Sulfhidrilo |
| TAE | Tris, ácido acético y EDTA |
| ug | Microgramos |
| uL | Microlitro |
| UV | Ultravioleta |
| v | Voltios |

RESUMEN

En la actualidad la stevia se usa como edulcorante para diabéticos y en productos para bajar de peso. La stevia es prometedora como agente inmunomodulador ¹, pues actúa mediante la estimulación de la inmunidad celular y la función fagocítica. Por otro lado, el óxido nítrico (NO) se ha reportado que cumple un rol importante en la respuesta inmune, pero su producción no regulada ha sido asociada a diversas patologías (ej. inflamación crónica). El NO puede causar daño en los tejidos adyacentes, por lo que requiere un control en su producción, en sus efectos y en su papel como mensajero celular.

En el presente trabajo de investigación se utilizó un extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* para evaluar su efecto sobre la viabilidad, producción de NO y producción del gen iNOS en macrófagos peritoneales.

Los macrófagos fueron obtenidos de la cavidad peritoneal de ratas blancas (*Rattus norvegicus*) variedad Wistar de aproximadamente unos 3 a 4 meses de edad con pesos entre 300 a 400 gramos. El extracto fue incubado con los macrófagos en diferentes concentraciones: 25, 50, y 100 µg/mL.

Inicialmente, se utilizó el método de MTT (metil tiazol tetrazolium) para evaluar el efecto del extracto sobre la viabilidad de los macrófagos a las 12, 24 y 48 horas. Asimismo, se determinó la producción de NO a las 1.5, 3, 6, 12 y 24 horas de

tratamiento con las concentraciones mencionadas arriba usando la técnica del reactivo de Griess. Finalmente, se obtuvo el RNA y se realizó la síntesis de cDNA (ADN complementario) usando la técnica de PCR para evaluar la expresión del gen iNOS.

Los resultados obtenidos demuestran que el extracto de *Stevia rebaudiana* no afectó significativamente ($P>0.05$) la viabilidad de los macrófagos a los tiempos y concentraciones evaluadas. Asimismo, el extracto provocó una disminución significativa ($P<0.05$) en la producción de NO en una manera dependiente de la concentración (a mayor concentración de extracto de *Stevia rebaudiana*, menor producción de NO). Finalmente, el tratamiento fue capaz de disminuir la expresión del RNA mensajero (mRNA) del gen iNOS en una manera dependiente de la concentración luego de 3 horas de tratamiento.

En conclusión, tratamientos con mayores concentraciones de *Stevia rebaudiana* produjo menores concentraciones de NO y menor expresión del gen iNOS. Estos resultados nos indicarían que la *Stevia rebaudiana* podría ser usado para la regulación de la presión arterial en individuos con problemas de vasodilatación arterial.

Palabras clave: *Stevia rebaudiana*, extracto, macrófagos, MTT, RNA, cDNA, PCR, óxido nítrico, gen iNOS.

ABSTRACT

Currently, the stevia is used as a sweetener for diabetics and in products for losing weight. The stevia is promising as an immunomodulatory agent because it stimulates the cellular immunity and the phagocyte function. On the other hand, the nitric oxide (NO) has been reported to play an important role in the immune response, however its unregulated production may be associated to several pathologies (e.g., chronic inflammation). The NO may cause damage to the adjunct tissues. Therefore, its production needs to be controlled, especially in its effects and role as cellular messenger.

In this study, it has been used the *Stevia rebaudiana* to evaluate its effect on the viability, production of NO and production of gen iNOS in peritoneal macrophages.

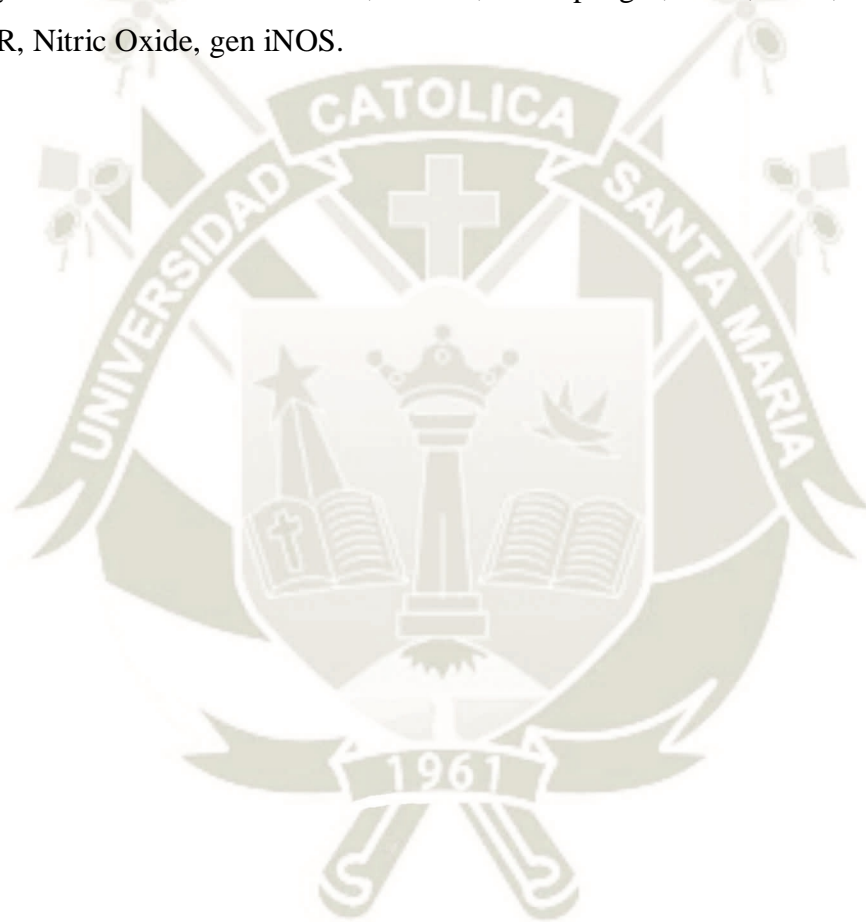
The macrophages were obtained from the peritoneal cavity of white rats (*Rattus norvegicus*) variety Wistar between 3 to 4 mo and 300 to 400 gr weight. The stevia extract was incubated with the macrophages in different concentrations: 25, 50, y 100 $\mu\text{g/mL}$.

Firstly, the method of MTT (metil tiazol tetrazolium) was used to evaluate the effect of the extract on the viability of the macrophages at 12, 24, and 48 hours. Likewise, the production of NO was determined at 1.5, 3, 6, 12 y 24 hours of treatment with the above concentrations and using the reactive Griess. Finally, the RNA was obtained and the cDNA (complementary DNA) was synthesized using the PCR to evaluate the expression of the gen iNOS.

Our results shown that the *Stevia rebaudiana* did not affect significantly ($P>0.05$) the viability of macrophages to the evaluated time and concentrations. In addition, the decreased significantly ($P<0.05$) the production of NO in a concentration dependant manner (the greater concentration, the lesser production of NO). Finally, the treatment was able to of decrease the expression of messenger RNA (mRNA) of the gen iNOS in the same manner described above after 3 hours of treatment.

In conclusion, treatments with greater concentration of *Stevia rebaudiana* induced lesser concentrations of NO and lesser expression of the gen iNOS. These results may indicate that the *Stevia rebaudiana* may be used to regulate the arterial blood pressure in patients with problems of arterial vasodilatation.

Key words: *Stevia Rebaudiana*, Extract, macrophages, MTT, RNA, mRNA, cDNA, PCR, Nitric Oxide, gen iNOS.



INTRODUCCIÓN

Durante siglos, los pueblos indígenas guaraníes de Paraguay usaron las hojas de la *Stevia* como edulcorante natural para el mate y otras infusiones. Tradicionalmente, secaban las hojas y las usaban para endulzar, las masticaban para percibir su sabor dulce o las empleaban en la medicina tradicional. El naturalista suizo Moisés Bertoni fue el primero en describir la especie que crecía en el Alto Paraná. Posteriormente, el químico paraguayo Ovidio Rebaudi publicó en 1900 el primer análisis químico que se había hecho de ella. La especie fue bautizada oficialmente por Bertoni en su honor como *Eupatorium rebaudiana*, o *Stevia rebaudiana*. Ovidio Rebaudi consiguió aislar los dos principios activos, conocidos actualmente como el “esteviósido” y el “rebaudiósido”².

Sin embargo, las dificultades para la germinación de las semillas hicieron que un intento de exportarlas a Gran Bretaña para cultivarlas comercialmente durante la Segunda Guerra Mundial resultara infructuoso. En la década de 1970, Japón fue el primer país en adoptar comercialmente el uso de la *Stevia*. En Paraguay el cultivo a gran escala comenzó en esos años y, desde entonces, se ha introducido paulatinamente en los mercados de todas partes del mundo: Argentina, Francia, España, Colombia, Bolivia, Perú, Corea, Brasil, México, Estados Unidos, Canadá, y sobre todo en China, hoy el principal productor, Malasia, Australia y Nueva Zelanda, entre otros³. Tanto las hojas secas como el extracto de las mismas se han ido empleando como sustitutos del ciclamato, la sacarina y otros edulcorantes artificiales, con el claro beneficio de ser natural⁴.

Su uso se fue aprobando en la forma de aditivos alimentarios en muchos países de todo el mundo y en 2008 en Estados Unidos, los extractos altamente purificados recibieron la categoría de GRAS (*Generally Recognized As Safe*: sustancia reconocida como segura). En Europa su uso como alimento ha sido aprobado por la Unión Europea en noviembre de 2011, aunque durante el 2010 hubo una ventana legal en la comercialización que permitió su distribución en Francia⁵.

Hipótesis

Si la *Stevia rebaudiana* posee efecto vasodilatador, es posible que la incubación de macrófagos en un medio de cultivo conteniendo extracto de *Stevia rebaudiana* pueda disminuir la producción de óxido nítrico (NO) e inhibir la expresión del gen iNOS.

Objetivos

Objetivo general

Estudiar el efecto del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* sobre la producción de NO y la expresión del gen óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) en macrófagos murinos.

Objetivos específicos

1. Obtener el extracto acuoso de *Stevia rebaudiana*.
2. Evaluar el efecto del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* en la viabilidad celular de macrófagos por metil tiazol tetrazolium (MTT).
3. Evaluar el efecto del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* en la concentración de óxido nítrico en un cultivo de macrófagos murinos.
4. Evaluar la expresión del gen iNOS en un cultivo de macrófagos por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. *Stevia rebaudiana*

La stevia es una planta de la especie *Stevia rebaudiana* de la cual se obtienen varios beneficios como endulzante. Esta planta cuyo nombre científico es *Stevia Rebaudiana Bertoni* es una asteraceae de la familia de los crisantemos (*Crysanthemum Compositae*), planta originaria de la flora sudamericana que se criaba espontáneamente en el hábitat semiárido de las laderas montañosas de Paraguay. Fue descrita por primera vez en 1887 por el científico Antonio Bertoni, sin embargo; los indios guaraníes ya la utilizaron desde tiempos precolombinos, endulzando sus comidas y bebidas, ellos la llamaron “kaa- hee”, que significa “hierba dulce”. La planta es herbácea y perenne, con hojas simples tal como se observa en la figura 1, inflorescencia capitular y frutos denominados botánicamente aquenios ⁶.



Figura 1 *Stevia Rebaudiana* ⁴³

El cultivo puede realizarse en la mayoría de los suelos de los países cálidos o templados. La planta puede crecer relativamente bien y se puede adaptar a gran variedad de terrenos y climas. El género es nativo de regiones subtropicales y tropicales de Sudamérica, Centroamérica y México, con varias especies que pueden ser encontradas tan al norte como Arizona, Nuevo México y Texas ⁶.

Los glucósidos de esteviol encontrados en las hojas de *Stevia rebaudiana*, con sus respectivos porcentajes son:

Esteviósido (5–10%) $C_{38}H_{60}O_{18}$; Rebaudiósido A (2–4%) $C_{44}H_{70}O_{23}$; Rebaudiósido C (1–2%) $C_{44}H_{70}O_{22}$; Dulcósido A (0.5–1%) $C_{38}H_{60}O_{17}$; Rebaudiósido B $C_{38}H_{60}O_{18}$; Rebaudiósido D $C_{50}H_{80}O_{28}$; Rebaudiósido E $C_{44}H_{70}O_{23}$. Los últimos tres se encuentran presentes únicamente en cantidades minúsculas ⁷.

Los extractos refinados de *Stevia rebaudiana*, polvo blanco conteniendo 85 - 95% de esteviósido, son 200 a 300 veces más dulces que el azúcar. La *Stevia rebaudiana* endulza más y sin los efectos negativos que produce el consumo de azúcar blanca, esto hace que *Stevia rebaudiana* sea un buen sustituto natural, completamente seguro para los diabéticos. Se puede emplear la *Stevia rebaudiana* en extractos crudos (hoja de plantas criollas), así como en presentación líquida o sólida de color oscuro, ya que al ser procesados los extractos en laboratorio podemos obtener un poderoso edulcorante y sustituto del azúcar. La *Stevia rebaudiana* puede usarse de muchas formas, cada una de ellas con una presentación diferente: como una simple infusión, en forma líquida o en forma de cristales solubles, y cada una de estas tendrá diferentes propiedades o aplicaciones. Muchos de los usos de *Stevia rebaudiana* son conocidos, como: edulcorante de mesa, en bebidas, en pastelería, en dulces, en confituras, en mermeladas, en yogures, en chicles, etc. El mercado de *Stevia rebaudiana* es atractivo por su crecimiento en volumen y precios, por lo que representa una magnífica oportunidad de diversificación agrícola e introducir el cultivo orgánico de este producto exportable en nuestro país ⁷.

El gusto de *Stevia rebaudiana* tiene un comienzo lento y una duración más larga que la del azúcar, y algunos de sus extractos pueden tener un retrogusto amargo o a regaliz en altas concentraciones ⁷.

Esta planta tiene excelentes propiedades edulcorantes y medicinales, destacando su acción antidiabética. Se han realizado muchos estudios de los cuales se deduce que es una planta antiácida, antibacteriana bucal, cardiotónica, digestiva, diurética,

edulcorante, hipoglucemiante, hipotensora, mejoradora del metabolismo y vasodilatadora. Tiene efectos beneficiosos en la absorción de la grasa y la presión arterial ⁶.

Las investigaciones médicas que se han realizado acerca de ciertas especies del género han demostrado sus posibles beneficios en el tratamiento de la obesidad y la hipertensión arterial. El consumo de los extractos de sus plantas tiene un efecto insignificante sobre los porcentajes de glucosa en la sangre, lo que también hace atractivos a estos para usos no medicinales como edulcorantes naturales ⁷.

1.1.1. Taxonomía

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Sub clase: Asteridae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: Stevia

Especie: *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni

La *Stevia rebaudiana* es una planta subfruticosa, con tallo anual, sub-leñosa, levemente pilosa en las extremidades, es ramificada formando múltiples brotes con tendencia a inclinarse pudiendo alcanzar hasta 1.20 m de altura (Anexo 1). La raíz es perenne, fibrosa, filiforme, abundante, formando cepa. Las hojas son pequeñas (5 cm de longitud y 2 cm de ancho), lanceoladas, muy dulces, festonadas, opuestas en verticilos alternados, sésiles; la parte más ancha de la hoja se encuentra en la mitad de la parte superior. Las flores se hallan dispuestas en capítulos pequeños (7-15 mm), terminales o auxiliares y agrupadas en panículas corimbosas, de lóbulos blancos. El fruto es un aquenio delgado y plumoso ⁸.

1.1.2. Etimología

Stevia: En honor al botánico español Pedro Jaime Esteve (1500–1556), profesor de Física y Matemáticas en la Universidad de Valencia, que investigó por primera vez *Stevia rebaudiana*, entre otras plantas que llegaron de América a Valencia.

1.1.3. Carcinogenicidad y genotoxicidad

Hasta el momento no se ha demostrado que la *Stevia rebaudiana* ni sus componentes presenten capacidad carcinogénica ni genotóxica, hecho constatado con experimentos con consumo de altas dosis de esteviósidos in vivo que fueron eliminados a las pocas horas de su consumo sin producir efectos adversos⁹ e in vitro, siendo las conclusiones que reportaron estos estudios confirmados por la JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives)¹⁰.

1.1.4. Control y legislación mundial y europea

Hasta el momento actual, la regulación sobre el consumo, venta y utilización de la *Stevia rebaudiana* y de los glucósidos de esteviol como edulcorante a nivel europeo ha sufrido diversas modificaciones a lo largo de los años. La evaluación sobre la seguridad alimentaria de la *Stevia rebaudiana* se había llevado a cabo a través del SCF (Scientific Committee on Food) desde 1984 hasta 1999, quien, a lo largo de sus revisiones, consideró que el uso de los glucósidos de esteviol era toxicológicamente no aceptable debido a la falta de datos que confirmaran la seguridad de su uso. A nivel internacional el JECFA se encargó en 2008 de la revisión de la seguridad del uso y consumo de los glucósidos de esteviol¹¹. Ese mismo año, la FDA (Food and Drug Administration) en Estados Unidos y la EFSA (European Food Safety Authority) en Europa, aprueban la utilización de los glucósidos de esteviol como edulcorantes. Posteriormente se transfirieron las funciones a la EFSA, que, en 2010, y sólo tras la revisión a nivel internacional de la JECFA de 2008, publicaron por primera vez a nivel europeo una opinión científica que respaldaba la seguridad en el uso de los glucósidos de esteviol como edulcorantes alimentarios⁵. En Europa, el uso y comercialización de los aditivos alimentarios, están regulados por el Reglamento (CE) n° 1333/2008 del

Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre los aditivos alimentarios; y modificado por múltiples reglamentos de años posteriores. En lo que respecta a los glucósidos de *Stevia rebaudiana*, se modifica fundamentalmente en el Reglamento (UE) nº 1131/2011 de 11 de noviembre de 2011, basándose en la opinión científica reportada por la EFSA, por lo que, a partir de dicha fecha, los glucósidos de esteviol son incluidos como aditivos alimentarios. Con posterioridad, en el extenso Reglamento (UE) nº 231/2012 de 9 de marzo de 2012, se establecen las especificaciones pertinentes de todos los aditivos alimentarios entre los que se encuentra la *Stevia rebaudiana* en forma de glucósidos de esteviol ¹².

Así mismo han sido publicadas, de forma posterior y hasta la fecha, numerosas modificaciones que regulan su utilización en grupos de alimentos que no estaban incluidos en el Reglamento (UE) nº 1131/2011, tales como: - Frutas y hortalizas para untar, tipo confituras y mermeladas (Reglamento (UE) Nº 913/2013) - Mostaza (Reglamento (UE) 2016/441) - Bebidas de valor energético reducido (Reglamento (UE) 2016/479). En lo relativo a la venta y consumo de la propia planta de *Stevia rebaudiana*, ésta se encuentra bajo la consideración de “nuevo alimento” o “nuevo ingrediente alimentario” pero carece de la autorización pertinente por parte de la Unión Europea que permita su comercialización. Si bien algunos países de la Unión Europea mediante la aplicación de determinadas normativas han conseguido la distribución y venta de la planta de *Stevia rebaudiana* y de sus hojas secas, en España no está permitida ¹².

1.1.5. Ingesta diaria admisible (IDA)

El JECFA a nivel internacional se ha encargado de la revisión de la seguridad de su uso y consumo, estableciendo desde 2008 una IDA para niños y adultos de 4 mg/kg de peso/día ¹¹, y que ha mantenido a lo largo de sus revisiones posteriores. Dicha IDA fue ratificada a nivel europeo por la EFSA, y posteriormente reflejada en el Reglamento (UE) nº 1131/2011 de 11 de noviembre de 2011 ¹².

1.2. Óxido nítrico

La historia del descubrimiento del NO es relativamente nueva los estudios datan de finales del siglo IX y principios del siglo XX. En 1992 fue reconocida la enorme importancia del descubrimiento del NO, cuando fue nominada como la "molécula del año" por la revista *Science* ¹³. En la figura 2 se puede observar la molécula de NO.



Figura 2 Estructura molecular óxido nítrico ¹³

Las investigaciones sobre el NO en fisiología humana se iniciaron con el papel de la regulación de la presión sanguínea, los descubridores de este mecanismo los doctores Ignarro, Furchgott y Murad quienes obtuvieron el premio Nobel de Medicina en 1998. Los mismos que demostraron que existía un sinnúmero de acciones fisiológicas, bioquímicas y patológicas en las que actuaba directa e indirectamente ¹³.

Algunos investigadores lograron descubrir que los macrófagos producían NO después de detectar agentes patógenos, y así eliminar varias células infectadas. Las investigaciones sobre las acciones del NO sobre el sistema cardiovascular y en la respuesta inmunológica se desarrollaron casi simultáneamente, y poco después se da inicio al estudio fisiológico en diversos sistemas biológicos como en el sistema nervioso (hipocampo, área olfativa, área visual) digestivo, pulmonar ¹³.

Mencionar al óxido nítrico, es referirse a un elemento natural en forma de gas, que se encuentra presente en el organismo de los mamíferos y también puede conseguirse abundante en el aire, como producto de la combustión del parque automotor y de las plantas de energía. En modo natural, es un gas incoloro y poco soluble en agua; sin embargo, la industria farmacéutica, luego de varias pruebas, ensayo y error, ha logrado

ponerlo en repisas en forma de suplemento. El uso de estos suplementos, está extendido, especialmente entre los atletas de alto rendimiento, quienes los utilizan como coadyuvante, para aumentar su índice de resistencia cardíaca y para reducir el tiempo de recuperación de los músculos y las lesiones ¹³. Las propiedades físicas que presenta este compuesto son:

- Masa molecular: 44.013 g/mol.
- Temperatura de ebullición: -89.5° C
- Temperatura crítica: 36.4° C
- Presión crítica: 72.6 bar
- Densidad del gas (20° C, 1 bar): 1.843 g/mL.
- Densidad del líquido (p.e, 1 atm): 1.222 g/mL.
- Calor latente de vaporización: 89.9 cal/g.

El NO es producido por una amplia variedad de tipos celulares que incluyen células epiteliales, nerviosas, endoteliales e inflamatorias. La biosíntesis de NO se produce en el proceso de conversión metabólica de L-arginina a L-citrulina. Esta reacción es catalizada por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS), de la cual se han identificado varias isoformas. La isoforma cNOS o isoforma constitutiva a la vez engloba dos isoformas; la isoforma endotelial que se encuentra mayoritariamente en las células endoteliales de la pared de los vasos (eNOS ó NOS tipo III) y la isoforma neuronal, que se encuentra mayoritariamente en la médula espinal, cerebro y sistema nervioso periférico (nNOS ó NOS tipo I). Estas isoformas constitutivas están reguladas por la concentración de calcio intracelular y por el complejo Ca^{+2} /calmodulina. Se encuentran en el citosol y se producen de forma continua durante períodos cortos de tiempo y en pequeña cantidad ¹³.

Existe otra isoforma denominada inducible o tipo macrófago (iNOS) que es inducida por estímulos inmunológicos o inflamatorios. Se produce en grandes cantidades

durante períodos de tiempo prolongados. Su producción es independiente de la concentración de calcio intracelular, produciendo abundante NO y ocasionando con frecuencia reacciones que dan lugar a efectos indeseables ¹³.

Todas las isoformas de la NOS, utilizan para la síntesis de NO, L-Arginina, NADPH (Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato) y oxígeno como sustratos así como observamos en la figura 3. Para que se produzca el NO, también se necesita tetrahidrobiopterina (H4B), flavin adenina dinucleótido (FAD) y Flavinmononucleótido (FMN), el grupo hemo y Ca²⁺/calmodulina como cofactores de la reacción ¹⁴.

La síntesis de NO puede verse disminuida por acción de los inhibidores de la NOS ó por otras sustancias. Entre los inhibidores de la NOS, destacan la Nmonometil-L-arginina (L-NMMA) y la N-N-dimetil-L-arginina asimétrica (LADMA), que en condiciones fisiológicas están en baja concentración, elevándose en condiciones patológicas. Otros inhibidores como la Nnitro-L-arginina (L-NNA), la L-nitro-arginina-metil-ester (L-NAME) y la Niminoetil-L-ornitina (L-NIO) inhiben preferentemente las formas constitutivas y la N-amino-L-arginina y la aminoguanidina inhiben la isoforma inducible selectivamente ¹⁴.

El NO una vez sintetizado, difunde pasivamente a las células subyacentes donde produce un aumento intracelular del guanosin-monofosfato-cíclico (GMPc) mediador de sus efectos fisiológicos, produciendo la contracción del músculo y la dilatación del vaso ¹³.

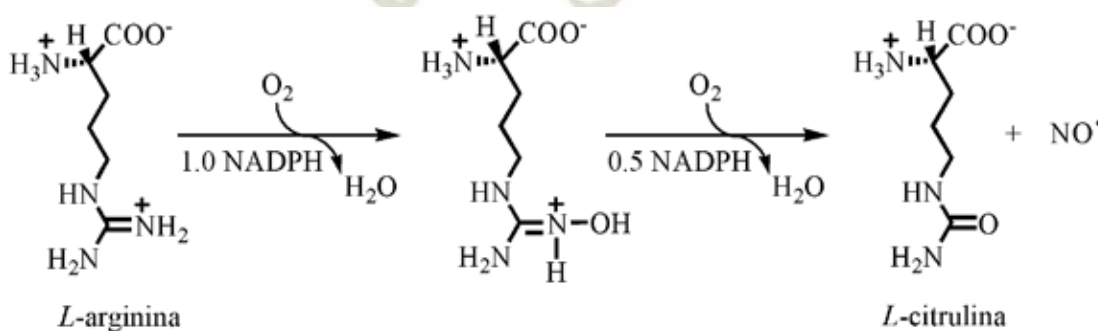


Figura 3 Formación de NO ⁴⁴

1.2.1. Sistema Cardiovascular.

El NO tiene una función vasodilatadora endógena que contribuye a la regulación de la presión arterial ¹⁵. Se ha comprobado que inhibe la agregación plaquetaria, y que se opone a la adhesión de las plaquetas a fibras de colágeno y otras proteínas adhesivas ¹⁶. Protege contra la hipoxia pulmonar, controla la circulación colateral y está implicado en el proceso fisiológico de erección del pene ¹⁷.

Su relevancia clínica en determinadas patologías se debe a su implicación en estas funciones.

En insuficiencia cardíaca congestiva, existe un aumento de los radicales libres del oxígeno, lo que ha llevado a postular que se produzca una inactivación del NO. Existen estudios que relacionan concentraciones fisiológicas de NO en circulación coronaria con una contractibilidad, mientras que concentraciones mayores se asocian a un descenso de la misma ¹⁷. Es decir, el NO a dosis altas produce un efecto inotrópico negativo y a dosis bajas un efecto inotrópico positivo, siendo por tanto dosis bajas de NO útiles en insuficiencia cardíaca congestiva ¹³.

En hipertensión arterial esencial, el NO se encuentra disminuido. La liberación del NO está implicada en la regulación de la presión arterial por distintos mecanismos. Uno de ellos es por estimulación de la guanilato ciclasa soluble (GCs) la cual convierte al GTP en GMP cíclico, promoviendo de este modo la relajación vascular. Otro posible mecanismo es por la inhibición que el NO puede ejercer sobre el citocromo P450 (CYP). La disminución de la producción de NO produce un defecto en la vasodilatación. Así mismo se produce un aumento de la adhesión y agregación plaquetaria, la quimiotaxis de monocitos y su adhesión endotelial, aumenta la proliferación de las células musculares lisas, lo que favorece la aparición de la hipertensión arterial esencial ¹³.

En la hipertensión inducida en el embarazo, tiene lugar una disminución en la producción de NO en las células endoteliales, el cual está elevado en el embarazo normal. El NO en el embarazo está implicado en la regulación de la función

inmunitaria, plaquetaria y en el mantenimiento de la homeostasis sanguínea tal como se observa en la figura 4. Su déficit, por tanto, en mujeres premenopáusicas está asociado a una vasoconstricción prolongada y al aumento de la agregación plaquetaria ¹³.

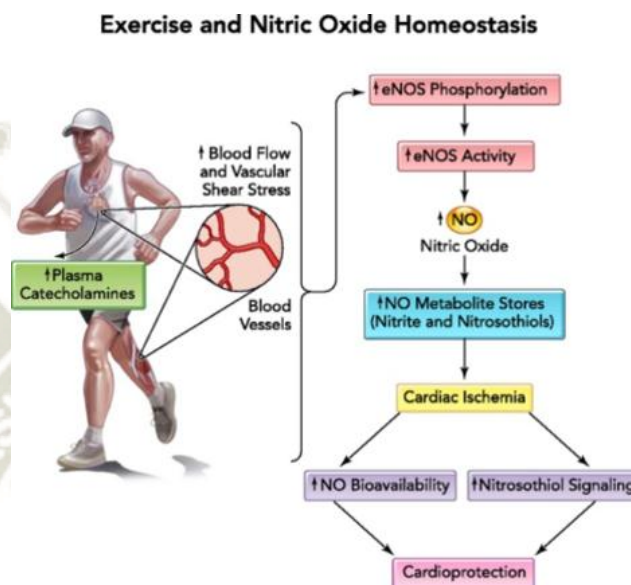


Figura 4 Ejercicio y homeostasis del óxido nítrico¹⁵

1.2.2. Sistema Digestivo

Las acciones del NO en el tubo o aparato digestivo pueden ser directas ejercidas por el mismo, o indirectas a través de reacciones con otras moléculas. Entre las reacciones directas está la reacción con la guanilato ciclasa produciendo CMPc el cual tiene efectos regulatorios e inhibitorios en la inflamación. Pequeñas cantidades de NO estimulan la producción de prostaglandinas (PG) esenciales en los mecanismos de citoprotección de la mucosa del tubo digestivo. La sobre producción de NO por activación de la NOS induce la inhibición de la ciclooxigenasa (COX), alterando el efecto barrera de la mucosa ¹⁸.

Entre las reacciones indirectas, están las relacionadas con la dinitrógeno trióxido (N₂O₃) y peroxi-nitrito (ONOO) producidos por la reacción del NO con los radicales superóxido. Los óxidos formados actúan como oxidantes y en reacciones de nitrosación. Las nitrosaminas y nitrosotioles originados se han relacionado con la

inflamación crónica y con reacciones de nitrogenidad. El NO a nivel de la mucosa gástrica incrementa el flujo sanguíneo e inhibe la adherencia de leucocitos al endotelio en la microcirculación gástrica. Por tanto, es un factor protector de la mucosa que disminuye el riesgo de sangrado gastrointestinal alto ¹⁸.

1.2.3. Sistema Nervioso

A nivel del sistema nervioso el NO actúa como neurotransmisor, sin embargo, tiene un comportamiento diferente al de los neurotransmisores clásicos como se observa en la figura 5. Su vida media es notablemente más larga y no se metaboliza enzimáticamente, sino que se degrada de forma espontánea. No se almacena en vesículas, ni actúa por mecanismos específicos de liberación y captación, penetrando directamente en la célula diana sin la necesidad de receptores de membrana ¹⁹.

Entre las funciones del NO en este sistema se encuentran la autorregulación del flujo vascular, la activación de las fibras parasimpáticas que inervan los vasos cerebrales, el aumento del flujo sanguíneo en la hipercapnia, defensa ante infecciones y participación en procesos de plasticidad neuronal, aprendizaje y memoria. En los últimos años se han realizado diversos estudios que relacionan la participación del NO en numerosos procesos patológicos. Entre estos procesos patológicos se incluyen la enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, esquizofrenia, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), agresiones cerebrales, epilepsia, migraña, etc. ²⁰.

En la enfermedad de Huntington el daño neuronal reduce la expresión de la isoforma nNOS. El NO estaría implicado en mediar la muerte celular producida por la citotoxicidad debida a la alta producción de glutamato. En la enfermedad del Parkinson, el estrés oxidativo puede dar lugar a muerte neuronal y a que se produzcan daños oxidativos en la nitración de proteínas. El NO puede estar relacionado con la producción de radicales hidroxilos (OH^\cdot) ²¹.

En la enfermedad de Alzheimer se han observado alteraciones importantes en la regulación de la NOS ²². Se están realizando estudios que argumentan una implicación importante del NO en las patologías de esclerosis múltiple y ELA. En esclerosis

múltiple se han propuesto tres mecanismos, o bien por acción tóxica del NO ó del peroxinitrito formado por la reacción del NO con el anión superóxido ó por la elevación del cGMP mediado por el NO ²³. En la ELA, se ha propuesto que el NO está implicado y que su síntesis se debe a la isoforma nNOS en estas neuronas ²⁴.

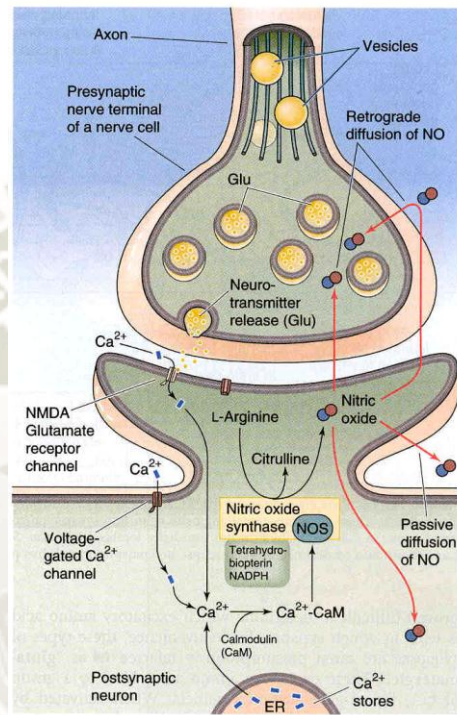


Figura 5 Óxido nítrico sintetasa neuronal ⁴⁵

1.2.4. Sistema Respiratorio

La vasoconstricción pulmonar hipóxica puede estar determinada por una disminución en la liberación de NO. Dicha vasoconstricción hace que la sangre en el pulmón circule a las zonas mejor ventiladas para optimizar su oxigenación ¹³.

En la actualidad se considera demostrada la utilidad del NO en los procesos de hipertensión del neonato de cualquier origen y en hipertensión pulmonar en el paciente pediátrico postoperatorio cardíaco ²⁵. En estos grupos de pacientes con hipertensión pulmonar persistente e hipoxemia severa a consecuencia de la hipertensión, la administración de NO inhalatorio aumenta la oxigenación tisular sin producir

hipotensión sistémica. Por tanto, se trata de una terapéutica beneficiosa sin ser invasiva como sucede en otras terapias para estas patologías ¹³.

Sin embargo, no se han llegado a conclusiones definitivas en el uso del NO en otros pacientes con insuficiencia respiratoria en otras patologías. Así en pacientes con edema de vías aéreas, atelectasia, síndrome de distres respiratorio agudo, neumonías, etc, la utilización de NO no obtiene mejoras notables ²⁶.

1.2.5. Sistema Inmune

La NOS en los macrófagos no es constitutiva, sino inducida. Esta inducción se produce cuando los macrófagos son activados por citoquinas o en la respuesta inmune. El NO producido por los macrófagos, actúa como radical libre y es citotóxico para determinados microorganismos y células tumorales ¹³.

La destrucción de dichos microorganismos ó células se produce por el NO y los productos inorgánicos derivados de él a partir de la arginina. El NO puede oxidar los grupos sulfidrilo (SH^-) de las proteínas y reaccionar con el anión superóxido (O_2^-) para formar dióxido de nitrógeno (NO_2) el cual es fuertemente oxidante y muy reactivo ²⁷.

Las citoquinas relacionadas con los linfocitos TH1 como interleucina 2 (IL-2) e interferón gamma (IFN-g), estimulan a los macrófagos para la producción de NOS. Las citoquinas relacionadas con los linfocitos TH2 como interleucina 4 (IL-4) e interleucina 10 (IL-10) actúan en sentido contrario ¹³.

Moléculas como glutatión oxidasa, glutatión peroxidasa, catalasa y superóxido dismutasa actúan con mecanismos neutralizantes. Vastag y cols apoyan que la acción del NO sobre los vasos sanguíneos en los procesos inflamatorios no es un simple proceso de vasodilatación, sino que en él se encuentra implicado el sistema del complemento entre otros factores ²⁷.

Se había planteado hace tiempo, el papel que el sistema inmunitario podría desempeñar en la formación de nitratos inducida por la endotoxina. Con ello estableció

la relación existente entre el funcionamiento de los macrófagos y la presencia de nitratos. Se demostró que los macrófagos no producían nitratos sino había arginina (que es un aminoácido que suele agregarse al medio de incubación). Esto permitió demostrar que una enzima específica presente en los macrófagos, convertía la arginina en un intermediario químico ¹³.

Este compuesto resultó ser el NO que rápidamente se transforma en nitritos y en nitratos. Otros autores deseaban determinar la capacidad de los macrófagos para matar células tumorales y bacterias. Al cultivar células tumorales con macrófagos advertía que la capacidad de los macrófagos para matar células tumorales desaparecía en cuanto la arginina se eliminaba del medio ¹³.

Demostó con ello que una enzima específica era la responsable de la producción de NO a partir de arginina. Llegándose a la conclusión de que el NO era un gas tóxico para las células tumorales. Cuando los macrófagos se activan mediante endotoxinas o por células T, responden convirtiendo arginina en NO, y este NO, un radical libre muy tóxico, permite a su vez que los macrófagos maten bacterias, hongos y células tumorales ¹³.

Hay que reseñar que el NO es en algunas células citotóxico y en otras citostático lo que sugiere que la respuesta al NO varíe de unas células a otras ¹³.

Se sabe que la citotoxicidad inducida por los macrófagos puede ser inhibida por la presencia de hemoglobina. Desde hace años, se conoce el efecto inhibitorio de la L-arginina en el desarrollo de tumores. Es también posible que otras acciones del NO contribuyan a los efectos citotóxicos de los macrófagos activados. Los macrófagos tratados con sustancias generadoras de NO dan lugar a un aumento de los niveles de GMPc y la producción de NO por los macrófagos en el citosol estimulan a la GCs ¹³.

Por otra parte, se ha supuesto que la vía L-arginina, el NO es un mecanismo primario de defensa contra los mecanismos intracelulares de microorganismos tan patógenos como hongos y helmintos que son demasiado grandes para ser fagocitados ¹³, como se observa en la figura 6.

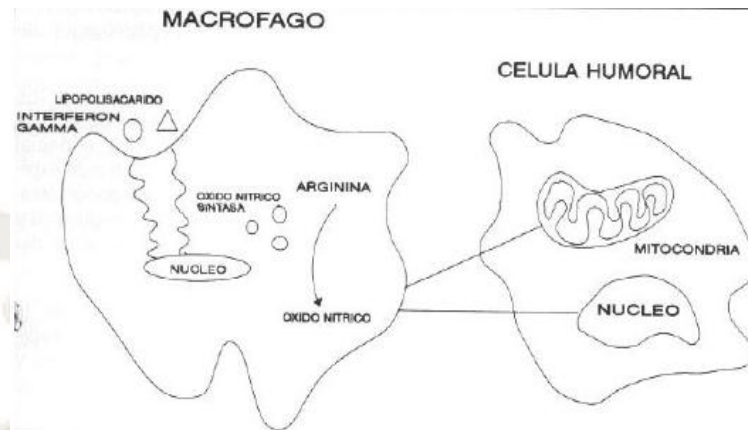


Figura 6 Estimulación inmunológica y liberación de óxido nítrico ¹³

Es sintetizado por las células endoteliales, macrófagos y cierto grupo de neuronas del cerebro. En las neuronas puede funcionar como neurotransmisor, atravesando fácilmente las membranas celulares por su carácter lipófilo. Cuando es producido en las células endoteliales de los vasos sanguíneos funciona como regulador paracrino; difunde al interior de las células musculares lisas, donde induce la producción de GMPc por la enzima guanilato ciclasa, que a su vez produce un efecto de relajación en la musculatura con vaso y broncodilatación. Los macrófagos sintetizan NO para destruir los microorganismos que han sido fagocitados ¹³.

Todo esto ha hecho que tenga grandes aplicaciones directas en medicina.

Finalmente, el NO también sirve como conservante. Es liberado del nitrito que se utiliza en la conservación de la carne. De hecho, algunos virus y microorganismos liberan NO para matar células ¹³.

1.3. Hipertensión

La hipertensión, también conocida como tensión arterial alta o elevada, es un trastorno en el que los vasos sanguíneos tienen una tensión persistentemente alta, lo que puede

dañarlos. Cada vez que el corazón late, bombea sangre a los vasos, que llevan la sangre a todas las partes del cuerpo. La tensión arterial es la fuerza que ejerce la sangre contra las paredes de los vasos (arterias) al ser bombeada por el corazón. Cuanto más alta es la tensión, más esfuerzo tiene que realizar el corazón para bombear. La tensión arterial normal en adultos es de 120 mmHg cuando el corazón late (tensión sistólica) y de 80 mmHg cuando el corazón se relaja (tensión diastólica). Cuando la tensión sistólica es igual o superior a 140 mmHg y/o la tensión diastólica es igual o superior a 90 mmHg, la tensión arterial se considera alta o elevada. La mayoría de las personas con hipertensión no muestra ningún síntoma; por ello se le conoce como el "asesino silencioso". En ocasiones, la hipertensión causa síntomas como dolor de cabeza, dificultad respiratoria, vértigos, dolor torácico, palpitaciones del corazón y hemorragias nasales, pero no siempre ²⁸.

Muchos factores pueden afectar la presión arterial, incluso: La cantidad de agua y de sal que tenemos en nuestro organismo. Así mismo, el estado funcional de los riñones, el sistema nervioso o los vasos sanguíneos. De otro lado la edad también podría jugar un rol importante ya que a medida que envejecemos los vasos sanguíneos se vuelven más rígidos con la edad. Cuando esto sucede, la presión arterial se eleva ²⁹.

Todos podemos adoptar cinco medidas para minimizar las probabilidades de padecer hipertensión y sus consecuencias adversas ³⁰.

Promover un modo de vida saludable, haciendo hincapié en una nutrición adecuada de niños y jóvenes; reducir la ingesta de sal a menos de 5 g al día (algo menos de una cucharilla de café al día); comer cinco porciones de fruta y verdura al día; reducir la ingesta total de grasas, en especial las saturadas. Evitar el uso nocivo del alcohol, esto es, limitar su ingesta a no más de una bebida estándar al día ³⁰.

Realizar actividad física de forma regular y promover la actividad física entre los niños y los jóvenes (al menos 30 minutos al día). Mantener un peso normal: cada pérdida de 5 kg de exceso de peso puede reducir la tensión arterial sistólica entre 2 y 10 puntos ²⁸.

1.4. Regulación de la expresión génica

Los mecanismos particulares de regulación de la expresión génica varían de una especie a otra. Hasta la fecha, estos mecanismos han sido estudiados de forma detallada en varios organismos, como por ejemplo en la bacteria *Escherichia coli*. El conocimiento de los mecanismos de regulación en las bacterias ha servido como base para estudiar la compleja regulación de la expresión génica en organismos eucariontes, incluyendo la del hombre ³¹.

Indudablemente las células de organismos superiores tienen mecanismos de regulación génica que comparten elementos generales con las bacterias. Sin embargo, entre las células de organismos unicelulares y pluricelulares hay una diferencia importante: la heterogeneidad tanto morfológica como funcional de las células en organismos pluricelulares. Debido a esto, es necesario que existan mecanismos de control precisos de la expresión génica en las diferentes células del organismo, de modo que estas realicen sus funciones de manera adecuada. Por tanto, la regulación de la expresión génica en eucariontes es bastante más complicada y se sabe menos de ella ³¹.

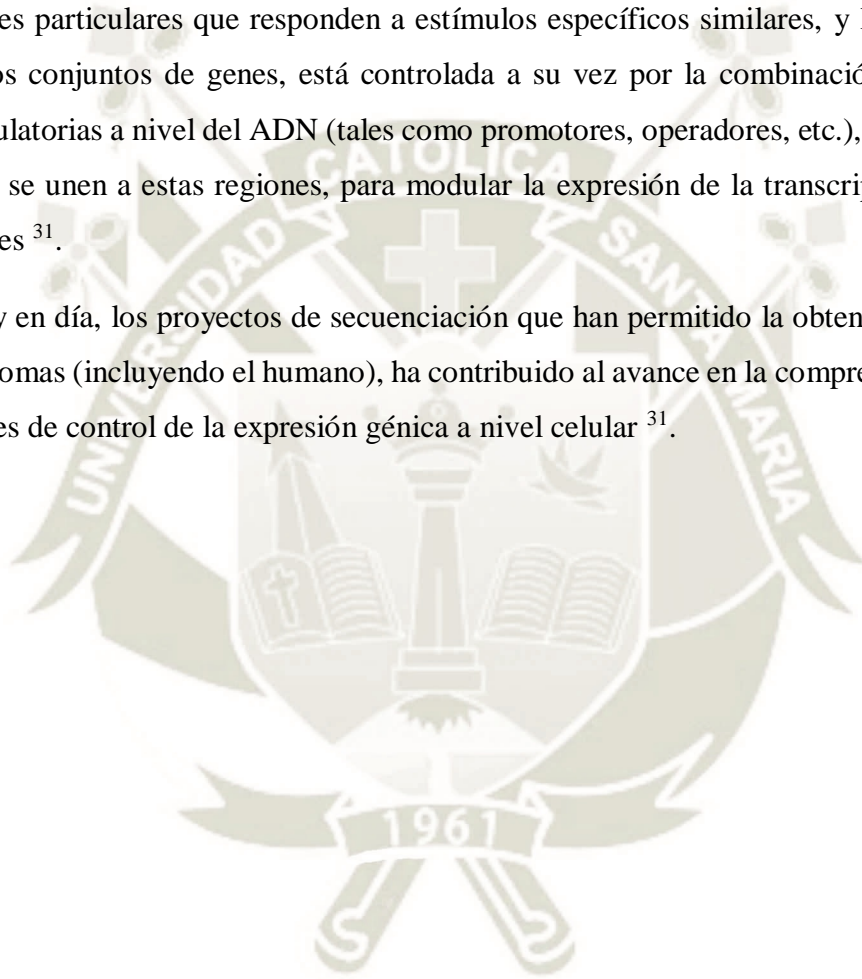
Por ejemplo, en las células de los eucariontes hay varios sistemas génicos encargados de transcribir la información del ADN en copias del ARNm; es decir, hay varios sistemas de ARN polimerasa. Por otro lado, el ADN se encuentra no solo en el núcleo sino también en mitocondrias y cloroplastos, además, muchos de los genes de los eucariontes tienen intrones y exones, a diferencia de los procariontes que solo tienen exones ³¹.

A pesar de todo, se han descrito varios tipos de secuencias regulatorias en los organismos eucariontes, con similitudes importantes a los sistemas de regulación procariontes ³¹.

Pero si hay algo que es común para cualquier organismo, es que la fisiología de cualquier célula procarionte o eucarionte, está bajo el control de redes que regulan la expresión de los genes ³¹.

La estructura y organización de estas redes de control génico, esto es, del conjunto de genes particulares que responden a estímulos específicos similares, y la jerarquía de estos conjuntos de genes, está controlada a su vez por la combinación de regiones regulatorias a nivel del ADN (tales como promotores, operadores, etc.), y de proteínas que se unen a estas regiones, para modular la expresión de la transcripción de estos genes ³¹.

Hoy en día, los proyectos de secuenciación que han permitido la obtención de varios genomas (incluyendo el humano), ha contribuido al avance en la comprensión de estas redes de control de la expresión génica a nivel celular ³¹.



CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material biológico

- Muestra de células peritoneales (macrófagos murinos)

2.2. Medio de cultivo celular

- Medio RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific)
- Antibiótico 100x (penicilina + estreptomina) (Thermo Fisher Scientific)
- Placas de cultivo celular de 24 pocillos (Nest Biotechnology)
- Frasco de cultivo celular de 25 mL (Earthox Life Sciences)

2.3. Reactivos

- Marcador molecular de 100 pares de bases (ABM)
- Suero fisiológico (Medifarma S.A.)
- PBS (Invitrogen)
- DMSO (Life Technologies)
- Hidróxido de potasio 2M (Merck)
- Nitrito de sodio (Merck)
- Etanol de grado absoluto (99.9%) (Sigma-Aldrich)
- Agarosa grado molecular (Merck Milipore)
- Agua destilada
- Sybr Green (Sigma-Aldrich)
- Loading buffer (Sigma-Aldrich)
- TAE 1X (Thermo Fisher Scientific)
- MTT (Sigma)
- Medio EMB (Diproquim)
- Primers iNOS (Biosearch Technologies)
- Primers GAPDH (Biosearch Technologies)
- Supermix (Invitrogen)

2.4. Equipos

- Microscopio invertido con captura de imágenes (Carl Zeiss, Primovert)
- Microscopio óptico (Carl Zeiss, Primo Star)
- Balanza (Kern, ABJ-NM/ABS-N)
- Refrigeradora (Daewoo)
- Conservadora (Inresa)
- Cámara de flujo laminar (BioBase, BB-V800)
- Incubadora de CO₂ (Binder, CB150)
- Vortex (Ika Vortex, Genius-3)
- Autoclave (All American, 25x-2)
- Cámara de electroforesis horizontal (Biometra, Compact XS/S)
- Fuente de poder (BioRad, The powerPac Basic)
- Transiluminador (Biometra, UUV Star 312 NM)
- Centrífuga (Hettich, eba20)
- Microcentrífuga (Eppendorf, MiniSpin Plus)
- Termociclador (Edvotek, EdvoCycler)

2.5. Materiales

- Micro pipetas
- Puntas de micro pipetas
- Tubos Falcon de 15 mL y 50 mL
- Tubos Eppendorf de 1.5 mL
- Micro tubos para PCR
- Jeringas de 10 y 20 mL
- Gorro
- Barbijo
- Guantes de nitrilo
- Placa Petri descartables
- Cámara de Neubauer

2.6. Metodología experimental

2.6.1. Preparación del medio de cultivo

La preparación de 100 mL de medio de cultivo, se realizó en la cámara de flujo laminar para realizar la mezcla de los componentes y que estos no se contaminen. Se añadió 99 mL de medio RPMI 1640 (L-glutamina, 25 mM HEPES) y 1 mL de antibiótico (penicilina + estreptomina).

2.6.2. Inducción de macrófagos murinos

Para la inducción de macrófagos se preparó 50 mL del medio líquido EMB para incubar la bacteria *Escherichia Coli* por un período de 24 horas a una temperatura de 37°C. Se agregó 20 mL del inóculo en un beaker y se llevó a la cocina, una vez alcanzado el punto de ebullición, se redujo el volumen a 1 mL; luego se procedió a inyectar en la parte del abdomen a la *Rattus norvegicus* variedad WISTAR (macho) de aproximadamente unos 300 – 400 g de peso y de 3 a 4 meses de edad. Como se muestra en la figura 7.



Figura 7 Inducción de macrófagos

2.6.3. Obtención de macrófagos

Una vez transcurridas las 48 horas de inyectada la *Rattus norvegicus* variedad WISTAR se sacrificó. Para sacrificar a la *Rattus norvegicus* se realizó de acuerdo a las siguientes normas: se le duerme con cloroformo, luego se corta el cuello con bisturí o tijera para después desangrarla y poder hacer un corte en el abdomen. Se realizaron 2 lavados con suero fisiológico (40 mL); se recolectó en 2 tubos Falcon de 15 mL; los tubos se colocaron en la centrifuga a 2000 rpm x 4'. Por último, se descartó el sobrenadante y se re suspendió el pellet con 1 mL del medio de cultivo (Anexo 3).

2.6.4. Cultivo celular

Se realizó un conteo celular en la cámara de Neubauer para sembrar 500 000 células por pozo aproximadamente tal como se observan en las figuras 8 y 9. Se utilizó 20 uL de macrófagos con 480 uL de medio de cultivo.

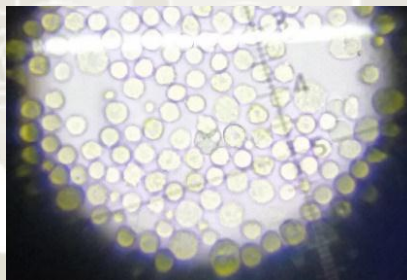


Figura 8 Conteo celular

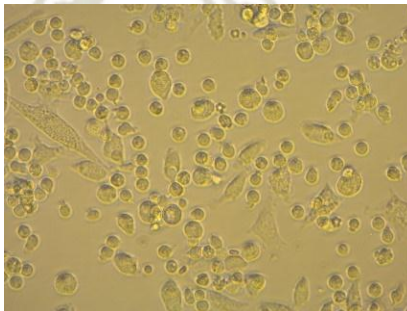


Figura 9 Cultivo celular

2.6.5. Obtención del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana*

Para la obtención del extracto acuoso de stevia se trituraron las hojas secas de stevia y se pesó 100 g los cuales fueron agregados a un beaker con 900 mL de agua destilada. Esta preparación se llevó al ultrasonido por un espacio de tiempo de unos 40' a su máxima capacidad (35 Mhz) con una temperatura de 35⁰C. Después se lleva en tubos Falcon de 15 mL a la centrifuga por 10' a su máxima rpm (10000 rpm). Se recolectó el sobrenadante y se eliminó el pellet. Después de haber realizado el paso anterior se llevó a cabo una filtración al vacío para poder obtener el extracto sin ningún tipo de partícula de las hojas trituradas de *Stevia rebaudiana*. Por último, se llevó el extracto de *Stevia rebaudiana* a placas Petri para llevar a la estufa y se evapore el agua destilada que se utilizó (Anexo 2).

Para la preparación de las concentraciones requeridas se utilizó 10 mg por cada 1 mL de agua destilada. En este paso se utilizaron los filtros millipore de 0.22 μ m para realizar un último filtrado y poder diluir el extracto de *Stevia rebaudiana* a las concentraciones de 25, 50 y 100 μ g/mL y que no contamine el cultivo celular. Como se observa en la figura 10.

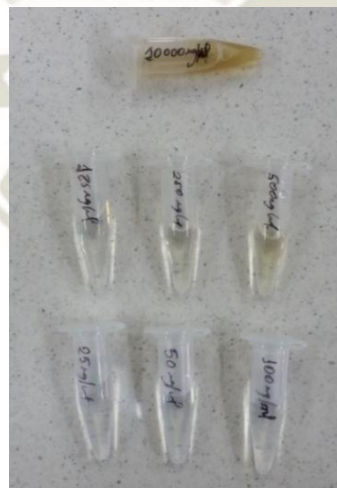


Figura 10 Solución stock y concentraciones utilizadas

2.7. Prueba de citotoxicidad con MTT

Para la preparación se necesita 5 mg del reactivo MTT por cada 1 mL de agua destilada. Una vez pesados los 25 mg que es la cantidad que se utilizará, se introduce a un tubo Falcon y se le añade la cantidad de agua destilada necesaria (5 mL) y se lleva al vortex hasta que esté completamente disuelto y por último se recubre el tubo con papel aluminio para que no esté en contacto con la luz y así no pierda sus propiedades; para su almacenaje se deja en el refrigerador. Se añadió 50 uL de MTT + 450 uL de medio de cultivo y se esperó por un lapso de tiempo de 2 horas. Una vez transcurridas las 2 horas se descartó los 500 uL de medio con MTT. Por último, se le agrego 350 uL de KOH 2M + 350 uL de DMSO. Al juntar estos 2 reactivos cambia de un color translúcido a un purpura claro o de intensidad moderada como puede observarse en la figura 11. Esta prueba se realizó por un espacio de tiempo de 12, 24 y 48 horas respectivamente. Se lleva al espectrofotómetro para leer las absorbancias a una longitud de onda de 570 nm.



Figura 11 Ensayo MTT

2.8. Prueba de óxido nítrico

Para esta prueba se utilizó placas de 24 pozos que contienen 500 uL (50 uL de tratamiento + 450 uL de medio) cada pozo; se llevó a tubos Eppendorf de 1.5 mL con

sus rótulos correspondientes entre tratamientos y horas. Se añadió a cada Eppendorf carbón activado para poder quitarle el color al medio RPMI 1640 y se llevó a la micro centrífuga por un tiempo de 10 minutos a 14500 rpm (velocidad máxima); terminado ese tiempo se retiró el sobrenadante que queda incoloro y se traspasa a un Eppendorf nuevo, para realizar el anterior paso; solo que con un espacio de tiempo de 5 minutos a máxima velocidad (14500 rpm) para terminar de eliminar las pocas partículas de carbón activado que hubieran quedado. Por último, se retiró el sobrenadante con mucho cuidado y se recolectó en un tubo nuevo para añadirle los 500 uL del reactivo de GRIESS (Anexo 4).

Para el reactivo de GRIESS se necesita naftilendiamina y sulfanilamida que se guardan en botellas de color caramelo para que no pierdan sus propiedades. Se utiliza 1:1 de cada uno y se prepara en el momento de usarlo y al hacer contacto con la muestra se espera un tiempo de 10' para que pueda cambiar a un color purpura claro o purpura intenso dependiendo de la cantidad que se haya producido de óxido nítrico de acuerdo a los tratamientos utilizados como se muestra en la figura 12. El último paso fue llevar las muestras al espectrofotómetro y dar lectura de absorbancias a una longitud de onda de 570 nm.



Figura 12 Producción de óxido nítrico

2.9. Extracción de RNA (Ácido ribonucleico)

Para realizar la extracción de RNA de los macrófagos que estaban cultivados en placas de 24 pozos se procedió de la siguiente manera: Primero se retiró la placa de la

incubadora que está a 37 °C y con 5% de CO₂; se llevó la placa a la cámara de flujo laminar para poder retirar los 500 uL de medio con el tratamiento de *Stevia rebaudiana*. Una vez realizado el paso anterior se le añadió 500 uL de PBS 1X a cada pozo para realizar un lavado antes de continuar con la extracción de RNA.

El kit de RNA viene con los siguientes componentes: Buffer de lisis, wash buffer I y II, agua libre de Rnasas, spin cartridge, tubo colector y tubo recolector (Eppendorf 1.5 mL).

Después de haber realizado los pasos anteriores se agregó 600 uL de buffer de lisis que viene en el kit de RNA y se continuó con un lavado del pozo con todas las células pegadas al fondo, se retira el buffer a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se llevó a la centrífuga por un espacio de tiempo de 5 minutos a 14500 rpm velocidad máxima del equipo. Una vez terminado el proceso de centrifugado se retira el sobrenadante a un tubo nuevo Eppendorf de 1.5 mL estéril libre de Rnasas y después se continuó con los pasos de extracción de RNA del kit:

Primero se añadió etanol al 70%, un volumen igual al buffer de lisis (600 uL); se pasó al vortex para mezclar bien, luego se retiró 600 uL de la mezcla y se lleva al spin cartridge con su tubo de recolección y se centrifugó a 10000 rpm por un tiempo de 15 segundos. Repetir una vez más el paso anterior.

Después se añadió 700 uL de Wash Buffer I al spin cartridge centrifugar a 10000 rpm por 15 segundos. El tubo colector se descartó y se colocó uno nuevo. Luego se añade 500 uL de wash buffer II con etanol y se llevó a la centrífuga a 10000 rpm por 15 segundos volver a repetir este paso. Centrifugar el spin cartridge a 10000 rpm por 2 minutos para que la membrana del spin se encuentre seca.

Último paso, se descartó el tubo colector y se procedió a pasar el spin al tubo recolector añadirle 100 uL de agua libre de Rnasas incubar temperatura ambiente por 1 minuto. Para finalizar la extracción se llevó a la centrífuga a 10000 rpm por un tiempo de 2 minutos; se eliminó el spin y se rótulo el tubo recolector y se lleva a la congeladora a -80 °C para su posterior uso y no se degrade el RNA.



Figura 13 Mini Kit RNA

2.10. Síntesis de cDNA

Cuando se realizó la extracción del cDNA se utilizó el kit SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen) como se observa en la figura 14.

Para la obtención del cDNA se necesitan 2 micro tubos de PCR donde al tubo 1 se añade 1 μL de 50 μM Oligo d(T)₂₀, 1 μL 10mM dNTP mix, 15 μL del RNA obtenido de los tratamientos con sus respectivos controles (PureLink RNA Mini Kit), 13 μL de agua DEPC.

Después se llevó a la centrífuga y se le da un spin de 15 segundos para que todos los componentes se mezclen bien y este todo homogéneo, ya que se tiene que trabajar con mucho cuidado porque son cantidades muy pequeñas. Luego de haber realizado el spin en la centrifuga se llevó a una temperatura de 65 °C por un tiempo de 5 minutos y por otro lado incubar después en hielo por 1 minuto.

Se preparó el tubo 2 de PCR con 4 μL de 5x SSIV buffer; 1 μL de 0.1 M DTT; 1 μL de Ribonuclease Inhibitor y 1 μL de SuperScript® IV RT se llevó a la centrifuga para darle un spin de 15 segundos. Una vez completo este paso se añadió la mezcla del tubo 2 al tubo 1 que estuvo incubando en hielo y se vuelve a dar unos 15 segundos en la centrifuga y se lleva a incubar a una temperatura de 55 °C por 10 minutos; después para inactivar la reacción se lleva a 80 °C por 10 minutos, luego de haber terminado

este paso se le agrega 1 μL de *E. coli* RNase H y se incuba a 37 °C por 20 minutos para eliminar cualquier tipo de rastro de RNA que hubiera podido quedar.

Y por último una vez obtenido el cDNA se utiliza de forma inmediata ó se guarda en el congelador a una temperatura de -20 °C para su posterior uso en la amplificación en el equipo de PCR. Todo este protocolo se realiza para cada muestra que se estuvo trabajando y para hacer más fácil el trabajo se realizan cálculos y el tubo 2 se prepara para las 20 muestras obtenidas de RNA.



Figura 14 Kit de cDNA Invitrogen

2.11. Preparación de Primers (iNOS y GADPH)

Para la preparación se añadió la cantidad de agua DEPC (uL) que pide en cada tubo Eppendorf de acuerdo al fabricante. Luego se procede a mezclar los primers forward y reverse 5 uL de cada uno con 90 uL de agua DEPC en un micro tubo y se utiliza de inmediato o se guarda en el congelador a una temperatura de -20°C hasta que se utilicen. Secuencia de primers: iNOS: Forward (5' CTACCTACCTGGGGAACACCTGGG 3'), Reverse (5' GGAGGAGCTGATGGAGTAGTAGCGG 3'); GAPDH: Forward (5' TACCAGCCGGGGGACCAC 3'), Reverse: (5' CGAGCTGACAGAGTAGTA 3').



Figura 15 Primers del gen iNOS y GAPDH

2.12. PCR

Una vez obtenido el cDNA (20 muestras entre tratamientos y controles) se realizó la preparación de los micro tubos rotulándolos bien para no cometer algún error con las muestras y poder tener un orden específico para empezar el análisis. En cada micro tubo se añadió:

- 3 uL de DNA
- 2 uL de primers específicos (iNOS y GADPH)
- 16 uL de agua DEPC (libre de Rnasas)
- 20 uL de supermix

Luego de haber preparado el micro tubo, se llevó al equipo de PCR y se programa con las siguientes características:

95°C por 10 minutos (Hot start)

| | |
|----------------------|-------------|
| 94°C por 40 segundos | } 30 ciclos |
| 55°C por 60 segundos | |
| 72°C por 90 segundos | |

4°C por 4 minutos (Final)

Una vez terminado todo el proceso de la PCR se procede a retirar los micro tubos de la placa como se observa en la figura 16 para realizar una electroforesis o guardarlos en el congelador a -20°C hasta que se utilicen.

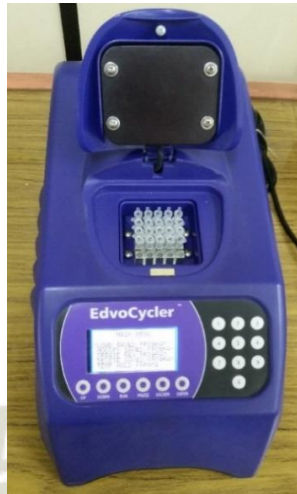


Figura 16 Termociclador PCR

2.13. Electroforesis

Se realizó la preparación del gel de agarosa con 11 pozos para la repartición de las muestras. Para preparar el gel se necesitó 1.5 g de agarosa con 75 mL de TAE (1x) y 7 uL de Sybr Green. Cuando se preparó la muestra se necesitó loading buffer (1 uL) con 5 uL de muestra. Una vez cargados los pozos con las muestras preparadas se añade el marcador (G153). La cámara electroforética esta con TAE (1x) hasta la marca de máximo permisible, se programa la fuente de poder con 100v por un tiempo de unos 40 minutos aproximadamente tal como se observa en la figura 17. Por último, una vez terminado el proceso se lleva el gel de agarosa al transiluminador UV para poder observar las bandas que se obtuvieron en el gel con los distintos tratamientos de las muestras y poder realizar su interpretación.



Figura 17 Cámara de electroforesis

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Obtención del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana*

Se utilizó la técnica de ultrasonido para realizar el extracto porque esta técnica resulta mejor para realizar el extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* que por el método de soxhlet³² y a parte que el método del ultrasonido es más sencillo de utilizar.

En esta investigación solo se usó el ultrasonido para realizar el extracto de *Stevia rebaudiana* en comparación con el otro trabajo de investigación que es para buscar el mejor método de extracción para Glucósidos totales, Esteviósido y Rebaudiósido A³².

En otro trabajo de investigación utilizan también el ultrasonido como método de extracción para realizar extracto acuoso de *Stevia rebaudiana*, pero en esta investigación lo comparan con energía de microondas sobre los niveles de fenoles y flavonoides, y también la capacidad antioxidante³³.

3.2. Citotoxicidad con ensayo de MTT

Según los resultados obtenidos se demostró que el extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* no produjo citotoxicidad con las concentraciones usadas. De manera similar en otras investigaciones los extractos no tuvieron efecto citotóxico³⁵. Estas diferencias pueden explicarse teniendo en cuenta la distinta composición química de las plantas, varía en función del tipo de especie, crecimiento, etc. Las concentraciones que se utilizaron fueron de 25, 50 y 100 ug/mL para poder realizar el análisis y en el ANOVA se obtuvo que no hubo diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$). Similar respuesta se obtuvo en otro trabajo donde se utiliza el ensayo de MTT como método colorimétrico para la actividad citotóxica de los macrófagos in vitro. Se utiliza este ensayo porque es rápido y sensible³⁶.

Tabla 1 Concentración del extracto de *Stevia rebaudiana* sobre la viabilidad de macrófagos murinos a las 12 horas

| Concentración del extracto | Porcentaje |
|----------------------------|----------------------|
| Blanco | 100.0 ^a % |
| 25 ug/mL | 85.2 ^b % |
| 50 ug/mL | 89.6 ^b % |
| 100 ug/mL | 86.3 ^b % |

F=15.6 P<0.05

En la tabla N°1, según el análisis de varianza de un factor de variabilidad (F=15.6) muestra que la viabilidad celular a las 12 horas, tratados a diferentes concentraciones de *Stevia rebaudiana* presento diferencias estadísticas significativas (P<0.05). Se puede observar en el anexo 5.

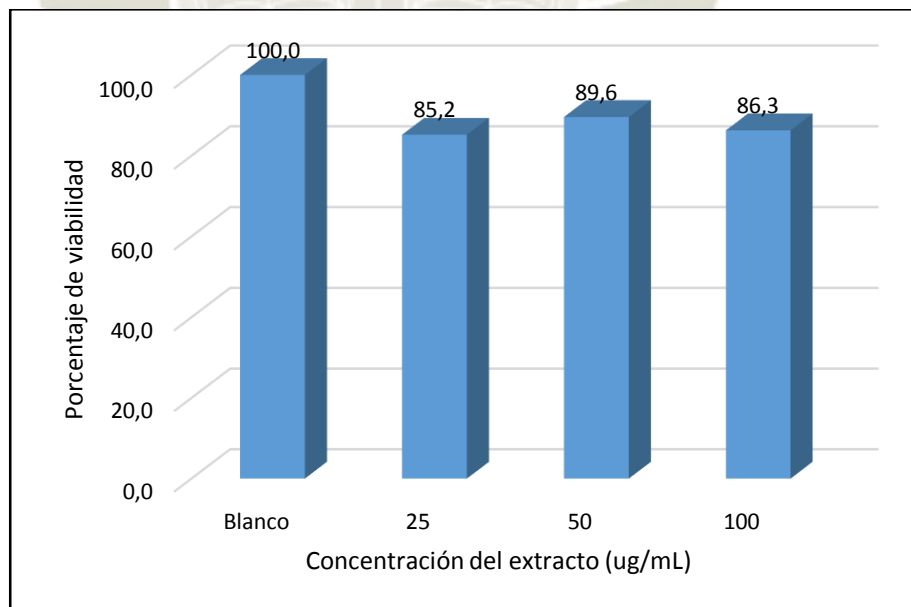


Figura 18 Viabilidad a 12 horas

Tabla 2 Concentración del extracto de *Stevia rebaudiana* sobre la viabilidad de macrófagos murinos a las 24 horas

| Concentración del extracto | Porcentaje |
|----------------------------|----------------------|
| Blanco | 100.0 ^a % |
| 25 ug/mL | 108.1 ^a % |
| 50 ug/mL | 112.4 ^a % |
| 100 ug/mL | 100.2 ^a % |

F=1.7 P>0.05

En la tabla N°2, de acuerdo al análisis de varianza de un factor de variabilidad (F=1.7) muestra que la viabilidad celular a las 24 horas en las diferentes concentraciones de *Stevia rebaudiana* no presentan diferencias estadísticas significativas (P>0.05). Se puede observar en el anexo 5.

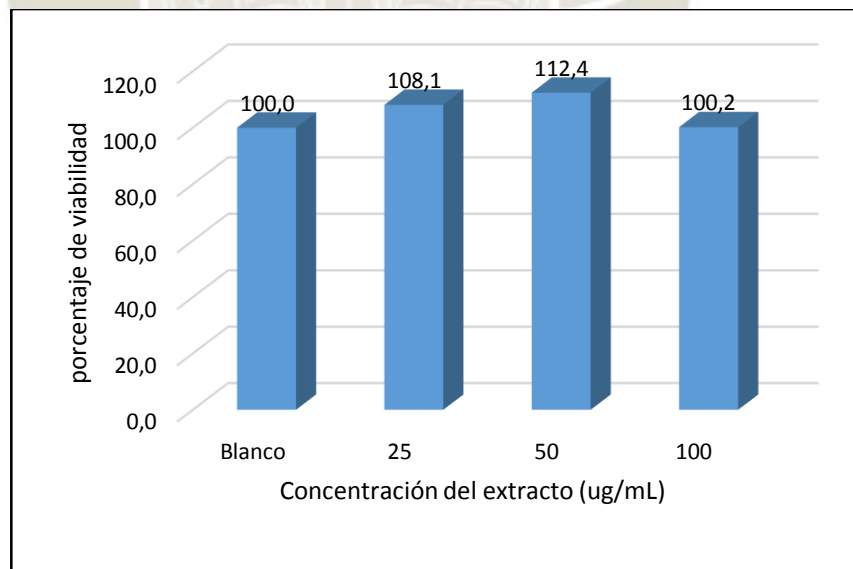


Figura 19 Viabilidad a 24 horas

Tabla 3 Concentración del extracto de *Stevia rebaudiana* sobre la viabilidad de macrófagos murinos a las 48 horas

| Concentración del extracto | Porcentaje |
|----------------------------|----------------------|
| Blanco | 100.0 ^a % |
| 25 ug/mL | 108.6 ^a % |
| 50 ug/mL | 120.4 ^a % |
| 100 ug/mL | 120.7 ^a % |

F=4.5 P>0.05

En la tabla N°3, se muestra que el análisis de varianza de un factor de variabilidad (F=4.5) muestra que la viabilidad celular a las 48 horas con las diferentes concentraciones de *Stevia rebaudiana* no presentaron diferencias estadísticas significativas (P>0.05). Se puede observar en el anexo 5.

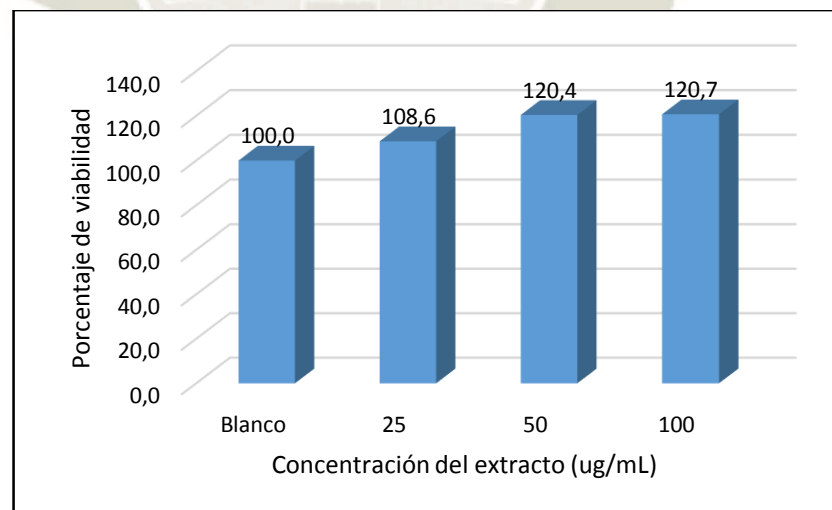


Figura 20 Viabilidad a 48 horas

3.3. Óxido nítrico

Tabla 4 Concentración del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* sobre la concentración de óxido nítrico en macrófagos murinos a las 1.5 horas

| Concentración del extracto | NO |
|----------------------------|--------------------|
| Blanco | .0113 ^a |
| 25 ug/mL | .0114 ^a |
| 50 ug/mL | .0114 ^a |
| 100 ug/mL | .0110 ^a |

F=2.35 P>0.05

En la tabla N°4, demuestra que el análisis de varianza de un factor de variabilidad (F=2.35) muestra que la concentración de óxido nítrico evaluado a las 1.5 horas en macrófagos murinos tratados a diferentes concentraciones de *Stevia rebaudiana* no presento diferencias estadísticas significativas (P>0.05). Se puede observar en el anexo 5.

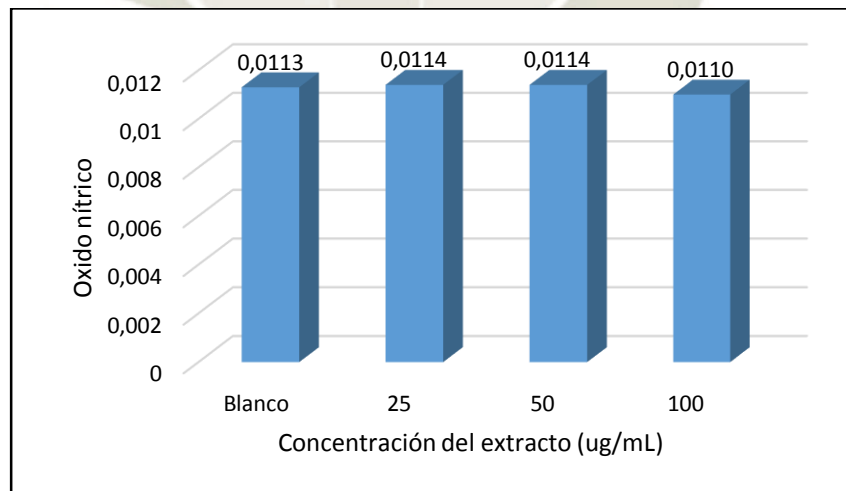


Figura 21 Óxido nítrico a 1.5 horas

Tabla 5 Concentración del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* sobre la concentración de óxido nítrico en macrófagos murinos a las 3 horas

| Concentración del extracto | NO |
|----------------------------|--------------------|
| Blanco | .0113 ^a |
| 25ug/mL | .0117 ^a |
| 50ug/mL | .0114 ^a |
| 100ug/mL | .0117 ^a |

F=2.12 P>0.05

En la tabla N°5, se observa que el análisis de varianza de un factor de variabilidad (F=2.12) muestra que la concentración de óxido nítrico evaluado a las 3 horas en macrófagos murinos tratados a diferentes concentraciones de *Stevia rebaudiana* no presentaron diferencias estadísticas significativas (P>0.05). Se puede observar en el anexo 5.

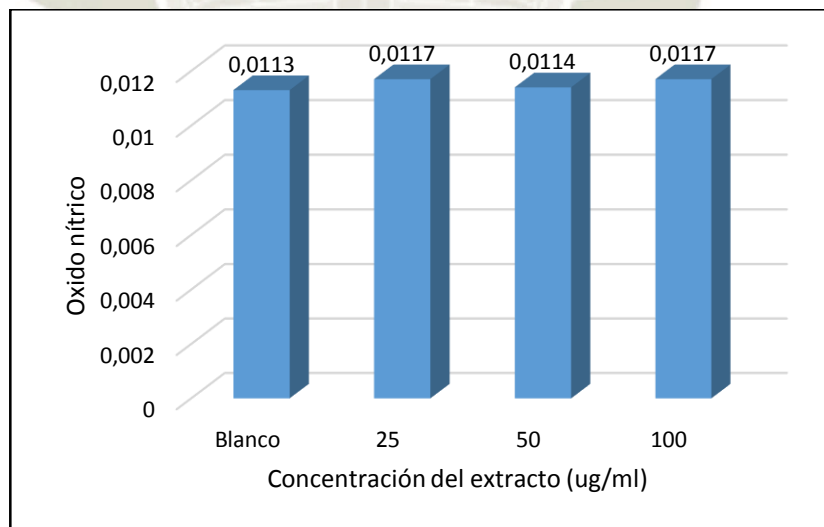


Figura 22 Óxido nítrico a 3 horas

Tabla 6 Concentración del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* sobre la concentración de óxido nítrico en macrófagos murinos a las 6 horas

| Concentración del extracto | NO |
|----------------------------|--------------------|
| Blanco | .0126 ^a |
| 25 ug/mL | .0115 ^b |
| 50 ug/mL | .0115 ^b |
| 100 ug/mL | .0115 ^b |

F=11.16 P<0.05

En la tabla N°6, según el análisis de varianza de un factor de variabilidad (F=11.16) muestra que la concentración de óxido nítrico evaluado a las 6 horas en macrófagos murinos tratados a diferentes concentraciones de *Stevia rebaudiana* presento diferencias estadísticas significativas (P<0.05). En cuanto a la prueba de tukey se encontró la mayor concentración de óxido nítrico se dio en el grupo blanco frente a los grupos tratados a 25, 50 y 100 ug/mL. Se puede observar en el anexo 5.

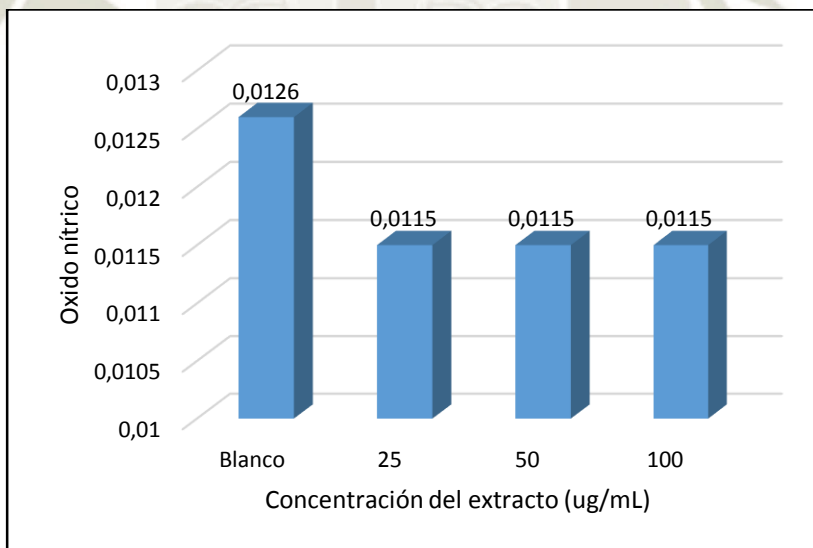


Figura 23 Óxido nítrico a 6 horas

Tabla 7 Concentración del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* sobre la concentración de óxido nítrico en macrófagos murinos a las 12 horas

| Concentración del extracto | NO |
|----------------------------|--------------------|
| Blanco | .0141 ^a |
| 25 ug/mL | .0118 ^b |
| 50 ug/mL | .0116 ^b |
| 100 ug/mL | .0122 ^b |

F=57.02 P<0.05

En la tabla N°7, se refleja que el análisis de varianza de un factor de variabilidad (F=57.02) muestra que la concentración de óxido nítrico evaluado a las 12 horas en macrófagos murinos tratados a diferentes concentraciones de *Stevia rebaudiana* presento diferencias estadísticas significativas (P<0.05). En cuanto a la prueba de tukey se encontró la mayor concentración de óxido nítrico en el grupo blanco frente a los grupos tratados a 25, 50 y 100 ug/mL. Se puede observar en el anexo 5.

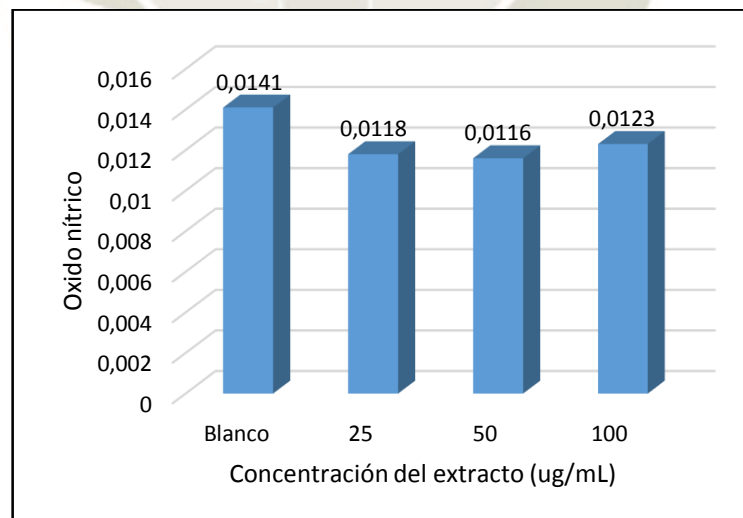


Figura 24 Óxido nítrico a 12 horas

Tabla 8 Concentración del extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* sobre la concentración de óxido nítrico en macrófagos murinos a las 24 horas

| Concentración del extracto | Media |
|----------------------------|--------------------|
| Blanco | .0170 ^a |
| 25 ug/mL | .0134 ^b |
| 50 ug/mL | .0131 ^b |
| 100 ug/mL | .0132 ^b |

F=44.47 P<0.05

En la tabla N°8, según el análisis de varianza de un factor de variabilidad (F=44.47) muestra que la concentración de óxido nítrico evaluado a las 24 horas en macrófagos tratados a diferentes concentraciones de *Stevia rebaudiana* presento diferencias estadísticas significativas (P<0.05). En cuanto a la prueba de tukey se encontró la mayor concentración de óxido nítrico se dio en el grupo blanco frente a los grupos tratados a 25, 50 y 100 ug/mL. Se puede observar en el anexo 5.

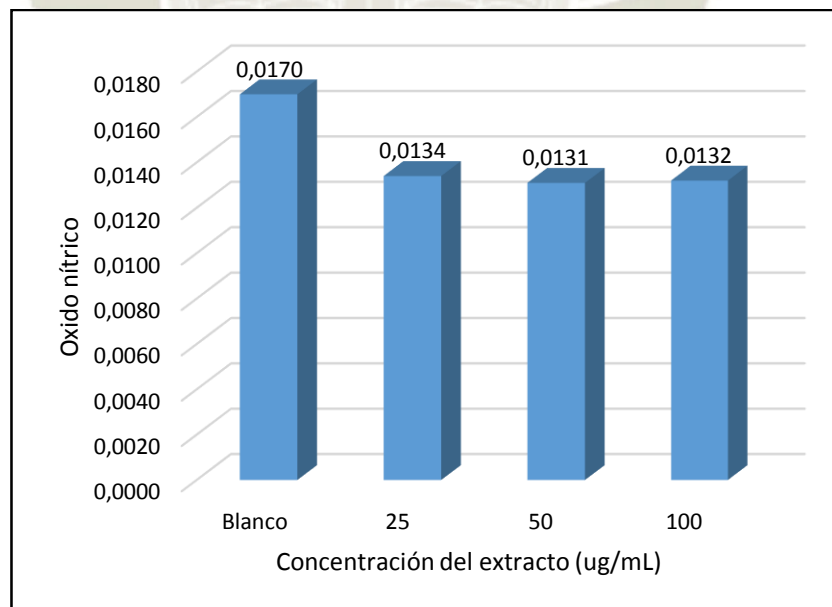


Figura 25 Óxido nítrico a 24 horas

Se encontró que el extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* produjo una disminución significativa del óxido nítrico y la expresión del gen iNOS en una manera dependiente de la concentración del extracto. Niveles elevados de óxido nítrico han sido asociados a respuestas inflamatorias implicadas a diversas patologías tales como inflamación crónica³⁷, vasodilatación excesiva³⁸, artritis reumatoidea. En este sentido resulta de gran importancia la búsqueda de compuestos bioactivos con la capacidad de regular la producción de óxido nítrico por parte de células del sistema inmune como los macrófagos. Los metabolitos secundarios presentes en extractos de plantas representan una fuente importante de moléculas con capacidad inmunomoduladora así se ha reportado³⁵, que la presencia de flavonoides, esteroides, diterpenos, triterpenos, etc. los cuales son conocidos como potentes antiinflamatorios^{39,40}.

3.4. Expresión génica

Con respecto a la expresión del gen iNOS la *Stevia Rebaudiana* puede producir a través de su mecanismo molecular potenciar el NO, así mismo el incremento de su expresión de iNOS lo hace de una forma dependiente de la concentración de *Stevia rebaudiana* encontrando un máximo a los 50 ug/mL, por encima de esta concentración como es de 100 ug/mL la expresión de iNOS va disminuyendo a mayor concentración de extracto. Para la expresión del gen iNOS se obtuvo la información de los primers para GAPDH e iNOS de otro trabajo de investigación; también se indica el procedimiento a seguir para poder realizar RT-PCR⁴¹.

Las bandas obtenidas en la electroforesis del gen iNOS y GAPDH corresponden a las reportadas en otro trabajo de investigación de donde se logró recolectar la información necesaria para realizar las pruebas y análisis correspondientes⁴¹.

La expresión del gen iNOS obtenida por el método utilizado del lisado bacteriano se obtuvo niveles adecuados. Cambiar al LPS en el tratamiento in vitro demostró que el método de inducción del gen iNOS resultó adecuado al presente trabajo de investigación⁴².

3.4.1. Gen iNOS

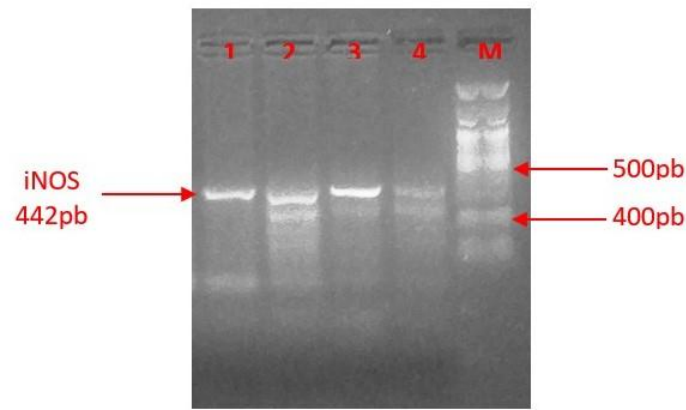


Figura 26 Expresión gen iNOS

En la figura 26 se observa los resultados de RT-PCR correspondiente a la expresión del gen iNOS. En el carril 1 se observa una banda correspondiente al gen iNOS en el grupo control y en los carriles 2, 3 y 4 se observa bandas con las concentraciones de 25, 50 y 100 ug/mL respectivamente de la expresión de este gen de una manera dependiente de la concentración del extracto acuoso de stevia. M=marcador

4. CONCLUSIONES

1. Se logró obtener el extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* a partir de hojas secas a través de ultrasonido.
2. El extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* incrementó la producción de óxido nítrico hasta 50 ug/mL concentración, de 100 ug/mL ó por encima de esta son tóxicos.
3. El extracto acuoso de *Stevia rebaudiana* no presentó un efecto significativo sobre la viabilidad de los macrófagos murinos a las diferentes concentraciones probadas.
4. La concentración del gen iNOS (mRNA) hasta 50 ug/ml tiene un objetivo fisiológico, por encima de 100 ug/mL puede tener un objetivo no fisiológico.

5. RECOMENDACIONES

- Se debería de utilizar las dosis de 25 y 50 ug/mL para los mecanismos moleculares y poder realizar otras investigaciones con más detalle sobre estas dos concentraciones que se llegaron a utilizar en este trabajo de investigación.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Boonkaewwan C, Ao M, Toskulkao C, Rao MC. Specific immunomodulatory and secretory activities of stevioside and steviol in intestinal cells. *J Agric Food Chem.* 2008;56(10):3777–84.
2. Durán S, Rodríguez M, Karla C, Record J. Estevia (*stevia rebaudiana*), edulcorante natural y no calórico *Stevia* (*stevia rebaudiana*), non-caloric natural sweetener. *Rev Chil Nutr.* 2012;39(4):203–6.
3. Yadav AK, Singh S, Dhyani D, Ahuja PS. A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Can J Plant Sci.* 2011;91(1):1–27.
4. Giannuzzi L, Molina Ortiz SE. Edulcorantes Naturales y Sintéticos: Aplicaciones y Aspectos Toxicológicos. *Acta Farm Bonaer.* 1995;14(2):120–31.
5. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific opinion on the safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. *The EFSA Journal.* 2010;8(4):1-84.
6. Salvador-reyes R, Sotelo-herrera M, Paucar-menacho L. Dialnet- EstudioDeLaSteviaSteviaRebaudianaBertoniComoEdulco-4903012. 2014;5:157–63.
7. Juca Pazmiño A, Evaluación del efecto antimicrobiano del extracto de la *Stevia rebaudiana*. 2016;45–6.
8. Delgado Encinas, D. Estudio De Pre-Factibilidad Para La Industrialización Y Comercialización De La *Stevia* (Tesis para optar el Título de Ingeniero Industrial), Lima – Perú, Pontificia Universidad Católica del Perú, 2007.
9. Brusick D. A critical review of the genetic toxicity of steviol and steviol glycosides. *Food and Chemical Toxicology.* 2008;46(7):S83-S91.
10. Carakostas M, Curry L, Boileau A, Brusick D. Overview: the history, technical function and safety of rebaudioside A, a naturally occurring steviol glycoside, for use in food and beverages. *Food and Chemical Toxicology.* 2008;46(7):S1-S10.

11. FAO. Compendium of food additive Specifications: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 69th meeting. Roma: World Health Organization; 2008.
12. AECOSAN. Situación del uso de Stevia rebaudiana Bertoni como ingrediente alimentario. Madrid: Ministerio de Sanidad, Servicio Sociales e Igualdad; 2015.
13. Martín-gil FJ. Síntesis e implicaciones fisiológicas del óxido nítrico. 2014;(January 2006).
14. McCall TS, Feelisch M, Palmer RMJ, Moncada S. Identification of Niminoethyl-L-ornithine as an irreversible inhibitor of nitric oxide synthase in phagocyte cells. *Br J Pharmacol* 1991; 102: 234-238.
15. Pérez A, Rodríguez A, Sanjurjo VM Padrón R. El papel del óxido nítrico en la hemodinamia, hemostasia e inflamación. *Rev Cub Estomatol* 1997; 34: 84-86.
16. Altman R, Scazziola A, Rouvier J. El mecanismo de la trombosis. *Rev Iberoam Tromb Hemost* 1994 7:110-117.
17. Gorocica P., Chávez R., y colaboradores. Oxido Nítrico una molécula multifuncional. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 1999; 12(4):300-304.
18. Rojas E, Arango LAA. Oxido nitrico y aparato digestivo. www.endotelio.com/7.doc
19. Tzeng TB, Fung HL. Pharmacodynamic modeling of the in vitro vasodilating effects of organic mononitrates. *J Pharmacokinet Biopharm* 1992; 20: 227-251.
20. Rodrigo J, Alonso D, Fernández AP, et al. El óxido nítrico; síntesis, neuroprotección y neurotoxicidad. *Anales Sistema Sanitario de Navarra* 2000; 23: 195-236.
21. Jenner P. Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov Disord* 1998; 1: 24-34.
22. Yew DT, Wong HW, Li WP, Lai HW, Yu WH. Nitric oxide synthase in different areas of normal aged and Alzheimer's brains. *Neuroscience* 1999; 89: 675-686.

23. Bagasra O, Michaelis FH, Zheng YM, Bobroski LE, Spistin SV, Fu ZF et al. Activation of the inducible form of nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 12041-12045.
24. Strong MJ. Neurofilament metabolism in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 1999; 169: 170-177.
25. Leif D Nelin, George M Hoffman. The use of inhaled Nitric Oxide in a wide variety of clinical problems. *Pediatric Clinics of North America* 1998; 45.3: 531-548.
26. Alvarez L, Sean M, Haka R, et al. Óxido nítrico: teoría y práctica. *Canarias Pediatría* 1999; 22: 27-32
27. Roskoski R. *Bioquímica*, 3ra. Edición, Editorial Interamericana McGraw-Hill, 2000.
28. Melis, M. Chronic administration of aqueous extract of *Stevia rebaudiana* in rats: renal effects. *J Ethnopharmacol.* 1995. 47(3):129–134.
29. Bermejo Benito P. FACULTAD DE FARMACIA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE TRABAJO FIN DE GRADO Bioquímica, farmacología y toxicología. 2015
30. Ulbricht C, Isaac R, Milkin T, Poole EA, Rusie E, Frimes S, *et al.* An evidence-based systematic review of Stevia by the Natural Standard Research Collaboration. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2010; 8(2): 113-27.
31. PARIS R, NGUYEN-BA-TUOC. *Ann Pharm francaises.* 1954;12(12):794–9.
32. María A, Cortés R, Gabriel V, Landero C, Romero Medina CF, Luz S, et al. Extracción de Steviósido y Rebaudiósido A por métodos no convencionales. XII Encuentro Participación de la mujer en la Ciencia. 2015;(2):1–7.
33. Espert M. Aplicación de ultrasonidos o energía de microondas a la extracción de compuestos antioxidantes en infusiones de hoja de estevia. 2013;15.
34. Pozzolini M, Scarfì S, Benatti U, Giovine M. Interference in MTT cell viability assay in activated macrophage cell line. *Anal Biochem.* 2003;313(2):338–41.

35. Boonkaewwan C, Ao M, Toskulkao C, Rao MC. Specific immunomodulatory and secretory activities of stevioside and steviol in intestinal cells. *J Agric Food Chem.* 2008;56(10):3777–84.
36. Mario, Ferrari., Maria Chiara, Fornasiero., Anna Maria, Isetta. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J Immunol Methods.* 1990;131(2):165–72.
37. Patricia Gorocica Rosete, Raúl Chávez Sánchez, Ricardo Lascurain Ledesma, Blanca Espinosa Mancilla, Edgar Zenteno Galindo. Óxido Nítrico, Una Molécula Multinacional. 1999;3.
38. Nitrico O, Endogeno UNN, Aracelis D, Pérez G, Rosa D, Fuentes A, et al. GUANTANAMO.
39. Nitrico O, Endogeno UNN, Aracelis D, Pérez G, Rosa D, Fuentes A, et al. GUANTANAMO.
40. Galea E, Feinstein DL. Regulation of the expression of the inflammatory nitric oxide synthase (NOS2) by cyclic AMP. *Faseb.* 1999;13:2125–37.
41. *Physiol AJ*, Liver G, Hori M, Kita M, Torihashi S, Miyamoto S. Upregulation of iNOS by COX-2 in muscularis resident macrophage of rat intestine stimulated with LPS Upregulation of iNOS by COX-2 in muscularis resident macrophage of rat intestine stimulated with LPS. 2012;930–8.
42. Sonoki T, Nagasaki A, Gotoh T, Takiguchi M, Takeya M, Matsuzaki H, et al. Coinduction of Nitric-oxide Synthase and Arginase I in Cultured Rat Peritoneal Macrophages and Rat Tissues in Vivo by Lipopolysaccharide. 1997;272(6):3689–93.
43. Gutiérrez Cruz A., Bermejo Benito P., FACULTAD DE FARMACIA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE TRABAJO FIN DE GRADO Bioquímica, farmacología y toxicología de *Stevia rebaudiana*. 2015
44. Talavera-cuevas E, Condes-lara M. COMO MENSAJERO CELULAR EN EL SISTEMA NERVIOSO. 2003;26(2):42–50.
45. Patricia Gorocica Rosete, Raúl Chávez Sánchez, Ricardo Lascurain Ledesma, Blanca Espinosa Mancilla, Edgar Zenteno Galindo. Óxido Nítrico, Una Molécula Multinacional. 1999.

46. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-142.
47. Aznar J, Estelles A. Células endoteliales y hemostasia. En: López Borrasca A, eds. *Enciclopedia Iberoamericana de Hematología*. 1st Ed. Vol. III Salamanca. Ediciones Universidad de Salamanca, 1992:35-47.
48. Martín G. Vila Petroff. Rol y mecanismos subcelulares del óxido nítrico en la regulación de la contractilidad miocárdica. *Rev Fed Arg Cardiol* 29: 501-507, 200.
49. María A, Cortés R, Gabriel V, Landero C, Romero Medina CF, Luz S, et al. Extracción de Steviósido y Rebaudiósido A por métodos no convencionales. *XII Encuentro Participación de la mujer en la Ciencia*. 2015;(2):1-7.
50. Wink DA, Osawa Y, Darbyshire JF, Jones CR, Eshenaur SC, Nims RW: Inhibition of cytochromes P450 by nitric oxide and a nitric oxide-releasing agent. *Arch Biochem Biophys* 1993; 300: 115-123.
51. Óxido Nítrico, protagonista de la enfermedad vascular. *Iladiba* 12(5): 35-38, Mayo, 1998. Diagnóstico in vitro > 2006; Vol 4/76 > San Miguel 2 Revista electrónica DIAGNÓSTICO IN VITRO
52. Norris PJ, Waldvogel HJ, Faull RL, Love DR, Emson PC. Decreased neuronal nitric oxide synthase messenger RNA and somatostatin messenger RNA in the striatum of Huntington's disease. *Neuroscience* 1996; 4: 1037-1047.
53. Rite Gracia S, Ruiz Moreno A, Sánchez Gimeno J, Molina Chica M, Marco Tello A, Rite Montañez. Óxido Nítrico inhalado en el tratamiento de la hipertensión pulmonar persistente del r.n. *An Esp Pediatr* 1999; 51: 181-185.
54. Martin-gil FJ. Síntesis e implicaciones fisiológicas del óxido nítrico. 2014;(January 2006).
55. Cardona Galeano CW, Robledo Restrepo CSM, Rojano CBA, Alzate Guarín CF, Muñoz Herrera DL, Saez Vega CJ. Actividad leishmanicida y antioxidante de extractos de *Piper daniel-gonzalezii* Trel. (Piperaceae). *Rev Cuba Plantas Med*. 2013;18(2):268-77.

ANEXO 1





UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA



CONSTANCIA 08- 2018-HUSA

El Director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

HACE CONSTAR:

Que las muestras de hojas y tallos de la planta traída al laboratorio para el análisis botánico corresponde a la especie *Stevia rebaudiana* (Bert.)Bertoni de la familia Asteraceae de nombre común "Estevia". Dichas muestras fueron obtenidas de cultivo del vivero del Universidad católica Santa María, departamento de Arequipa por IAN PIERRE CHANG ESPINOZA para la ejecución de la Tesis: EFECTO DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Stevia rebaudiana* (ESTEVEIA) SOBRE LA PRODUCCION DE OXIDO NITRICO Y LA EXPRESION DEL GEN INOS EN MACROFAGOS MURINOS de la Facultad de Ingeniería Biotecnológica de la Universidad católica Santa María

Los resultados de dicha identificación y tipificación corresponde a:

DIVISION : MAGNOLIOPHYTA
CLASE: MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE: ASTERIDAE
ORDEN: ASTERALES
FAMILIA: Asteraceae
GENFRO: Stevia
ESPECIE: *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que se estime conveniente.

Arequipa 2 de Abril del 2018



Blgo. Leancio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)

ANEXO 2

Obtención del extracto de Stevia



Figura 27 Trituración de stevia



Figura 28 Obtención del extracto por ultrasonido



Figura 29 Centrifugación del extracto



Figura 30 Filtración con bomba al vacío



Figura 31 Extracto de Stevia rebaudiana



Figura 32 Evaporación en la estufa a 37 grados



Figura 33 Extracto puro de Stevia rebaudiana

ANEXO 3

Extracción de macrófagos



Figura 34 Suero fisiológico para obtención de macrófagos



Figura 35 Extracción de macrófagos

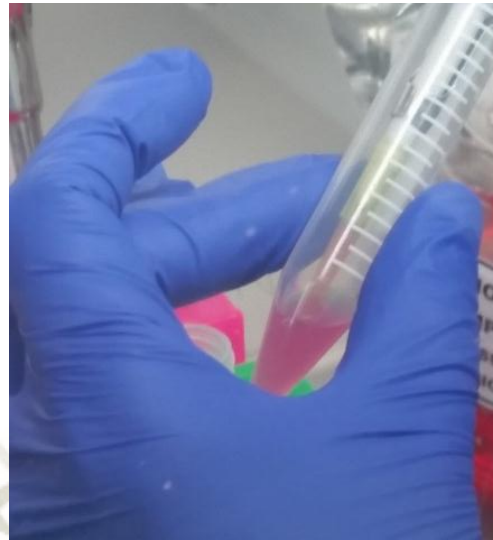


Figura 36 Macrófagos con medio de cultivo

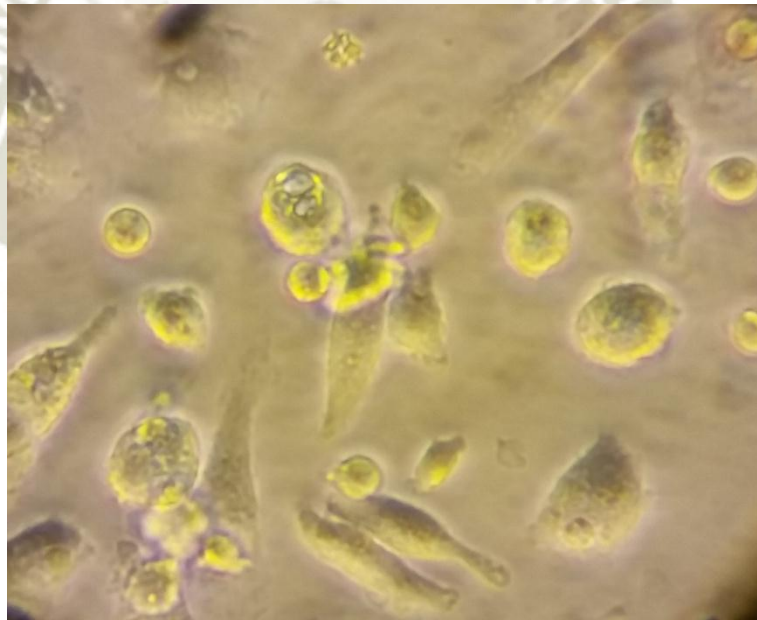


Figura 37 Macrófagos vistos en el microscopio invertido a 40x

ANEXO 4

Óxido nítrico



Figura 38 Reactivo de GRIESS

ANEXO 5

MTT

Tabla 9 Efecto del extracto acuoso de Stevia rebaudiana sobre la viabilidad de los macrófagos murinos a las 12 horas

| Concentración de Estevia | N | Porcentaje | Desviación estándar |
|--------------------------|---|----------------------|---------------------|
| Blanco | 3 | 100.0 ^a % | 0.0000 |
| 25 ug/mL | 3 | 85.2 ^b % | 3.4530 |
| 50 ug/mL | 3 | 89.6 ^b % | 3.5796 |
| 100 ug/mL | 3 | 86.3 ^b % | 3.2078 |

Tabla 10 Efecto del extracto acuoso de Stevia rebaudiana sobre la viabilidad de los macrófagos murinos a las 24 horas

| Concentración de Estevia | N | Porcentaje | Desviación estándar |
|--------------------------|---|----------------------|---------------------|
| Blanco | 3 | 100.0 ^a % | 0.0000 |
| 25 ug/mL | 3 | 108.1 ^a % | 11.6228 |
| 50 ug/mL | 3 | 112.4 ^a % | 9.5133 |
| 100 ug/mL | 3 | 100.2 ^a % | 6.4023 |

Tabla 11 Efecto del extracto acuoso de Stevia rebaudiana sobre la viabilidad de los macrófagos murinos a las 48 horas

| Concentración de Estevia | N | Porcentaje | Desviación estándar |
|--------------------------|---|----------------------|---------------------|
| Blanco | 3 | 100.0 ^a % | 0.0000 |
| 25 ug/mL | 3 | 108.6 ^a % | 7.1529 |
| 50 ug/mL | 3 | 120.4 ^a % | 6.0053 |
| 100 ug/mL | 3 | 120.7 ^a % | 13.4859 |

Óxido nítrico

Tabla 12 Efecto del extracto acuoso de Stevia rebaudiana sobre la concentración de óxido nítrico en macrófagos murinos a las 1.5 horas

| Concentración del extracto | N | Promedio | Desviación estándar |
|----------------------------|---|--------------------|---------------------|
| Blanco | 3 | .0113 ^a | .0002 |
| 25 ug/mL | 3 | .0114 ^a | .0000 |
| 50 ug/mL | 3 | .0114 ^a | .0000 |
| 100 ug/mL | 3 | .0110 ^a | .0003 |

Tabla 13 Efecto del extracto acuoso de Stevia rebaudiana sobre la concentración de óxido nítrico en macrófagos murinos a las 3 horas

| Concentración del extracto | N | Promedio | Desviación estándar |
|----------------------------|---|--------------------|---------------------|
| Blanco | 3 | .0113 ^a | .0002 |
| 25 ug/mL | 3 | .0117 ^a | .0004 |
| 50 ug/mL | 3 | .0114 ^a | .0002 |
| 100 ug/mL | 3 | .0117 ^a | .0002 |

Tabla 14 Efecto del extracto acuoso de Stevia rebaudiana sobre la concentración de óxido nítrico en macrófagos murinos a las 6 horas

| Concentración del extracto | N | Promedio | Desviación estándar |
|----------------------------|---|--------------------|---------------------|
| Blanco | 3 | .0126 ^a | .0001 |
| 25 ug/mL | 3 | .0115 ^b | .0002 |
| 50 ug/mL | 3 | .0115 ^b | .0001 |
| 10 0ug/mL | 3 | .0115 ^b | .0005 |

Tabla 15 Efecto del extracto acuoso de Stevia rebaudiana sobre la concentración de óxido nítrico en macrófagos murinos a las 12 horas

| Concentración del extracto | N | Promedio | Desviación estándar |
|----------------------------|---|--------------------|---------------------|
| Blanco | 3 | .0141 ^a | .0001 |
| 25 ug/mL | 3 | .0118 ^b | .0001 |
| 50 ug/mL | 3 | .0116 ^b | .0005 |
| 100 ug/mL | 3 | .0122 ^b | .0002 |

Tabla 16 Efecto del extracto acuoso de Stevia rebaudiana sobre la concentración de óxido nítrico en macrófagos murinos a las 24 horas

| Concentración del extracto | N | Promedio | Desviación estándar |
|----------------------------|---|--------------------|---------------------|
| Blanco | 3 | .0170 ^a | .0004 |
| 25 ug/mL | 3 | .0134 ^b | .0004 |
| 50 ug/mL | 3 | .0131 ^b | .0005 |
| 100 ug/mL | 3 | .0132 ^b | .0007 |