

ARTÍCULO ORIGINAL

Efecto *in vitro* del esteviol en la viabilidad, migración y contracción del gel de colágeno de fibroblastos renales en presencia de un exceso de glucosa

Unger, Gisela¹; Benozzi, Silvia Fabiana¹; Pennacchiotti, Graciela Laura^{1*}

¹Cátedra Bioquímica Clínica I, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca, Argentina.

*Contacto: Pennacchiotti, Graciela Laura. Universidad Nacional del Sur; San Juan 670, piso 1 (C.P. 8000); Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina; grapen@uns.edu.ar.

Resumen

Introducción: considerando la fisiopatología de la enfermedad renal crónica, resulta de interés evaluar agentes antifibróticos. Objetivo: evaluar el efecto *in vitro* sobre la viabilidad, migración y contracción del gel de colágeno de fibroblastos renales en presencia de concentración alta de glucosa (efecto profibrótico), con y sin esteviol (posible antifibrótico). Material y métodos: se cultivó la línea celular Vero E-6 (ATCC) con concentración normal (GN) y alta de glucosa (GA), con y sin esteviol 10 µg/ml (E10). Se evaluó viabilidad, migración y contracción del gel de colágeno (N = 3). Metodología estadística: ANOVA; diferencia estadísticamente significativa: $p < 0,050$. Resultados: viabilidad (%; p): GN vs GA (100 vs 87; 0,900); GN vs GN-E10 (100 vs 102; 0,999); GN vs GA-E10 (100 vs 94; 0,999); GA vs GA-E10 (87 vs 94; 0,997). Migración (%; p): GN vs GA (26 vs 63; 0,033); GN vs GN-E10 (26 vs 36; 0,775); GN vs GA-E10 (26 vs 32; 0,956); GA vs GA-E10 (63 vs 32; 0,067). Contracción del gel de colágeno (%; p): GN vs GA (31 vs 29; 0,982); GN vs GN-E10 (31 vs 29; 0,982); GN vs GA-E10 (31 vs 7; 0,000); GA vs GA-E10 (29 vs 7; 0,000). Conclusión: la viabilidad no fue afectada por E10. Se observó aumento de la migración con GA, respecto de GN, efecto revertido por E10. El tratamiento en conjunto GA-E10 disminuyó la contracción del gel de colágeno. Resulta de interés profundizar el estudio de los mecanismos implicados en los efectos del esteviol sobre la funcionalidad de fibroblastos renales.

Palabras clave: stevia rebaudiana, esteviol, fibroblastos renales.

In vitro effect of steviol on the viability, migration and contraction of renal fibroblast collagen gel in the presence of excess glucose.

Abstract

Introduction: Considering the pathophysiology of chronic kidney disease, it is of interest to evaluate antifibrotic agents. Objective: to evaluate the *in vitro* effect of steviol (as a possible antifibrotic agent) on the viability, migration and contraction of the collagen matrix of renal fibroblasts, in the presence of high glucose concentration (profibrotic effect). Material and methods: Vero E-6 (ATCC) cells were cultured with normal (NG) and high (HG) glucose concentration, with and without steviol 10 µg/mL (S10). Viability, migration and collagen matrix contraction were evaluated (N = 3). Statistical methodology: ANOVA; statistically significant difference: $p < 0.050$. Results: Viability (%; p): NG vs HG (100 vs 87, 0.900); NG vs NG-S10 (100 vs 102, 0.999); NG vs HG-S10 (100 vs 94, 0.999); HG vs HG-S10 (87 vs 94, 0.997). Migration (%; p): NG vs HG (26 vs 63, 0.033); NG vs NG-S10 (26 vs 36, 0.775); NG vs HG-S10 (26 vs 32, 0.956); HG vs HG-S10 (63 vs 32, 0.067). Collagen matrix contraction (%; p): NG vs HG (31 vs 29, 0.982); NG vs NG-S10 (31 vs 29, 0.982); NG vs HG-S10 (31 vs 7, 0.000); HG vs HG-S10 (29 vs 7, 0.000). Conclusion: The viability was not affected by S10. There was an increase in migration with HG with respect to NG, an effect reversed by S10. The HG-S10 treatment decreased the collagen matrix contraction. It is of interest to deepen the study of the mechanisms involved in the effects of steviol on the functionality of renal fibroblasts.

Keywords: stevia rebaudiana, steviol, renal fibroblasts.

Introducción

Las enfermedades crónicas no transmisibles son patológicas de larga duración cuya evolución es generalmente lenta. Representan una verdadera epidemia mundial que va en aumento, debido al envejecimiento de la población y los modos de vida actuales, que acentúan el sedentarismo y la alimentación inadecuada, entre otros factores. En su conjunto, estas enfermedades son responsables del 60 % de las muertes en el mundo cada año y el 80 % de éstas ocurren en países de bajos y medianos ingresos. Las principales enfermedades crónicas no transmisibles son la diabetes, el cáncer, las enfermedades respiratorias crónicas, la obesidad, la enfermedad cardiovascular y cerebrovascular y la enfermedad renal crónica (ERC) [1]. La ERC es una patología de alta prevalencia (aproximadamente 10 %) y subdiagnosticada, debido a su curso asintomático, un factor que incrementa sustancialmente la morbimortalidad cardiovascular [1, 2].

Cabe destacar que, independientemente de la causa etiológica de la injuria renal, un factor común en el avance de la ERC es el desarrollo de fibrosis intersticial renal. En respuesta a la injuria renal, distintos tipos de células de la circulación son reclutadas en el sitio dañado para participar en la respuesta de cicatrización o reparación de la herida. Cuando este proceso está desregulado, causa fibrosis, donde fibroblastos y matriz extracelular (colágeno tipo I, III y IV, fibronectina, vimentina y proteoglicanos) [3] reemplazan el parénquima renal normal y conducen a una disfunción renal. Debido a que los fibroblastos activados son las principales células efectoras que median la producción de matriz extracelular, el proceso de activación de estas células constituye un evento crucial en la patogénesis de la fibrosis renal, aunque los mecanismos moleculares subyacentes a la activación de dichos fibroblastos no han sido totalmente definidos. Las investigaciones dirigidas a discernir los mecanismos inherentes al proceso de fibrosis y la identificación de potenciales agentes terapéuticos tendrán un gran impacto en la supervivencia de los pacientes con ERC y en el sistema de salud [3-7].

En el contexto de las enfermedades crónicas no transmisibles, existe evidencia de que una alta concentración de glucosa puede estimular la producción de matriz extracelular y conducir al proceso de fibrosis en distintos órganos, incluido el riñón, aunque los mecanismos implicados en la fibrosis inducida por hiperglucemia aún requieren ser esclarecidos [8-12]. Considerando esta evidencia, se decidió utilizar glucosa en alta concentración como condición experimental profibrótica.

En la actualidad, debido a la creciente incidencia de obesidad y diabetes, ha cobrado interés científico y económico el estudio de endulzantes naturales que puedan sustituir la sacarosa. En este sentido, los extractos o derivados de la hoja de *Stevia rebaudiana Bertoni*, planta originaria de América del Sur conocida como Estevia u Hoja de miel, resultan atractivos no solo por sus propiedades endulzantes sino también por sus efectos potencialmente terapéuticos. Los glucósidos de esteviol son los responsables del sabor dulce de la hoja de esta planta y el esteviol es el metabolito que se encuentra mayoritariamente en sangre luego de la ingesta oral de extracto de estevia o sus derivados

[8-12]. Existe evidencia de que el extracto de estevia y/o sus derivados presentan efectos antioxidantes, antihiper glucémicos, antihipertensivos, antiinflamatorios y antifibróticos [17].

Considerando lo anteriormente expuesto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto *in vitro* del esteviol sobre la viabilidad, migración y contracción del gel de colágeno de fibroblastos renales en presencia de una concentración normal y alta de glucosa.

Materiales y métodos

Cultivo celular

Se adquirió la línea celular Vero E-6 (ATCC), compuesta por fibroblastos renales de mono verde africano, en la Asociación Banco Argentino de Células (ABAC, Argentina). Las células fueron cultivadas en botellas venteadas de 75 cm³ (Sigma-Aldrich, USA) con 15 ml de medio base: *Minimum Essential Medium Non-Essential Amino Acids* el cual contiene 0,90 g/L de glucosa (Gibco, USA), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (Natacor, Argentina), 1 % de los antibióticos Penicilina - Estreptomina y con una concentración final de 1 % de L-Glutamina (Sigma-Aldrich, USA). El cultivo se mantuvo a 37 °C en atmósfera húmeda, con 5 % CO₂ y con renovación del medio cada 48 h hasta lograr un 80 % de confluencia, momento en el cual las células se levantaron con solución de tripsina-EDTA 0,25 % (Sigma-Aldrich, USA) y se sembraron a la densidad inicial necesaria para cada ensayo.

Condiciones experimentales

Se definieron los siguientes grupos experimentales:

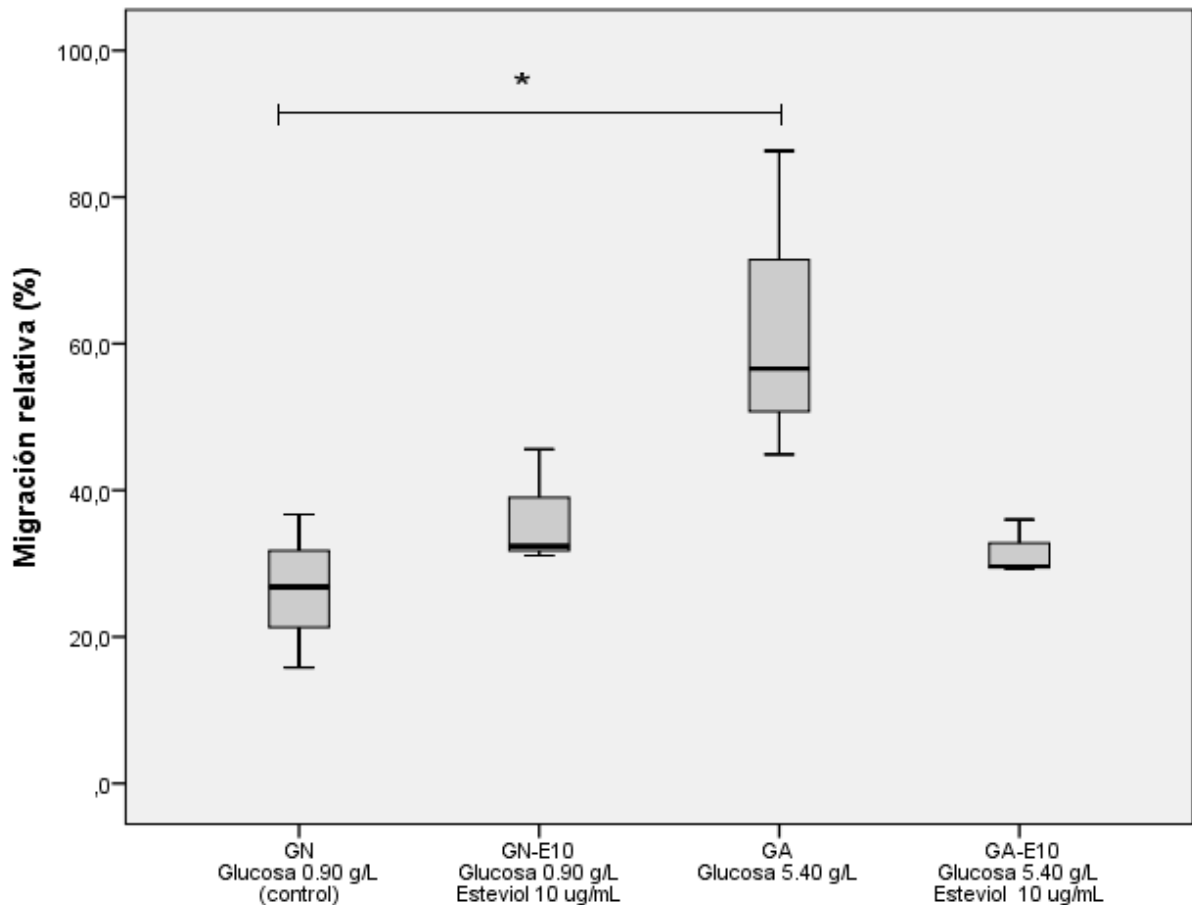
- GN: cultivo celular con medio base (control). Las células se cultivaron en presencia de concentración normal de glucosa (0,90 g/L).
- GN-E10: cultivo celular con tratamiento (medio base con agregado de esteviol). Las células se cultivaron en presencia de concentración normal de glucosa (0,90 g/L) y esteviol (Sigma-Aldrich, USA) 10 µg/ml [18].
- GA: cultivo celular con tratamiento (medio base con agregado de glucosa). Las células se cultivaron en presencia de concentración alta de glucosa (Sigma-Aldrich, USA) (5,40 g/L).
- GA-E10: cultivo celular con tratamiento (medio base con agregado de glucosa y esteviol). Las células se cultivaron en presencia de concentración alta de glucosa (5,40 g/L) y esteviol 10 µg/ml.

Ensayos realizados

Se realizaron los siguientes ensayos experimentales incubando las células a 37 °C en atmósfera húmeda con 5 % CO₂:

- Ensayo de viabilidad: se utilizó el reactivo *Cell Counting Kit-8* (Sigma-Aldrich, USA) basado sobre la sal de tetrazolium WST-8, la cual es reducida por las deshidrogenasas celulares y produce un compuesto de color amarillo (formazán) en concentración proporcional al número de células vivas. El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

Figura 1. Ensayo de migración celular.



► *diferencia estadísticamente significativa $p < 0,050$ test ANOVA; GN, cultivo celular con medio base; GN-E10, cultivo celular medio base y esteviol cultivados en presencia de glucosa 0,90 g/L y esteviol 10 µg/mL; GA, cultivo celular con medio base y glucosa cultivadas en presencia de glucosa 5,40 g/L; GA-E10, cultivo celular con medio base, glucosa y esteviol cultivadas en presencia de glucosa 5,40 g/L y esteviol 10 µg/mL; cada condición del ensayo se realizó por triplicado.

Las células se cultivaron en una placa de 96 pocillos (Sigma-Aldrich, USA), a una densidad inicial de 5×10^3 células/pocillo. La lectura de absorbancias a las 24 h de incubación con cada grupo experimental se realizó a 450 nm en un lector de placas Mindray MR-96A (Mindray, China). La viabilidad se calculó respecto del grupo control (GN), según las instrucciones del fabricante con la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad o tasa de supervivencia (\%)} = \frac{\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco}}{\text{Abs control negativo} - \text{Abs blanco}}$$

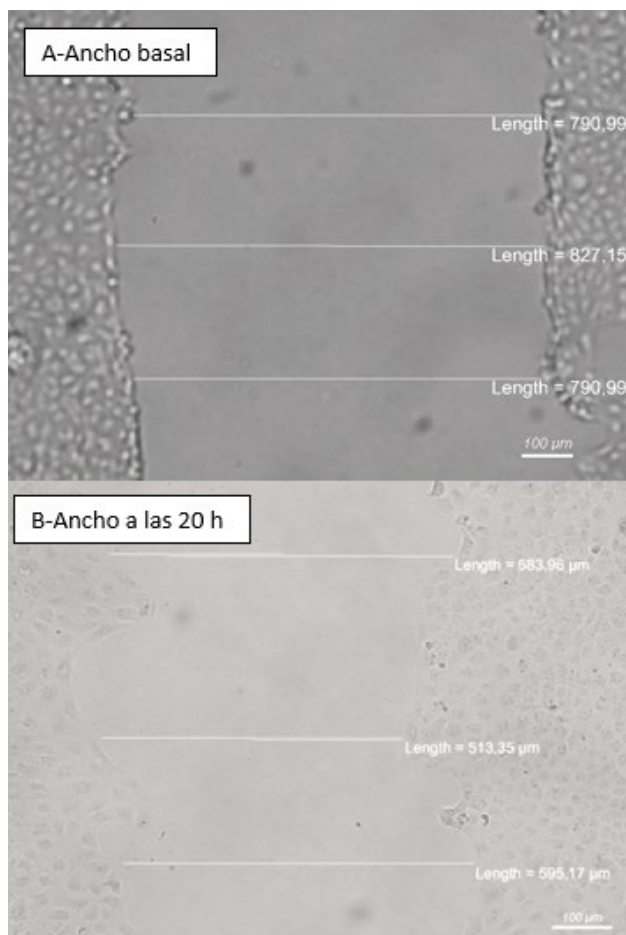
- Viabilidad o tasa de supervivencia (%) = (Abs muestra - Abs blanco) / (Abs control negativo - Abs blanco)
 - Abs muestra es absorbancia del pocillo con células, medio base, tratamiento y WST-8; Abs blanco es la absorbancia del pocillo con medio base, tratamiento y WST-8; Abs control negativo es la absorbancia del pocillo con medio base, células y WST-8.

- Ensayo del cierre de la herida o del raspado: para evaluar la tendencia migratoria de las células se utilizó el método descrito por Liang et al. [19]. Brevemente, al realizar una raspadura en un cultivo celular en monocapa con crecimiento confluyente, se produce un surco libre de células cuyo ancho se puede medir y sirve de referencia con la cual comparar la distancia migrada por las células que quedaron en el borde

de la raspadura, luego de distintos tiempos de incubación, hasta que se establecen nuevamente contactos célula - célula. Las células se cultivaron en una placa de 24 pocillos (Sigma-Aldrich, USA), a una densidad inicial de 5×10^4 células/pocillo hasta confluencia, luego, se realizó en la zona central de cada pocillo un surco con una punta de pipeta estéril de 1 ml. Previamente, se marcó una línea perpendicular a la dirección de los surcos en la base de cada pocillo para obtener una referencia durante la medición. Los tratamientos se realizaron con el medio indicado previamente, pero suplementado con 2 % de SFB (medio de mantenimiento), para minimizar el efecto proliferativo y la migración se midió a las 20 h, considerando que el tiempo de duplicación celular de la línea celular es de aproximadamente 24 h [20-23]. Se obtuvieron 3 medidas (µm) del ancho del raspado de cada pocillo en el tiempo basal (pretratamiento) y a las 20 h postratamiento, en un microscopio invertido (Nikon Inc., USA) y con aumento 10X; las mediciones se hicieron con el programa NIS-Elements BR 2.30 (Nikon Inc., USA). Se calculó la migración relativa porcentual media en cada condición ensayada.

- Ensayo de la contracción del gel de colágeno: para evaluar

Figura 2. Medición del ancho del surco en una de las condiciones experimentales.



la contractilidad celular de las células, se utilizó el kit comercial *Cell Contraction Assay* (Cell Biolabs Inc., USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, este modelo de contracción del gel de colágeno con células combina un período inicial de contracción con el gel fijado a la placa de cultivo, lo que produce una carga mecánica que culmina con el ensamble de las fibras de estrés celular, con un segundo paso donde el gel es liberado de la placa para que flote en el medio de cultivo, lo cual resulta en la pérdida de la carga mecánica y posterior contracción del gel a medida que se disipan las fibras de estrés celular. Las células se diluyeron a una densidad inicial de $2,2 \times 10^6$ células/ml para preparar la suspensión colágeno - células y se utilizó una placa de 24 pocillos (Sigma-Aldrich, USA). Se midió con una regla milimetrada el cambio en el diámetro del gel a las 72 h (índice de contracción) posincubación con cada condición. En la sección Resultados, se observa el fundamento de este método.

Análisis de datos

Los ensayos se realizaron por triplicado en cada condición. Se aplicó la prueba ANOVA, utilizando el programa estadístico *Statistical Package for Social Science 15.0* (SPSS, Chicago, IL, USA). Se consideró una diferencia estadísticamente significati-

va un valor $p < 0,050$.

Resultados

Ensayo de viabilidad celular: a las 24 h de incubación con cada condición experimental ($N = 3$), se obtuvieron los siguientes valores de viabilidad o tasa de supervivencia porcentual: GN vs GA (100 vs 87 %), $p = 0,900$; GN vs GN-E10 (100 vs 102 %), $p = 0,999$; GN vs GA-E10 (100 vs 94 %), $p = 0,999$; GA vs GA-E10 (87 vs 94 %), $p = 0,997$.

Ensayo de migración celular: a las 20 h de incubación con cada condición experimental ($N = 3$), se obtuvieron los siguientes valores de migración porcentual, relativa al valor basal: GN vs GA (26 vs 63 %), $p = 0,033$; GN vs GN-E10 (26 vs 36 %), $p = 0,775$; GN vs GA-E10 (26 vs 32 %), $p = 0,956$; GA vs GA-E10 (63 vs 32 %), $p = 0,067$. Estos datos se observan en la figura 1. En la figura 2, se ejemplifican las mediciones del ancho del surco.

Ensayo de la contracción del gel de colágeno: a las 72 h de incubación con cada condición experimental ($N = 3$), se obtuvieron los siguientes valores en la contracción porcentual relativa al valor basal: GN vs GA (31 vs 29 %), $p = 0,982$; GN vs GN-E10 (31 vs 29 %), $p = 0,982$; GN vs GA-E10 (31 vs 7 %), $p = 0,000$; GA vs GA-E10 (29 vs 7 %), $p = 0,000$. Estos datos se observan en la figura 3. En la figura 4, se ejemplifica la contracción del gel de colágeno y el fundamento metodológico.

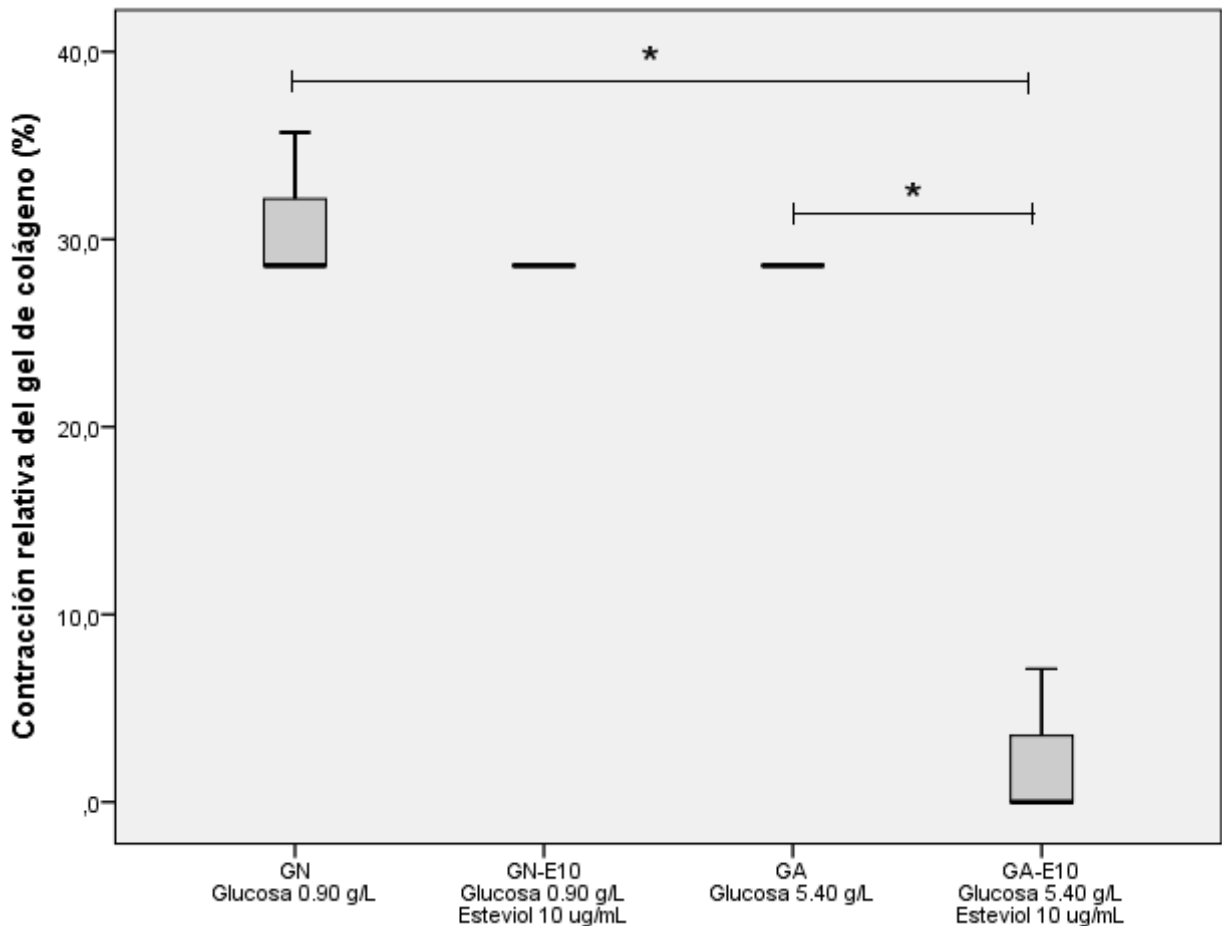
Discusión

Este estudio fue diseñado como una fase exploratoria preliminar para evaluar *in vitro* los potenciales efectos del esteviol sobre fibroblastos renales, en presencia o no, de concentración alta de glucosa. Debido a que en las condiciones experimentales evaluadas la viabilidad celular de los fibroblastos renales no fue afectada por la concentración alta de glucosa (5,40 g/L) y/o la presencia de esteviol 10 µg/ml, los ensayos descritos se realizaron con dichas concentraciones.

Cuando los fibroblastos están en una superficie plana bidimensional, la fuerza de tracción que ejercen contra un sustrato rígido da como resultado la migración celular. Sin embargo, cuando las células están en una matriz de colágeno tridimensional, la fuerza de tracción que ejercen es utilizada como un inductor mecánico para la producción y remodelación de la matriz extracelular, proceso que tiene importancia en la cicatrización, tanto normal como irreversible (fibrosis) de los tejidos, después de una lesión. Cuando la matriz de colágeno se encuentra rígida, se genera un estado de alta tensión donde las células sufren una reorganización masiva del citoesqueleto con formación de fibras de estrés y adherencias focales. Este proceso activa la biosíntesis de matriz extracelular, análogamente a lo que ocurre con las células que se encuentran en los tejidos en proceso de reparación activa [24-26]. En este estudio, se evaluaron las dos situaciones mencionadas.

Los datos obtenidos con el método de la herida, ensayo bidimensional, evidenciaron un aumento estadísticamente significativo de la migración celular con GA, respecto de la condición experimental con GN, efecto revertido con el agregado de esteviol 10 µg/ml. Por esta razón se concluyó que el tratamiento con esteviol contrarrestó el aumento de la migración celular produ-

Figura 3. Ensayo de contracción del gel de colágeno.



► *diferencia estadísticamente significativa $p < 0,050$ test ANOVA; GN, cultivo celular con medio base; GN-E10, cultivo celular medio base y esteviol cultivados en presencia de glucosa 0,90 g/L y esteviol 10 µg/mL; GA, cultivo celular con medio base y glucosa cultivadas en presencia de glucosa 5,40 g/L; GA-E10, cultivo celular con medio base, glucosa y esteviol cultivadas en presencia de glucosa 5,40 g/L y esteviol 10 µg/mL; cada condición del ensayo se realizó por triplicado.

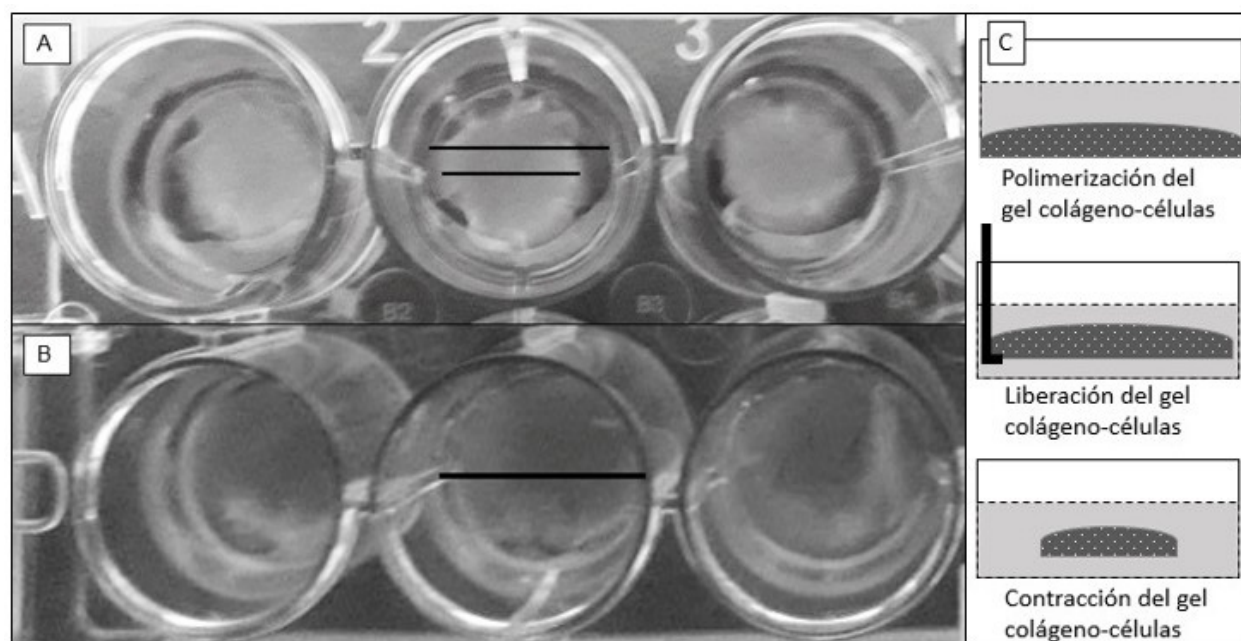
cido por la alta concentración de glucosa.

En el ensayo de contracción del gel de colágeno, sistema tridimensional, el tratamiento en conjunto con GA y esteviol 10 µg/ml disminuyó la respuesta celular de contracción del gel de colágeno, por lo cual el esteviol podría mediar la producción y remodelación de la matriz de colágeno. En la actualidad, no existe evidencia sobre los mecanismos a través de los cuales el esteviol podría ejercer efectos antifibróticos en fibroblastos renales, motivo por el cual este trabajo aportaría evidencia preliminar y básica sobre el tema.

Se ha observado que estevia y/o sus derivados poseen efectos benéficos sobre los riñones. El-Mesallamy et al. [27] demostraron, en un modelo experimental murino de nefropatía diabética inducido por estreptozotocina, que el extracto de estevia tiene un rol en la protección renal, fundamentalmente por su efecto hipoglucemiante. Riswan et al. [28] estudiaron efectos renoprotectores en un modelo murino de nefrotoxicidad inducida por gentamicina y observaron disminución de la creatinina plasmática y del daño renal por el tratamiento con estevia. Asimismo, en un estudio prospectivo intervencional, Riswan et

al. [29] demostraron una disminución de la creatinina sérica y otras mejorías en parámetros bioquímicos plasmáticos en pacientes con ERC, luego de tres meses de ingesta de estevia.

Es poco lo que se sabe respecto de los mecanismos moleculares implicados en los efectos de estevia y/o sus derivados sobre el proceso de fibrosis en el riñón, no obstante, existen distintos estudios realizados en modelos murinos de cirrosis hepática. Casas et al. [15], demostraron que la ingesta del glucósido de esteviol evitó el daño hepático inducido por la administración crónica de tioacetamida a través de la inhibición de las vías Smad profibróticas canónicas y no canónicas, lo cual condujo al bloqueo de la activación de las células estrelladas del hígado. En los estudios realizados por Ramos-Tovar et al. [30], con un modelo de cirrosis inducido por administración crónica de tetracloruro de carbono, el extracto acuoso de estevia evidenció propiedades antifibróticas que los autores atribuyen a su capacidad de inducir la expresión del factor de transcripción Nrf2, reducir la expresión del factor nuclear B (NF- κ B) y bloquear varias vías de señalización profibróticas, inhibiendo subsecuentemente la activación de las células estrelladas y previniendo la

Figura 4. Medición de la contracción del gel de colágeno en distintas condiciones experimentales.

► La medición del diámetro basal se realizó al liberar el gel del pocillo; A, condición experimental que evidenció contracción del gel a las 72 h respecto de su diámetro basal; B, condición experimental sin contracción del gel a las 72 h respecto de su diámetro basal; C, se observa el fundamento metodológico del método utilizado [Cell Contraction Assay, Cell Biolabs Inc., USA].

fibrosis inducida por el tetracloruro de carbono. Estos autores también demostraron la inhibición de otras vías profibróticas, incluyendo una reducción en la población de fibroblastos hepáticos y de la expresión de las metaloproteinasas MMP2 y MMP3, y bloqueo de la liberación del factor de crecimiento transformante Beta. También, observaron que estevía redujo la fosforilación de pSmad3L, Smad con marcados efectos profibróticos y mitogénicos y produjo una regulación en alta de Smad 7, que posee efectos antifibróticos [17]. Estos estudios evidencian la pluralidad de mecanismos a través de los cuales estevía y/o sus derivados conducen a la prevención de la cirrosis experimental, que podrían ser orientativos para el estudio de la fibrosis renal.

Resulta de interés profundizar el estudio del potencial efecto antifibrótico del esteviol y los mecanismos moleculares implicados en el mismo para contribuir a la prevención y tratamiento del proceso patológico de fibrosis renal que caracteriza a la ERC, independientemente de su causa.

Referencias bibliográficas

- [1]. Torales S, Vallejos A, Valenti L. Hacia un nuevo paradigma en el abordaje de la enfermedad renal crónica avanzada. *Rev Argent Salud Pública*. 2018; 9(35):33-37.
- [2]. Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2019; 139:e56-e528.
- [3]. Yan J, Zhang Z, Jia L, Wang Y. Role of Bone Marrow-Derived Fibroblasts in Renal Fibrosis. *Front Physiol*. 2016; 7(61):1-8.
- [4]. Kisseleva T, Brenner DA. Mechanisms of fibrogenesis. *Exp Biol Med*. 2008; 233:109-22.
- [5]. Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 2008; 214:199-210.
- [6]. Eddy AA. Progression in chronic kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2005; 12:353-65.
- [7]. Neilson EG. Mechanisms of disease: Fibroblasts a new look at an old problem. *Nat Clin Pract Nephrol*. 2006; 2:101-8.
- [8]. Baccora M, Cortes P, Hassett C, Taube D, Yee J. Effects of long-term elevated glucose on collagen formation by mesangial cells. *Kidney Int*. 2007; 72:1216-25.
- [9]. Liu CM, Qi XL, Yang YF, Zhang XD. Betulinic acid inhibits cell proliferation and fibronectin accumulation in rat glomerular mesangial cells cultured under high glucose condition. *Biomed Pharmacother*. 2016; 80:338-42.
- [10]. Ma Y, Chen F, Yang S, Chen B, Shi J. Protocatechuic acid ameliorates high glucose induced extracellular matrix accumulation in diabetic nephropathy. *Biomed Pharmacother*. 2018; 98:18-22.
- [11]. Shen J, Xing W, Liu R, Zhang Y, Xie C, Gong F. MiR-32-5p influences high glucose-induced cardiac fibroblast proliferation and phenotypic alteration by inhibiting DUSP1. *BMC Mol Biol*. 2019; 20(1):2-13.
- [12]. Wang X, Jin H, Jiang S, Xu Y. MicroRNA 495 inhibits the high glucose-induced inflammation, differentiation and extracellular matrix accumulation of cardiac fibroblasts through downregulation of NOD1. *Cell Mol Biol Lett*. 2018; 9:2-13.
- [13]. Wheeler A, Boileau AC, Winkler PC, Compton JC, Prakash I,

- Jiang X et al. Pharmacokinetics of rebaudioside A and stevioside after single oral doses in healthy men. *Food Chem Toxicol.* 2008; 46(7):S54-60.
- [14]. Chatsudthipong V, Muanprasat C. Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacol Ther.* 2009; 121(1):41-54.
- [15]. Casas Grajales S, Alvarez Suarez D, Ramos Tovar E, Buendía Montaña LD, Reyes Gordillo K, Camacho J et al. Stevioside inhibits experimental fibrosis by down regulating profibrotic Smad pathways and blocking hepatic stellate cell activation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2019; 124:670-80.
- [16]. Ramos-Tovar E, Casas-Grajales S, Hernández-Aquino E, Flores-Beltrán RE, Galindo-Gómez S, Vera-Aguilar E et al. Cirrhosis induced by thioacetamide is prevented by stevia. Molecular mechanisms. *J Functional Foods.* 2019; 52:552-64.
- [17]. Ramos-Tovar E, Buendia-Montaña LD, Galindo-Gómez S, Hernández-Aquino E, Tsutsumi V, Muriel P. Stevia prevents experimental cirrhosis by reducing hepatic myofibroblasts and modulating molecular profibrotic pathways. *Hepatology Research.* 2019; 49:212-23.
- [18]. Philippaert K, Pironet A, Mesuere M, Sones W, Vermeiren L, Kerselaers S et al. Steviol glycosides enhance pancreatic beta-cell function and taste sensation by potentiation of TRPM5 channel activity. *Nature Communications.* 2017; 8:1-16.
- [19]. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nat Protoc.* 2007; 2:329-33.
- [20]. Kibenge FS, McKenna PK. Isolation and Propagation of Infectious Bursal Disease Virus Using the Ovine Kidney Continuous Cell Line. *Avian Dis.* 1992;36(2):256-61.
- [21]. Lawal N, Hair-Bejo M, Suri Arshad S, Rahman Omar A, Ideris A. Adaptation and Molecular Characterization of Two Malaysian Very Virulent Infectious Bursal Disease Virus Isolates Adapted in BGM-70 Cell Line. *Hindawi Advances in Virology* 2017; 19:1-19.
- [22]. Asociación Banco Argentino de Células. [Internet] 2019, [Consulta: 19 Sep 2019]. Disponible en: <http://www.abac.org.ar/>
- [23]. Ammerman NC, Beier-Sexton M, Azad AF. Growth and Maintenance of Vero Cell Lines. *Curr Protoc Microbiol.* 2008; 4E:1-10.
- [24]. Kagami S, Kondo S, Löster K, Reutter W, Kuhara T, Yasutomo K, et al. $\alpha 1\beta 1$ Integrin-Mediated Collagen Matrix Remodeling by Rat Mesangial Cells Is Differentially Regulated by Transforming Growth Factor- β and Platelet-Derived Growth Factor-BB. *J Am Soc Nephrol.* 1999; 10:779-89.
- [25]. Rhee S. Fibroblasts in three dimensional matrices: cell migration and matrix remodeling. *Exp Mol Med.* 2009; 41(12):858-65.
- [26]. Hamdi Kural M, Lawrence K. Regulating tension in three-dimensional culture environments. *Biomater Exp Cell Res.* 2013; 319(16):2447-59.
- [27]. El-Mesallamy AMD, Hussein SAM, Hussein AAM, Mahmoud SA, El-Azab KM. Reno Protective Effect of Methanolic Stevia Rebaudiana Bertoni Leaves Extract and Its Phenolic Compounds in Type-1-Diabetes. *Egypt J Chem.* 2018; 61(4):609-15.
- [28]. Rizwan F, Yesmine S, Sultana GB, Ishtiaq AC, Rajibul H, Tapan KC. Renoprotective effects of stevia [Stevia rebaudiana Bertoni], amlodipine, valsartan, and losartan in gentamycin-induced nephrotoxicity in the rat model: Biochemical, hematological and histological approaches. *Toxicol Rep.* 2019; 6:683-91
- [29]. Rizwan F, Rashid HU, Yesmine S, Monjure F, Chatterjee TK. Preliminary analysis of the effect of Stevia [Stevia rebaudiana] in patients with chronic kidney disease [stage I to stage III]. *Contemp Clin Trials Commun.* 2018; 12:17-25.
- [30]. Ramos-Tovar E, Flores-Beltrán RE, Galindo-Gómez S, Camacho J, Tsutsumi V, Muriel P. An aqueous extract of Stevia rebaudiana variety Morita II prevents liver damage in a rat model of cirrhosis that mimics the human disease. *Annals of Hepatology* 2019; 18:472-9.