



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

Evaluación de la capacidad de la cafeína para evitar la progresión de la fibrosis hepática inducida con tioacetamida en la rata.

T E S I S

Que presenta

MARÍA DEL CONSUELO ACERO HERNÁNDEZ

Para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias

En la especialidad de Farmacología

Director de tesis:

Dr. Pablo Muriel de la Torre

Ciudad de México

Diciembre, 2019

Este trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Farmacología, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la tutoría del Dr. Pablo Muriel de la Torre.

Se contó con una beca del CONACYT para estudios de posgrado con clave de registro: 896519

DEDICATORIAS

Primero a Dios, por darme la dicha de ser llamada a seguirlo, quien me dio la oportunidad de lograr realizar este proyecto. Por darme mis virtudes y el carácter para terminar. Por darme la mejor familia y las personas que me rodean.

A mis padres que siempre estuvieron al pendiente de mi estancia en esta ciudad, por tratar de estar conmigo a pesar de que estábamos a más de 400 km de distancia. Por siempre preguntar cómo estaba, por darme la educación y los valores que tengo, por enseñarme a vivir de acuerdo a Dios, a ser compartida y tener humildad.

A mis hermanos que cuando nos vemos, nos reímos y poner siempre a la familia en primer lugar, a tener siempre el apoyo entre nosotros y que un enojo nunca sea superior al amor entre nosotros. Por siempre estar al pendiente de mi estancia lejos de ellos.

A mi prometido Mario Iván, que por estos años ha sido un gran compañero y amigo; por siempre tener el apoyo para seguir adelante en los momentos difíciles durante esta estancia, por tanto amor y momentos de felicidad.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt), por el apoyo y la oportunidad brindados para el desarrollo de mis estudios de posgrado. Se contó con una beca del CONACYT para estudios de posgrado con una clave de registro: 896519.

Al Dr. Pablo Muriel de la Torre por permitirme desarrollar el proyecto en su laboratorio, por siempre tener disposición al trabajo, por las correcciones y por todo el apoyo.

A mis sinodales Dr. Javier Camacho Arroyo y Dr. Víctor Katsutoshi Tsutsumi Fujiyoshi por su apoyo en la realización del proyecto y compartir su conocimiento, por los consejos, críticas que ayudaron al mejoramiento del proyecto.

A la Lic. en Enf. Laura Dayana Buendía, a la Lic. en Enf. Rosa Elena Flores Beltrán y a Benjamín Salinas Hernández por su apoyo técnico en el laboratorio, por siempre estar dispuestos al trabajo, por su convivencia tan amena en el laboratorio, por tantas risas. Por permitirme conocer su interior y ver que son excelentes personas, por los detalles que siempre tuvieron conmigo.

A mis compañeros de laboratorio a M. C. Eduardo Enrique Vargas Posada, la QFI Irina Cardozo Lezama, Dra. Erika Ramos Tovar y al Dr. Sael Casas Grajales por siempre hacer tan amena la estancia en el laboratorio y por el apoyo en los experimentos.

A la QFB Silvia Galindo Gómez y Karla Gil por su apoyo técnico en sus laboratorios y en las tinciones.

A los MVZ Rafael Leyva Muñoz, Ricardo Gaxiola Centeno y Benjamín E. Chávez Álvarez por su apoyo técnico en el cuidado y mantenimiento de los animales de experimentación en el UPEAL.

A mis compañeros y amigos de maestría, Claudia Cahuantzi Tamalatzí, Rubén Moreno Cordero, Wilibaldo Orea López, Luis Arturo Carmona Hernández, por su amistad, por hacer más llevadera mi estancia en la Ciudad de México, por reunirnos para estudiar en los cursos, por tantas carcajadas en todos lados, porque nunca nos tomamos nada en serio.

ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract.....	3
INTRODUCCIÓN	5
Histología	6
<i>Organización del parénquima hepático</i>	6
Lobulillo hepático	6
Acino hepático	7
Lobulillo portal	8
Funciones del hígado	8
Desintoxicación	9
Metabolismo de la bilirrubina.....	9
Metabolismo de carbohidratos	9
Metabolismo de lípidos y colesterol.....	10
<i>Células presentes en el hígado</i>	10
Células parenquimales	10
Hepatocitos	10
Células no parenquimales	11
Células endoteliales (LSECs).....	11
Células de Kupffer (KCs).....	11
Células estelares hepáticas (HSCs)	11
Colangiocitos.....	12
Células de Pit.....	12
Estrés oxidante en la patogénesis de las enfermedades hepáticas	13
Fibrosis hepática.....	14
Cirrosis	16
Modelo hepático inducido por la tioacetamida (TAA)	16
Propiedades antioxidantes del café	18
Consumo de café en México	18
Historia de la cafeína	18
El origen de la palabra café.....	21
Ladrillos de té.....	24
Los orígenes de las palabras cacao y chocolate	27

Propiedades hepatoprotectoras del café y la cafeína.....	27
JUSTIFICACIÓN.....	29
HIPÓTESIS.....	30
OBJETIVOS.....	31
Objetivo general.....	31
Objetivos particulares.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
Materiales y seres vivos.....	32
Técnicas.....	35
Determinación de la actividad de ALT.....	35
Determinación de la actividad de la FA.....	38
Determinación de Y-GTP.....	40
Determinación de glutatión reducido.....	42
Determinación de la cantidad de proteínas hepáticas por el método de Bradford.....	45
Determinación del grado de peroxidación lipídica.....	47
Determinación de colágena por medio de la hidroxiprolina.....	48
Determinación de glucógeno hepático.....	52
Histología.....	53
Tinción de hematoxilina y eosina.....	54
Tinción tricrómica de Masson.....	54
Inmunohistoquímica.....	56
Ensayo de zimografía.....	58
Western blot.....	59
Análisis estadístico.....	61
RESULTADOS.....	62
Efecto de la cafeína sobre el parénquima hepático.....	62
Efecto de la cafeína sobre los marcadores de daño hepático.....	64
Efecto antioxidante de la cafeína.....	66
Efecto antiinflamatorio de la cafeína.....	67
Efecto antifibrótico de la cafeína.....	69
Efecto de la cafeína sobre la deposición de colágena en el parénquima hepático.....	69
Efecto antifibrótico de la cafeína a nivel molecular.....	69
DISCUSIÓN.....	74
CONCLUSIONES.....	78
Conclusiones particulares.....	78

Conclusión general	78
PERSPECTIVAS.....	79
BIBLIOGRAFÍA	80

Índice de tablas

Tabla 1. Acontecimientos históricos del café. ³⁵	23
Tabla 2. Curva de calibración de ALT.....	36
Tabla 3. Curva de calibración de la FA.....	38
Tabla 4. Curva de calibración de Y-GTP.	40
Tabla 5. Curva de calibración de GSH.	43
Tabla 6. Curva de calibración de proteínas.	45
Tabla 7. Curva de calibración de hidroxiprolina.	50
Tabla 8. Lista de anticuerpos utilizados para los ensayos de Western blot e inmunohistoquímica.	60

Índice de gráficas

Gráfica 1 Curva para la determinación de la actividad de la enzima ALT.	37
Gráfica 2 Curva de calibración para la determinación de la actividad de FA.....	39
Gráfica 3 Curva de calibración para la determinación de la actividad de Y-GTP.....	41
Gráfica 4 Curva de calibración para la dterminación de GSH.....	44
Gráfica 5 Curva de calibración para la determinación de proteínas.....	46
Gráfica 6 Curva de calibración para la determinación de hidroxiprolina.....	51

Índice de figuras

Figura 1. Anatomía del hígado.....	5
Figura 2. Representación esquemática del lobulillo hepático.	6
Figura 3. Arquitectura del hígado.	7
Figura 4. Representación esquemática del lobulillo portal.	8
Figura 5. Células presentes en el hígado.....	13
Figura 6. Mecanismos celulares de la fibrosis hepática.....	15
Figura 7. Hígado sano e hígado cirrótico.	16
Figura 8. Metabolismo de la tioacetamida.....	17
Figura 9. Contenido promedio de cafeína en alimentos estimulantes.....	19
Figura 10. Fotografía de la casa de café.....	21
Figura 11. Planta de café.....	22
Figura 12. Fotografía de unos tibetanos que cargan ladrillos de té.....	25
Figura 13. Esquema del diseño experimental.	32
Figura 14. Metodología que se llevó a cabo.	34
Figura 15. Fotos de los hígados representativos de cada grupo.	63
Figura 16. Marcadores de daño hepático.....	65
Figura 17. Marcadores de estrés oxidante.....	66
Figura 18. Efecto antiinflamatorio de la cafeína.....	68
Figura 19. Efecto de la cafeína sobre la deposición de colágena en el parénquima hepático.	71
Figura 20. Efecto antifibrótico de la cafeína a nivel molecular.....	732

Resumen

Las enfermedades hepáticas se encuentran dentro de las principales causas de muerte en México y el mundo, por lo que es importante buscar tratamientos efectivos para estos padecimientos. Dentro de los productos naturales se ha observado la presencia de compuestos con propiedades hepatoprotectoras, siendo la cafeína un compuesto que ha demostrado importantes propiedades benéficas en el hígado. Es así que el objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de la cafeína para evitar la progresión de la fibrosis hepática. El modelo experimental de daño se llevó a cabo utilizando tioacetamida (TAA) a una dosis de 200 mg/kg de peso i. p., tres veces por semana, por seis semanas, donde a partir de la cuarta semana se administró cafeína en ratas Wistar macho, con sus respectivos controles. Se evaluó la morfología del hígado, el parénquima hepático, diversos marcadores de daño hepático, como la relación hígado/peso corporal, la capacidad biosintética del hígado –midiendo la cantidad de glucógeno almacenado– y los marcadores séricos de daño hepático, evaluando la necrosis (alanina aminotransferasa) y colestasis (γ -glutamyl transpeptidasa y fosfatasa alcalina). Dentro del presente diseño experimental se realizaron mediciones de marcadores de estrés oxidante para evaluar la capacidad antioxidante de la cafeína, como lo son la peroxidación lipídica, el 4-hidroxinonanal y del antioxidante endógeno glutatión reducido, así como del factor nuclear de eritrocitos 2, el cual induce la producción de moléculas antioxidantes. Para evaluar la capacidad antiinflamatoria de la cafeína se midió la subunidad p65 del factor nuclear κ B, además de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF- α . Por último, se evaluó la capacidad antifibrótica de la cafeína a diferentes niveles, midiendo la cantidad de colágena presente en el parénquima hepático, el factor de crecimiento transformante beta, la activación de células estelares hepáticas (HSCs) a través de la actina de músculo liso alfa, y la remodelación de la matriz extracelular (ECM) por parte de las metaloproteinasas 9 y 2. La administración de la TAA modificó los parámetros anteriores, llevando a necrosis, colestasis, a la disminución de la capacidad de almacenar glucógeno y al aumento en el peso del hígado; también incrementó el estrés oxidante, las citocinas pro-inflamatorias, el NF- κ B, la

cantidad de ECM, la activación de las HSCs y la remodelación de la ECM. La administración de la cafeína a las ratas intoxicadas crónicamente con TAA fue capaz de evitar la progresión de la enfermedad de manera significativa. Concluimos que las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antifibrogénicas de la cafeína son las posibles responsables de los efectos benéficos observados en este estudio.

Abstract

Liver diseases are among the main causes of death in Mexico and the world, so it is important to seek effective treatments for these conditions. Within the natural products, the presence of compounds with hepatoprotective properties has been observed, caffeine is a compound that has demonstrated important beneficial properties in the liver. Thus, the objective of this study was to evaluate the ability of caffeine to prevent the progression of liver fibrosis. The experimental damage model was carried out using thioacetamide (TAA) at a dose of 200 mg / kg of weight i. p., three times a week, for six weeks, where caffeine was administered in male Wistar rats from the fourth week, with their respective controls. The morphology of the liver, liver parenchyma, various markers of liver damage were evaluated, such as the liver / body weight ratio, the biosynthetic capacity of the liver - measuring the amount of glycogen stored - and serum markers of liver damage, assessing necrosis (alanine aminotransferase) and cholestasis (γ -glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase). Within the present experimental design, measurements of oxidative stress markers were performed to assess the antioxidant capacity of caffeine, such as lipid peroxidation, 4-hydroxynonenal and the endogenous antioxidant reduced glutathione, as well as the nuclear factor of red blood cells 2, which induces the production of antioxidant molecules. To assess the anti-inflammatory capacity of caffeine, the p65 subunit of nuclear factor κ B was measured, in addition to the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α . Finally, the antifibrotic capacity of caffeine at different levels was evaluated, measuring the amount of collagen present in the liver parenchyma, the transforming growth factor beta, the activation of hepatic stellar cells (HSCs) through the smooth muscle actin alpha, and remodeling of the extracellular matrix (ECM) by metalloproteinases 9 and 2. The administration of TAA modified the above mentioned parameters, leading to necrosis, cholestasis, the decrease in glycogen storage capacity and the increase in liver weight; it also increased oxidative stress, pro-inflammatory cytokines, NF- κ B, the amount of ECM, activation of HSCs and remodeling of ECM. The administration of caffeine to rats chronically poisoned with TAA was able to prevent disease progression significantly. We

conclude that the antioxidant, anti-inflammatory and antifibrogenic properties of caffeine may be responsible for the beneficial effects observed in this study.

INTRODUCCIÓN

El hígado (Figura 1) ocupa el cuadrante superior derecho de la cavidad abdominal, extendiéndose desde el quinto espacio intercostal en la línea midclavicular hacia el costado derecho marginal. Presenta un estroma, representado por una cápsula de tejido conectivo, la cápsula de Glisson, que se encuentra a nivel de hilio y penetra dentro del órgano, para dar origen a un árbol conectivo que se ramifica profusamente con el fin de dividir el parénquima hepático en lobulillos. El peso promedio del hígado es de 1800 g en hombres y 1400 g en mujeres. Es un órgano triangular que se extiende por la cavidad abdominal debajo del diafragma, está constituido de tejido suave café-rojizo, es la glándula más grande del cuerpo y se encuentra dividido en cuatro lóbulos.¹⁻³

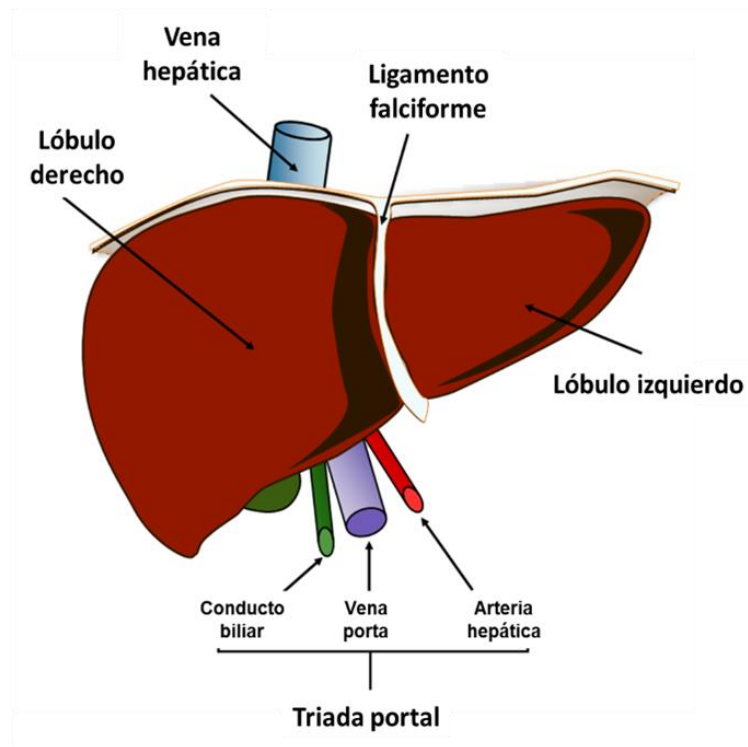


Figura 1. Anatomía del hígado. Puede observarse el ligamento falciforme que lo divide en los lóbulos derecho e izquierdo, abajo se muestra la triada portal formada por la vena hepática, la arteria hepática y el ducto biliar.¹

El hígado se encuentra localizado anatómicamente para ejercer un papel dual como una fábrica de transformación bioquímica y metabólica, el cual recibe sangre

con sustancias desde la vena portal y sangre rica en oxígeno desde la arteria hepática. Entonces, el hígado utiliza las sustancias desde ambas fuentes de sangre para sintetizar diversos compuestos químicos. A su vez, regresa el flujo sanguíneo a través de la vena hepática y la bilis para la excreción por el sistema biliar.¹

Histología

El hígado se encuentra conformado principalmente por hepatocitos en placas o muralium en espesor de una o dos capas, separadas por sinusoides. Los hepatocitos tienen aspecto de células poligonales con núcleos redondos de diferentes tamaños con frecuentes células binucleadas.²

Organización del parénquima hepático

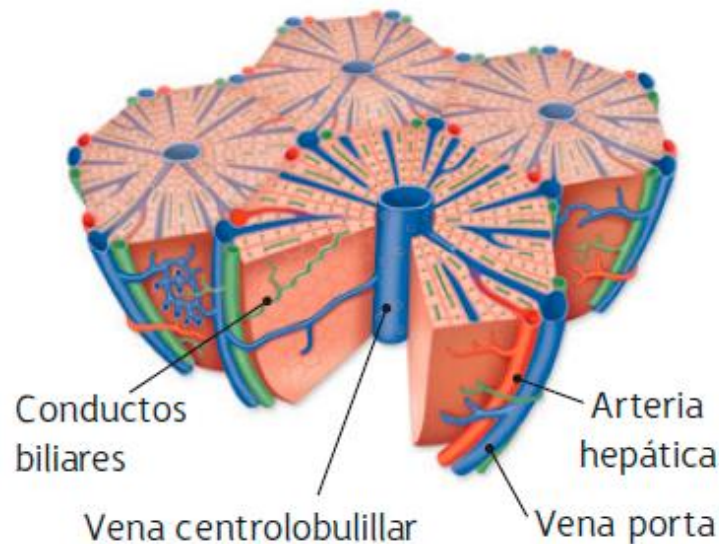


Figura 2. Representación esquemática del lobulillo hepático. Las ramas de la vena portal y de la arteria hepática corren paralelas a los conductos biliares en las triadas portales. La sangre se filtra a través de sinusoides dispuestos entre los hepatocitos para ser recolectada finalmente en la vena central.⁴

Lobulillo hepático

El lobulillo clásico es descrito como un hexágono con una vena central en el centro y tractos portales en las tres esquinas, debido a que muchas glándulas tienen como centro de su unidad funcional un conducto.

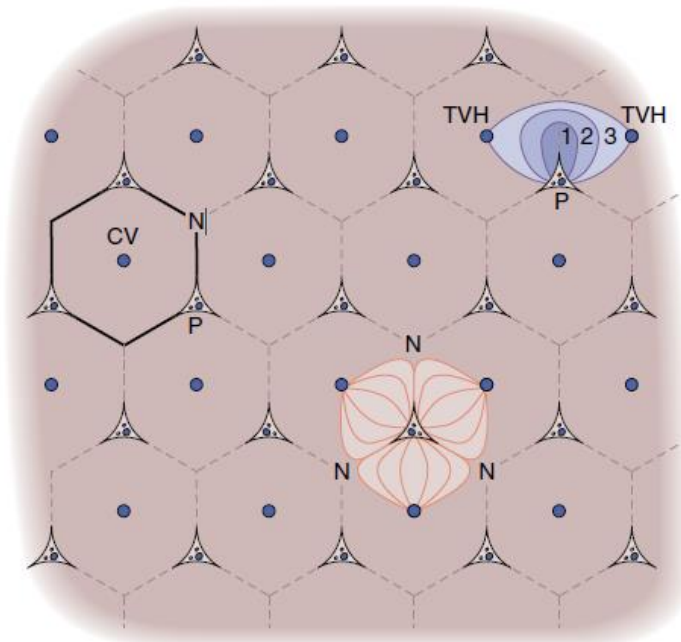


Figura 3. Arquitectura del hígado. A la izquierda se muestra el lobulillo hepático, en el centro se muestra el lobulillo portal, y a la derecha se muestra el acino hepático.⁵

Acino hepático

El concepto del lobulillo hepático es clásico, aunque la fisiología hepática puede ser mejor comprendida con una subunidad conceptual alternativa: el acino de Rappaport (Figura 3). El acino consiste en un agregado tridimensional de hepatocitos, organizados en láminas con sinusoides interpuestos, centrados alrededor y suministrados por ramas de la vena portal y de la arteria hepática. El flujo sanguíneo desde la arteriola hepática y la vénula portal hacia los sinusoides, baña a los hepatocitos y luego drena en dos o tres ramas terminales de la vena central. Esta organización estructural provee de gradientes de oxígeno, sustrato y hormonas entre la entrada y salidas de regiones del acino.⁶

Los hepatocitos que conforman el acino hepático pueden ser agrupados en diferentes zonas de actividad metabólica. Los más cercanos a los vasos aferentes (zona 1) reciben flujo sanguíneo rico en oxígeno, sustrato y hormonas, ya que poseen un alto nivel de actividad metabólica. Por lo tanto, no es sorprendente que los sistemas enzimáticos para el metabolismo energético oxidativo, β -oxidación, gluconeogénesis y catabolismo de aminoácidos, se encuentren concentrados en la

región periportal. Un poco más allá de la zona 1 se encuentran los hepatocitos intermedios, que constituyen la zona 2. Los hepatocitos peri venosos (zona 3) son los que se ocupan principalmente de la biotransformación, síntesis de lípidos y glicólisis.⁶

Lobulillo portal

Es la unidad funcional centrada alrededor del conducto biliar (Figuras 3 y 4) del espacio portal, relacionada con la secreción exocrina del hígado; además, es una estructura triangular definida por tres líneas imaginarias que conectan tres venas centrales.⁷

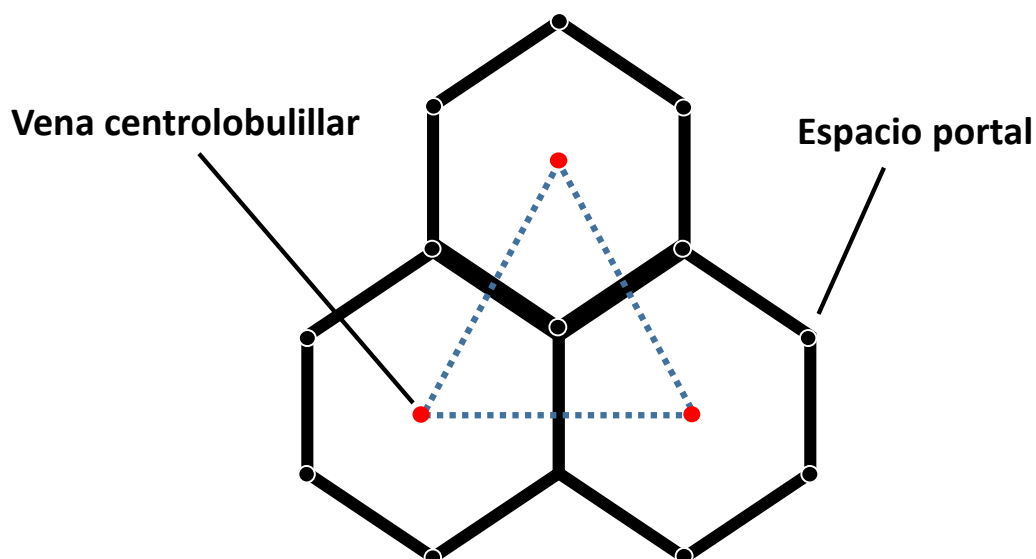


Figura 4. Representación esquemática del lobulillo portal. Es una estructura triangular definida por tres líneas imaginarias que conectan tres venas centrales. Los círculos rojos representan venas centrales y los círculos negros representan las triadas portales.

Funciones del hígado

El hígado es un órgano metabólicamente complejo, donde los hepatocitos desempeñan las siguientes funciones metabólicas del órgano: formación y excreción de bilis durante el metabolismo de la bilirrubina; regulación de la homeostasis de los carbohidratos; síntesis y secreción de lipoproteínas plasmáticas; control del metabolismo del colesterol, síntesis de la urea, albúmina

sérica, factores de coagulación, enzimas y varias proteínas; metabolismo o detoxificación de fármacos y otras sustancias exógenas.⁸

Desintoxicación

El hígado se encarga de desintoxicar la sangre de sustancias circulantes que pueden ser producidas en diversos órganos o provenir del exterior. Es muy activo en la eliminación de material particulado desde la sangre portal; como números pequeños de bacterias que cruzan la pared del intestino en circunstancias normales, esta limpieza es realizada por las células de Kupffer. La detoxificación bioquímica es realizada por el citocromo P450, encontrado en los hepatocitos, y otras enzimas que pueden convertir a los xenobióticos en metabolitos inactivos, menos lipofílicos, que después se pueden excretar hacia la bilis y, así, eliminarse del cuerpo. Además del metabolismo de xenobióticos, el hígado se encarga del metabolismo y la excreción de una amplia variedad de hormonas, como las esteroideas, y otros reguladores endógenos que circulan en el torrente sanguíneo.⁴

Metabolismo de la bilirrubina

La bilirrubina es un pigmento biliar de color amarillo-anaranjado que proviene de la degradación de los productos del grupo hemo; esta debe convertirse en hidrosoluble para excretarse. Tal transformación sucede en 5 pasos: formación, transporte plasmático, captación hepática, conjugación y excreción biliar. Este pigmento se almacena en la vesícula biliar, formando la bilis, siendo excretada posteriormente al duodeno y dando el color característico a las heces.^{7,8}

Metabolismo de carbohidratos

La capacidad del hígado para sintetizar, metabolizar y liberar glucosa es necesaria para la transición metabólica postnatal y es mantenida durante el periodo de vida de un organismo. Al alimentarse, el hígado cambia de un modo de producción neta a una absorción neta, lo que requiere una disminución en el glucagón y un incremento en la insulina, este cambio ocasiona una disminución de glucosa hepática y de las reservas de glucógeno y gluconeogénesis. La glucólisis y la deposición de glucógeno se incrementan en los hepatocitos, llevando a un

consumo hepático neto de glucosa, por lo que la respuesta glucogénica restaura las reservas de glucógeno. Como un organismo de transición, desde un estado de absorción a un estado de ayuno, la insulina disminuye y el glucagón se incrementa. Esto conduce a que el hígado deje de almacenar glucosa y comience con la producción neta de ésta, lo que implica la descomposición del glucógeno y la gluconeogénesis. La producción de glucosa es dinámica y responde a las necesidades energéticas de todo el cuerpo.^{7,9}

Metabolismo de lípidos y colesterol

El hígado es crítico para la absorción digestiva, captación, síntesis, empaquetamiento y secreción de lípidos y lipoproteínas. El sistema de síntesis y secreción biliar del hígado permite una absorción eficiente de los lípidos de la digestión, donde los quilomicrones son ensamblados desde las lipoproteínas y lípidos digeridos en el intestino antes de ser procesados del sistema linfático hacia la circulación; después, los ácidos grasos se extraen desde los quilomicrones remanentes por la lipoproteína lipasa en el hígado.⁹

Células presentes en el hígado

Células parenquimales

Hepatocitos

Los hepatocitos son las células del hígado más abundantes y constituyen el 80 % de la masa hepática. Se disponen formando láminas de una célula de espesor que se unen unas a otras a modo de esponja. Son células grandes, poliédricas de aproximadamente 20 a 30 μm de diámetro, las cuales se encuentran enriquecidas en organelos. Cerca del 30 % de los hepatocitos humanos se encuentran binucleados, son células epiteliales polarizadas. Tienen una vida relativamente larga, puesto que son renovadas aproximadamente cada 5 meses, aunque depende si hay procesos de regeneración o no. Cuando existe un daño en el hígado, los hepatocitos tienen una gran capacidad de proliferación y regeneración de la parte dañada. La función principal de los hepatocitos es metabolizar sustancias procedentes de la digestión del intestino. Por otra parte, los hepatocitos

sintetizan y secretan bilis, la cual será liberada en el tubo digestivo para ayudar a la digestión.^{10,11}

Células no parenquimales

Células endoteliales (LSECs)

Las células endoteliales del sinusoides hepático son células delgadas que forman el revestimiento de la pared sinusoidal. Sus procesos del citoplasma son delgados y planos, se extienden y contienen fenestras, agrupadas para formar placas de tamiz; poseen brazos citoplasmáticos más gruesos que contienen vesículas pinocíticas, mitocondrias, lisosomas y otros organelos que se encuentran intercalados entre esas partes delgadas y pequeñas. Estas células son altamente especializadas y representan la interfase entre las células sanguíneas, por un lado, y los hepatocitos y las HSCs, por el otro. Representan una barrera permeable y existe libre acceso a fluidos, solutos, gotas y partículas desde la luz hacia el espacio de Disse y viceversa, esto debido a las fenestraciones presente.^{12,13}

Células de Kupffer (KCs)

Son los macrófagos residentes del hígado; comprenden cerca del 2 % de la masa/volumen del hígado. Estas células juegan un rol crucial en funciones hepáticas de inmunidad y metabólicas. Se originan de monocitos circulantes que migran hacia el hígado, donde se diferencian a macrófagos de tejido. Están localizadas dentro de la luz de los sinusoides, en las áreas portales, y se mantienen en su lugar mediante accesorios sujetos al endotelio sinusoidal. La función principal de las KCs en el hígado es fagocitar bacterias, microorganismos y agentes tóxicos acarreados por la circulación hepática, pues actúan como células presentadoras de antígenos, al considerarse la primera línea de defensa del organismo.^{1,12}

Células estelares hepáticas (HSCs)

Las HSCs originalmente fueron identificadas por von Kupffer en 1876, localizadas en el espacio de Disse, interpuestas entre las células endoteliales sinusoidales y los hepatocitos. Representan el 10 % del total de las células presentes en el

hígado. Una de sus características más importantes es el almacenamiento de ésteres de retinil en forma de gotas de lípidos. La activación de las HSCs promueve la transcripción de colágena tipo I y tipo III¹⁴. La activación de la transdiferenciación de las HSCs quiescentes en miofibroblastos fibrogénicos proliferativos ahora está bien establecida como un operador central de la fibrosis en la lesión hepática experimental y humana¹⁴. Cuando hay daño en el hígado, las HSCs se activan, pierden sus almacenamientos de vitamina A, expresan marcadores de músculo liso, mientras que sobreviene la producción de ECM, resultando en un proceso fibrótico que eventualmente lleva a la cirrosis.¹

Colangiocitos

Los colangiocitos son células epiteliales biliares, las cuales, como los hepatocitos, se originan de hepatoblastos durante el desarrollo embrionario. En la red biliar, que comienza con los canalículos biliares ubicados entre las membranas de los hepatocitos adyacentes, la bilis fluye hacia la periferia del lóbulo clásico y entra en los pequeños conductos o canales terminales de Hering.¹²

Células de Pit

Estas células se nombran células *natural killer* (NK), asociadas al hígado. Representan una forma modificada morfológica y funcionalmente de células NK del flujo sanguíneo. Se encuentran localizadas dentro del lumen del sinusoides, cercanamente adhiriéndose a las células endoteliales y a las células de Kupffer, a menudo extendiendo pseudópodos bien desarrollados, lo cual sugiere migración entre la pared sinusoidal. Pueden matar patógenos que invaden y también células transformadas, esto lo realizan a través de un repertorio sofisticado de receptores de activación e inhibición, debido a que su actividad citotóxica es controlada de manera muy delicada.^{12,15}

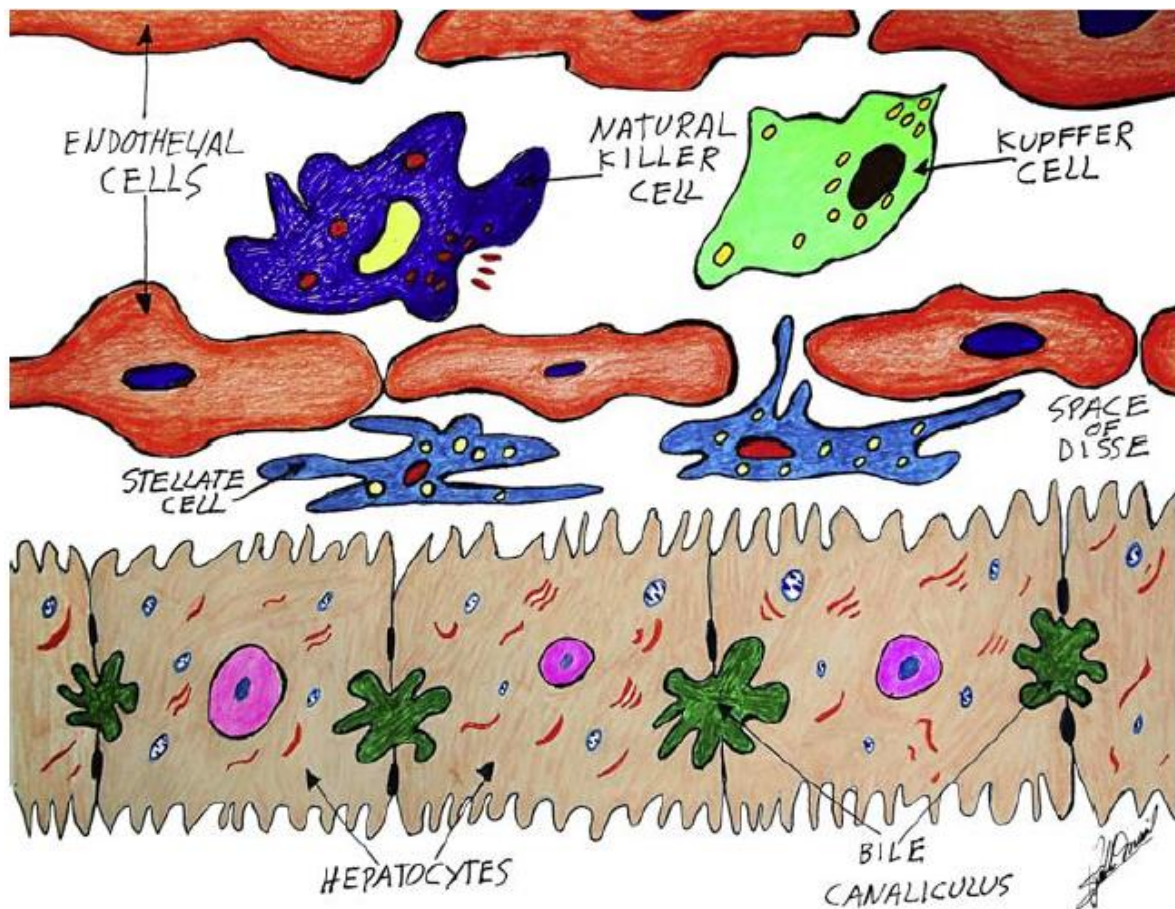


Figura 5. Células presentes en el hígado. Se muestran las principales células que conforman el hígado, las células endoteliales, las células natural killer, las células de Kupffer, las células estelares y los hepatocitos con sus canalículos biliares.¹

Estrés oxidante en la patogénesis de las enfermedades hepáticas

El estrés oxidante es definido como un desequilibrio entre la producción de radicales libres y el sistema antioxidante, el cual está encargado de mantener la homeostasis del organismo. Los radicales libres son átomos o moléculas con uno o más electrones desapareados, así, los radicales aniones o radicales cationes son, por definición, radicales libres.¹⁶⁻¹⁸

Durante el metabolismo hepático se producen diferentes radicales libres, incluyendo especies reactivas de oxígeno (ROS), especies reactivas de nitrógeno y especies reactivas de azufre. Los radicales libres producen peroxidación lipídica (LPO), además de daño a las proteínas, al DNA y RNA. El estrés oxidante contribuye a la fibrogénesis, incrementando citocinas perjudiciales, tal como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), interleucina 6 (IL-6), y el factor

de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Además, el TGF- β incrementa la producción de ROS en células endoteliales, células epiteliales, células del músculo liso y los fibroblastos.^{17,19}

Fibrosis hepática

La fibrogénesis es vista como un proceso dinámico relacionado al grado de daño del parénquima hepático. Implica que diferentes desórdenes fibrogénicos, identificados como degenerativos, sean considerados como resultado de eventos tales como un daño reiterativo al tejido e inflamación crónica. Las causas principales de fibrosis hepática en países industrializados incluyen infección del virus de la hepatitis C (HCV), el abuso del alcohol y la esteatohepatitis no alcohólica (NASH). La fibrosis hepática está asociada con alteraciones en la cantidad y composición de la ECM. En estados avanzados, el hígado contiene aproximadamente 6 veces más de lo normal de ECM, incluyendo colágena (I, III y IV), fibronectina, undulina, elastina, laminina, hialuronano y proteoglicanos; su acumulación se debe tanto al incremento en la síntesis y la disminución de la degradación.²⁰⁻²²

Una compleja interacción entre los diferentes tipos celulares hepáticos interviene en la fibrogénesis hepática (Figura 6). Los hepatocitos son blancos para la mayoría de los agentes hepatotóxicos, incluyendo los virus de la hepatitis, metabolitos del alcohol y ácidos biliares. Los hepatocitos dañados liberan ROS y mediadores fibrogénicos, e inducen el reclutamiento de células inflamatorias. La apoptosis de hepatocitos estimula las acciones fibrogénicas de miofibroblastos hepáticos. Las células inflamatorias, ya sean linfocitos o células polimorfonucleares, activan a las HSCs a secretar colágena; las HSCs secretan citocinas inflamatorias, expresan moléculas de adhesión, y modulan la activación de linfocitos. Por lo tanto, hay un círculo vicioso, en el cual las células inflamatorias y fibrogénicas se estimulan unas a otras.^{14,20}

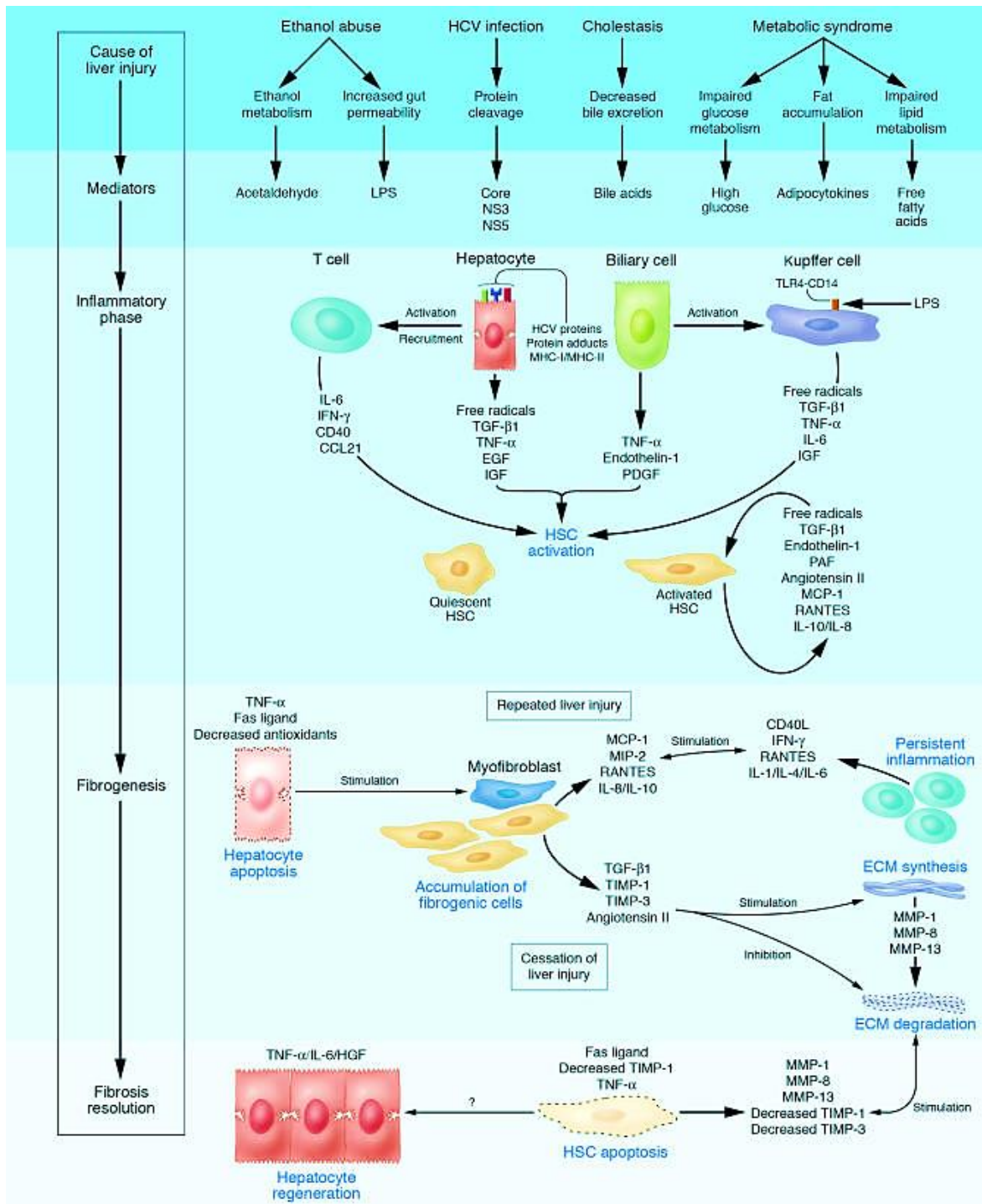


Figura 6. Mecanismos celulares de la fibrosis hepática. Los de agentes hepatotóxicos producen mediadores que inducen acciones inflamatorias en diferentes tipos celulares hepáticas. Los hepatocitos liberan citocinas inflamatorias y factores solubles que activan las células de Kupffer y estimulan el reclutamiento de las células T activadas. En este medio inflamatorio estimula la activación de HSCs residentes en miofibroblastos residentes. Las HSCs activadas también secretan citocinas que perpetúan su estado activado. Si la lesión hepática persiste, se produce la acumulación de HSCs activadas y miofibroblastos, sintetizando grandes cantidades de ECM y produciendo fibrosis tisular. Si se elimina la causa de la lesión hepática, hay resolución de la fibrosis.²⁰

Cirrosis

La cirrosis hepática (Figura 7) es la vía patológica común final del daño hepático derivado de una amplia variedad de enfermedades hepáticas crónicas, caracterizada por una extensiva fibrosis causada por alguna enfermedad crónica hepática, con la formación de nódulos de regeneración, flujo sanguíneo alterado y riesgo de falla hepática.²³

La fibrosis describe la encapsulación o reemplazo del tejido dañado por una cicatriz de colágena; ésta resulta de la perpetuación de la respuesta normal de la cicatrización de la herida, resultando en una continuación anormal de la fibrogénesis. La cirrosis es una etapa avanzada de la fibrosis hepática, acompañada de una distorsión de la vasculatura hepática. Las principales consecuencias clínicas de la cirrosis son la pérdida de la función hepática, un incremento en la resistencia intrahepática (hipertensión portal), y el desarrollo de carcinoma hepatocelular.¹⁹

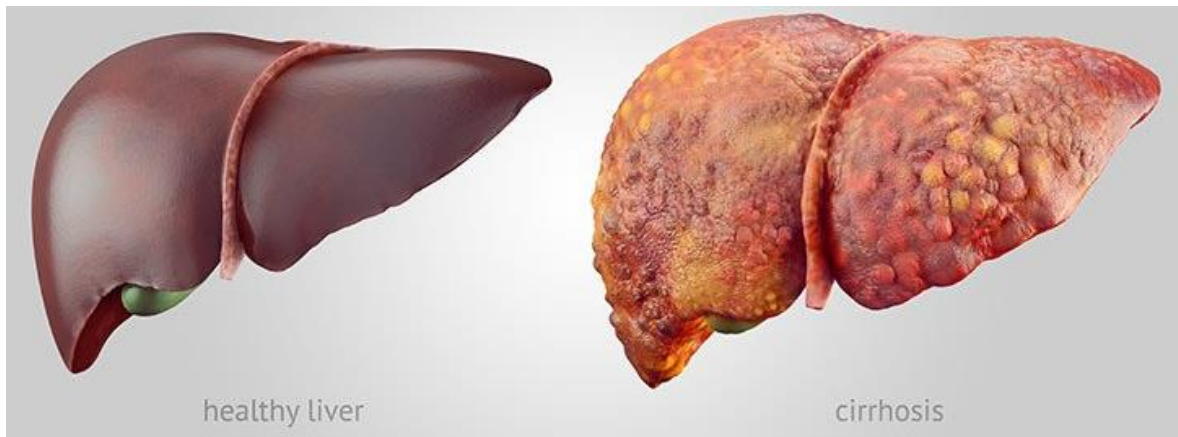


Figura 7. Hígado sano e hígado cirrótico. Un hígado normal que no muestra signos de cicatrices, mientras que el hígado cirrótico muestra tejido cicatricial que reemplaza el tejido hepático normal.²⁴

Modelo hepático inducido por la tioacetamida (TAA)

Existe un gran número de compuestos químicos conocidos que inducen la fibrosis hepática y, por lo tanto, son usados comúnmente para establecer modelos animales para estudiar este patrón particular de lesiones. En la mayoría de las ocasiones, la inyección intraperitoneal de estos compuestos químicos desencadena fibrosis hepática en un corto tiempo.

La TAA es un compuesto organosulfurado que tiene una fórmula química C_2H_5NS y es considerado carcinógeno (clase 2B). La TAA es un polvo sólido, cristalino, soluble en agua y en alcohol, el cual funciona como una fuente de iones sulfuro en la síntesis de compuestos orgánicos. Inicialmente, la TAA se utilizó para controlar la descomposición de los cítricos, especialmente la naranja, debido a su actividad fungicida. La TAA (Figura 8) requiere bioactivación de sus metabolitos tóxicos para causar daño hepático. La dosis letal (LD50) en ratas y ratones después de la administración oral e intraperitoneal es de aproximadamente 300 mg/kg de peso corporal. La TAA es primero oxidada a TAA-S-óxido (TAASO) y después a TAA-S,S-óxido (TAASO₂), los cuales son intermediarios con naturaleza tóxica; permitiendo el proceso de oxidación, llevando a estrés oxidante en células hepáticas y finalmente ocasionar fibrosis centrilobular y daño hepático. Este proceso puede ser llevado a cabo por enzimas del citocromo P450, la isoforma CYP2E1 o monooxigenasas que contienen FAD.²⁵⁻²⁷

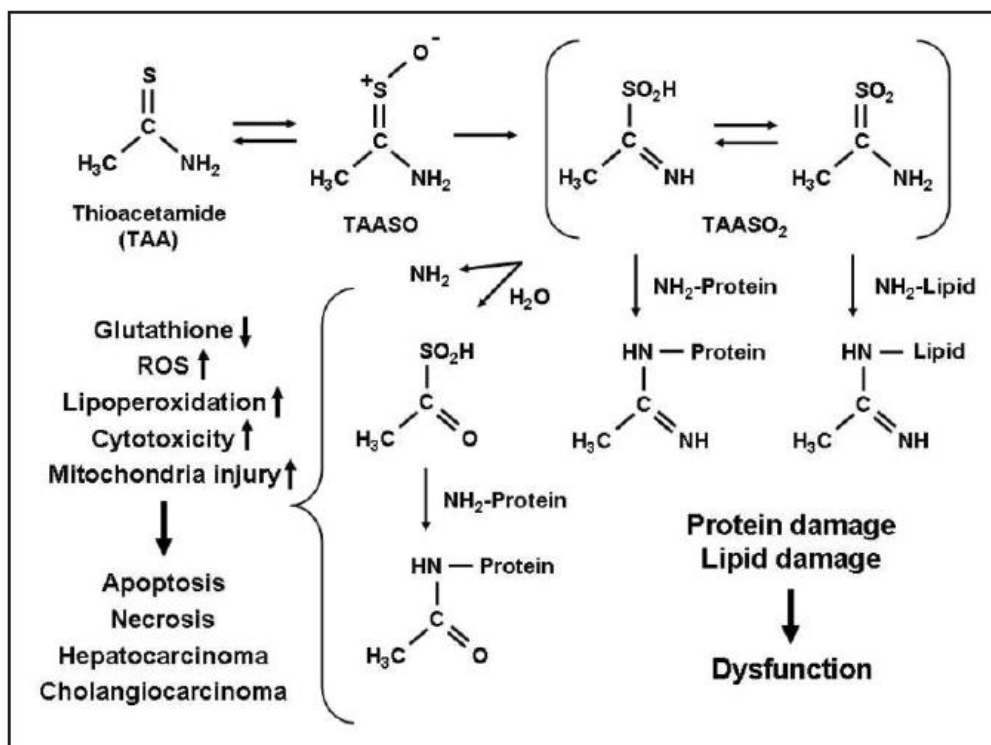


Figura 8. Metabolismo de la tioacetamida. Modelo simplificado para la transformación de metabolitos nocivos de tioacetamida (TAA) y sus efectos en los hepatocitos.²⁶

Propiedades antioxidantes del café

Los compuestos fenólicos de las plantas tienen propiedades antioxidantes, son agentes quelantes y modulan la actividad de diferentes sistemas enzimáticos, por lo que actúan en la dieta principalmente como factores que promueven la salud¹⁷.

El consumo de café se asoció con una menor prevalencia de cirrosis en un análisis epidemiológico seguido durante 10 años de 128,934 pacientes hospitalizados con cirrosis,²⁸ donde se detectó una relación inversa entre el consumo de café y el riesgo de desarrollar cirrosis hepática.^{18,29-31}

Consumo de café en México

De acuerdo a la Profeco (Procuraduría Federal del Consumidor), el 85 % de los mexicanos toman de una a tres tazas al día y son los hombres quienes consumen más: 3 tazas frente a 2 que toman las mujeres; según la FIRA (Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura), en México el consumo de café aumenta 2 % cada año. México consume café por debajo de otros países, pese a que el consumo per cápita sigue aumentando, pues pasó de 1.4 kg a 1.6 kg a principios de 2018, de acuerdo a datos presentados en la Expo Café. A nivel mundial, Brasil tiene un consumo per cápita de café de 6 kg, mientras que en Estados Unidos es de 4.5 kg; en la Unión Europea es representado por Francia e Italia, con un consumo per cápita de 5.6 kg y 5.1 kg, respectivamente.³²

Historia de la cafeína

Sin importar qué criterio se aplique, la cafeína es la droga más popular del mundo y su consumo supera ampliamente al de la nicotina y el alcohol. Es la única sustancia psicoactiva adictiva que ha superado la resistencia y desaprobación en todo el mundo, al grado en que se encuentra disponible libremente casi en todas partes, sin regulación; se vende sin permiso, se ofrece sin receta en tabletas y cápsulas, e incluso se añade a las bebidas destinadas a los niños. En seguida se muestra el promedio del contenido de cafeína en bebidas y comidas (Figura 9).^{33,34}

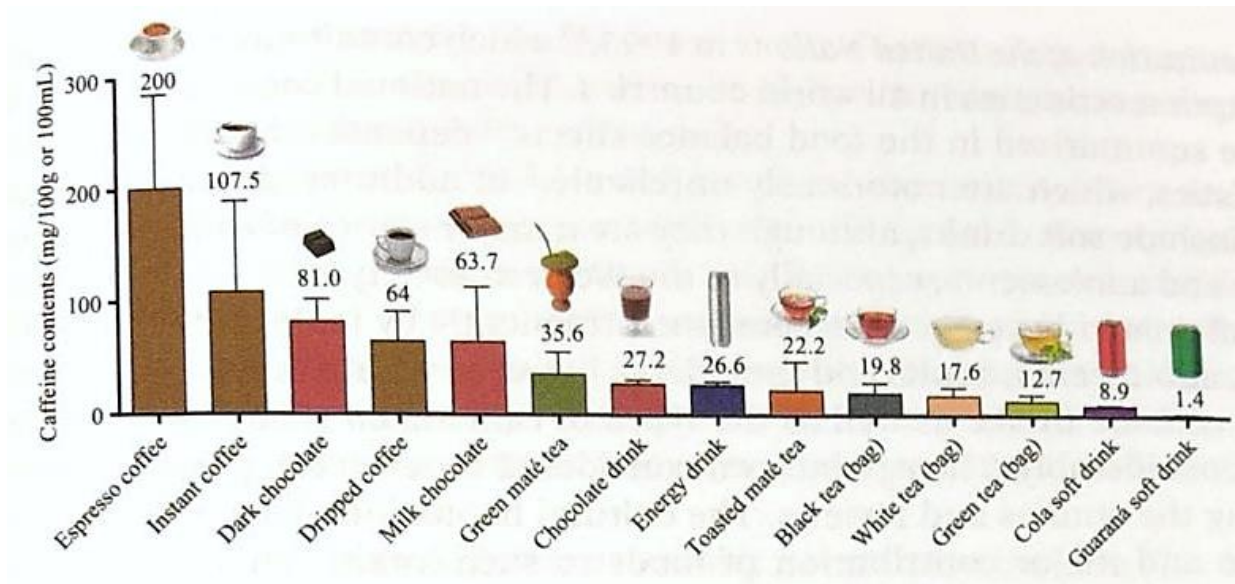


Figura 9. Contenido promedio de cafeína en alimentos estimulantes. La cafeína es un constituyente natural del café y otras especies de plantas, también se adiciona en bebidas y alimentos.³⁴

Aun cuando las plantas que contienen cafeína pueden haber sido empleadas por sus efectos farmacológicos antes de la historia registrada, sólo se aisló y se dio nombre a la sustancia cuando en el siglo XIX, el interés por la química de la plantas floreció en Europa, en específico, a través de un joven médico alemán, Runge, quien, como resultado de su encuentro con el septuagenario Johann Wolfgang von Goethe, mostró una curiosidad científica y un gran poder de observación que presagiaban su creativa carrera en la química analítica. Años después, esto posibilitó a Runge el poder obtener de Goethe la audiencia que llevaría al descubrimiento de la cafeína.³³

Sigue vigente el hecho de que la cafeína fue revelada al mundo por primera vez como resultado del encuentro entre un científico y un poeta; un origen curiosamente simbólico cuando se piensa en el vasto panorama de la historia de las drogas que, sin duda, abarca muchísimo de los dispares mundos de la ciencia y la cultura.³³

Existe un mito del pastor etíope Kaldi y sus cabras bailadoras, donde se habla del encuentro con el café ocurrido en Etiopía, ubicado justo al otro lado del estrecho pasaje del Mar Rojo, quien al notar los efectos tónicos en su rebaño cuando probaron las brillantes bayas rojas de una mata verde con flores olorosas, decidió

masticar las frutillas. Luego decidió llevar las bayas a un santón islámico de un monasterio cercano, pero el santón no aprobó el uso de esto y las arrojó al fuego, del que surgió una oleada de un tentador aroma. Con rapidez sacó de entre las brasas los granos tostados, los molió y disolvió en agua caliente, así obtuvo la primera taza de café del mundo.³³

Abdal Al-Qadir al-Jaziri (1558) escribió la más antigua historia del café que haya sobrevivido hasta nuestros días. Explicaba que, a principios del siglo XVI, oyó hablar por primera vez de una bebida llamada *qahwa* que estaba siendo usada por los sufíes y otros para ayudarlos a permanecer despiertos durante sus plegarias. Atribuyó la introducción y difusión del café a al-Din Abú (Dhabhani). Quizás nunca se descubra, pero concuerdan los historiadores árabes en que la bebida de café como la conocemos empieza aparentemente a mediados del siglo XV en algún lugar de Yemen o cerca de él en una orden sufí.

La difusión del café a partir de su consumo devoto por los sufíes hasta su consumo secular fue natural. Antes de dar inicio al *dhikr* o conmemoración ritual de la gloria de Alá, los sufíes compartían el café en una ceremonia: lo bebían cada lunes y viernes por la tarde, vertiéndolo en una gran vasija hecha de arcilla roja. Lo daban a beber a todos, mientras recitaban una de sus fórmulas usuales: “No hay más Dios que Dios, el Maestro, la Clara Realidad”. Gracias al ejemplo de los cónclaves sufíes, nacieron las *kahwe khaneh* o casas de café (Figura 10), las que, a medida que proliferaron, sirvieron como foros para extender el café más allá del círculo de las devociones, hasta su uso general en las capitales islámicas. En 1555, tanto el café como la casa de café fueron llevados a Constantinopla por Hakam y Shams, negociantes sirios de Alepo y Damasco, respectivamente.³³

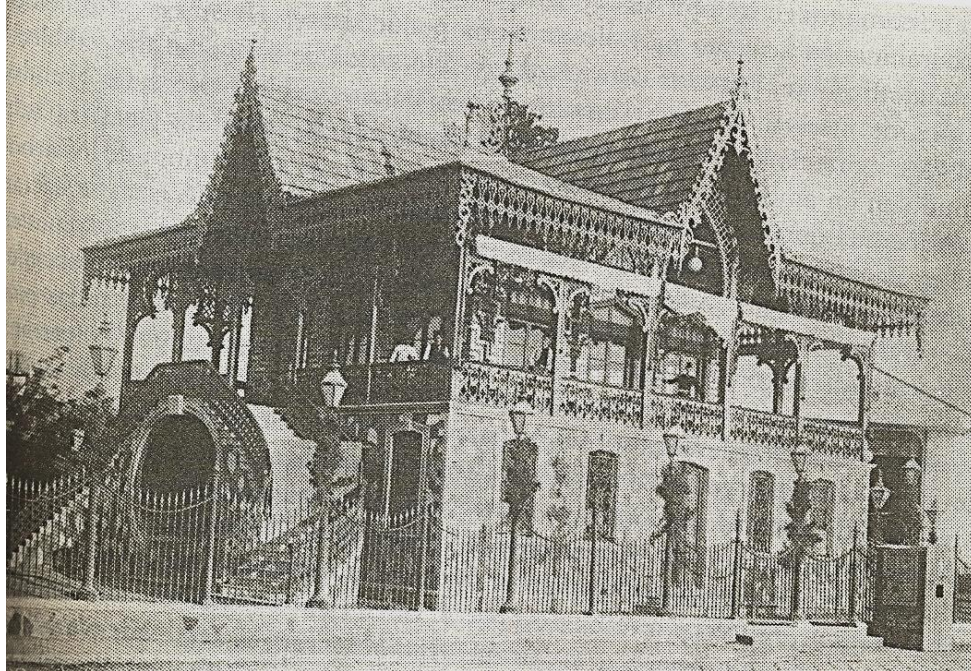


Figura 10. Fotografía de la casa de café Jardín de l'Éden, en Esmirna. El letrero de fondo dice: "Jardín del Edén". Esa casa de café es típica de los establecimientos de primera categoría situados en los mejores vecindarios de las grandes ciudades en todo Levante.³³

Muchas de las convenciones establecidas en las primeras casas de café siguen siendo sellos característicos de nuestros cafés y cafeterías en la actualidad. Los poetas y otros escritores iban a leer sus obras, el ambiente estaba lleno de los sonidos de los animados coloquios sobre ciencias y artes, y como en la Inglaterra de la casa de café, llegó a ser –a falta de periódicos– el lugar donde la gente se reunía para enterarse y discutir sobre los últimos acontecimientos sociales y políticos. En la Tabla 1 se presenta la historia del café como resumen.^{33,35}

El origen de la palabra café

Una teoría etimológica que cuenta con el apoyo de muchos académicos es que la palabra árabe *qahwa* proviene de una raíz que significa "hacer algo repugnante o disminuir el deseo de alguien por algo". Una segunda teoría que se ofrece de la palabra café la vincula con el territorio de Kaffa (que ahora normalmente se pronuncia Kefa), en Etiopía, una de las regiones de África. Algunos dicen que debido a que la planta creció primero en esa región y posiblemente ahí se preparó por primera vez la infusión de sus granos como bebida, los árabes le dieron el nombre de ese lugar.³³

La teoría etimológica más fabulosa combina una fantasía árabe divina, o demoniaca, y lo maravilloso, donde acepta que el café recibió su nombre de Kaffa y, al mismo tiempo, vincula la palabra *qahwa*, en el sentido de “no desear más”, con el nombre de la región. La idea se basa en varios cuentos islámicos que derivan del nombre Kaffa de la misma raíz arábica para “ya basta”.³³



Figura 11. Planta de café. Granos de café. *Ibrik* o jarra para hacer cocer el café. Taza para beber. Instrumentos para tostar el café. Los dos paneles de grabado muestran la planta de café, los granos tostados y los primeros accesorios y utensilios empleados en el Medio Oriente para preparar bebida.³³

Tabla 1. Acontecimientos históricos del café.³⁵

Año	Evento
600-800	Café descubierto en Etiopía.
1000	Comerciantes árabes inventan la bebida del café cuando hierven los granos.
1000-1600	Café cultivado y asado exclusivamente en Arabia. Las primeras tiendas de café abrieron en Mecca en la Edad Media.
1475	El café en camino a Europa: primera tienda de café Kiva Han abre en Constantinopla después de que el café fue introducido por los turcos otomanes en 1453.
1607	Introducción del café en Norte América.
1615	Comerciantes venecianos trajeron café a Europa.
1600s	Primeras casas de café europeas abren: Italia, 1645; Inglaterra, 1652; París, 1672; Viena, 1675; Berlín, 1721.
1675	El hábito de refinar la elaboración filtrando los granos, endulzándolos y agregando un poco de leche nace en Viena.
1700	Las colonias francesas y británicas introducen el plantío de café a Sudamérica y Centroamérica.
1727	Empezó la industria brasileña de café.
1773	El motín del té en Boston hace que beber café sea un deber patriótico en América.
1901	Primer café soluble fue inventado por los químicos japoneses-americanos Satori Kato.
1903	Primer café descafeinado fue inventado en Alemania.
1927	Se introdujo la primera máquina de expreso que producía crema de espuma.
1946	El capuchino nació en Italia.
1958	Se desarrolló la primera máquina de café con filtro de goteo.
1990	Un fenómeno: las tiendas de café en Norteamérica.
Ahora	Uso generalizado de máquinas de café de un solo servicio.

Té

Debido a que el té ha sido excepcionalmente prominente en la vida china desde hace mucho tiempo, el esfuerzo por encontrar su origen en el remoto pasado fue inevitable. Dicho esfuerzo se hizo realidad en la leyenda de Shen Nung, el primer emperador de China, personaje honrado como el inventor del arado y la agricultura, expositor de las propiedades curativas de las plantas y, lo más importante para nuestra historia, descubridor del té. De acuerdo con la leyenda, Shen Nung se sentó a la sombra de un arbusto para descansar en las hojas de más calor. Decidió refrescarse encendiendo una hoguera e hirviendo un poco de agua para beberla, práctica que había iniciado después de notar que quienes bebían agua hervida enfermaban con menor frecuencia que los que la bebían directamente del pozo. Alimentó al fuego con ramas de un arbusto de té y una brisa hizo caer algunas de las hojitas en su jarra, cuando Shen Nung bebió la infusión resultante, fue el primero en disfrutar los estimulantes efectos y lo delicado y refrescante del té.³³

Ladrillos de té

Para hacer ladrillos –o bloques– de té, se golpeaban, moldeaban y presionaban hojas dentro de un molde y luego se colgaban sobre un hoyo al aire libre para secarlas con un fuego de leña de madera noble o carbón. Cuando estaban listas, se colocaban los ladrillos en canastos atados al extremo de una pértiga para su entrega en todas partes del país. En tiempos antiguos se mascaban los ladrillos de hojas prensadas; en épocas posteriores se ponían a hervir con cebolla, jengibre, azufraifas, cáscara de naranja, cerezas silvestres o menta, o también con arroz, especias o leche.

Cuando China cayó bajo el dominio de los mongoles, el té entró en decadencia como fuerza cultural. Posteriormente, la importancia del té retornó con la reafirmación del poder imperial nativo durante la dinastía Ming (1368-1644). En esa época, el té se preparaba remojando primero la hoja curada en una taza. Algunos bebedores ricos de té colocaban un disco de plata de filigrana en la taza para mantener las hojas en el fondo. Durante ese periodo se desarrollaron nuevos

métodos para curar la hoja de té, con el resultado de que, cuando llegaron los viajeros de Occidente, encontraron hojas fermentadas en diversos grados, que erróneamente creyeron de diversas especies: té negro, té verde, té oolong.³³

Asimismo, durante el periodo Ming, el té ascendió a su plena posición como placer ritual y refrigerio espiritual que trascendía la condición de comestible ordinario, posición que todavía ocupa hoy en día.³³



Figura 12. Fotografía de unos tibetanos que cargan ladrillos de té de China, donde obtuvieron mediante el trueque. Avanzaban unos diez kilómetros al día con sus cargas de 135 kilogramos de la mercancía, que en su país se consideraba una necesidad.³³

Chocolate

Erróneamente se cree que el uso de los granos de cacao tuvo su origen entre los mayas de Mesoamérica, pero recientes descubrimientos revelan que los olmecas (1500 a 400 antes de nuestra era), miembros de la primera gran civilización americana que habitaron en las fértiles tierras bajas costeras de México, cientos de años antes de que llegaran los mayas, cosechaban unas vainas de cacao silvestres con las que preparaban una bebida de chocolate. Muy posiblemente fueron ellos los primeros que cultivaron el árbol. Los primeros mayas (1000 a.C. a 250 d.C.) fueron el segundo pueblo que cultivó el cacao, al que hirvieron, esto en la península de Yucatán. Después de la desaparición maya, en el siglo IX de nuestra era, el chocolate fue una bebida de los toltecas, quienes florecieron del siglo X al XII, y los aztecas, cuyo ascenso comenzó en el siglo XII. Fueron manos

aztecas las que sirvieron por primera vez el chocolate a los conquistadores españoles a comienzos del siglo XVI.³³

Los mayas fueron el primer pueblo del continente americano que llevó registros históricos, si bien la mayoría de esos registros se perdieron cuando los conquistadores y misioneros erradicaron todo rastro de la religión y la cultura nativas que pudieron encontrar. No obstante, debido a su lejanía y a la densa selva, así como a lo inhóspito del territorio de los alrededores, las ruinas de algunas ciudades mayas antiguas permanecieron desconocidas hasta el siglo XIX y, por lo tanto, escaparon a la destrucción sistemática llevada a cabo por los invasores europeos. Las inscripciones mayas supervivientes en vasijas, jade, huesos, piedras y muros de los palacios hicieron su aparición hasta el año 50 antes de nuestra era para narrar la historia de los linajes reales, desde esa época hasta la conquista española. Es posible que los mayas también hayan elaborado libros en papel de corteza en los que registraban los inventarios de sus recetas, pero seguramente desaparecieron en el húmedo calor del trópico. El único registro que se conserva sobre el uso del cacao durante el periodo Maya Clásico (250-900 d.C.) son las vasijas decoradas descubiertas en las tumbas de los poderosos, donde se describe que los mayas usaban el cacao como moneda corriente en todos sus dominios y los precios se fijaban en granos; por ejemplo, ocho a diez granos por un conejo, cien por un esclavo, cuatro por una calabaza.³³

Alonso Molina publicó el primer diccionario del náhuatl al español y consigna que la paga diaria de un cargador en el México central era de cien granos. Podemos darnos una idea del costo de la vida para la población nativa de la época y del costoso lujo que debió de ser el cacao para el campesino maya medio. Cuando los mayas fueron derrotados por sus enemigos, los aztecas, entre los artículos de tributo que se les impusieron estaban los sacos de cacao.³³

Los relatos del salvajismo de los primeros mesoamericanos abundan. Antes de sacrificar un prisionero a su diosa del sustento, los mayas –que se establecieron en Chichén Itzá, ciudad de la península de Yucatán que llegó a ser el centro de la cultura, producto de la mezcla maya y mexica– le servían hospitalariamente una

taza de chocolate frío espeso, con la esperanza de ocasionar un literal cambio de corazón; creían que, una vez vacía la copa, el corazón, transformado en vaina de cacao, estaba maduro para sacárselo del pecho y quemarlo como ofrenda. Los conquistadores españoles se impresionaron.³³

Los orígenes de las palabras cacao y chocolate

La palabra cacao se deriva *kakawa*, que se cree tuvo su origen en lo que los lingüistas recientemente decidieron que era la lengua olmeca, integrante de la familia mixe-zoque de lenguas, fuente de muchos préstamos importantes para las lenguas mesoamericanas posteriores. Aunque no se conserva texto alguno de ese periodo, los especialistas atribuyen por inferencia de la palabra *kakawa* al vocabulario olmeca de alrededor del año 1000 antes de nuestra era.³³

El primer glifo, *ka*, representa un peine o una pluma; el segundo, que también se pronuncia *ka*, representa una aleta de pez, y el tercero, *w(a)*, es simplemente el signo de una *w* final. La palabra inglesa chocolate, que designa varias preparaciones de cacao, tiene una relación etimológica incierta con el cacao. Se deriva del uso español *chocolatl*, que apareció por primera vez en el Nuevo Mundo, en algún momento después de 1650, pero nadie parece saber cómo o por qué la palabra azteca para chocolate, *cacahuatl*, formada con la combinación del maya *kakawa* con la palabra *atl*, que significa agua, fue reemplazada por *chocolatl*.³³

Propiedades hepatoprotectoras del café y la cafeína

El café es una de las bebidas más frecuentemente consumidas alrededor del mundo. El consumo de más de tres tazas por día ha sido inversamente relacionado con la incidencia de enfermedades del hígado, fibrosis/cirrosis y el desarrollo de carcinoma hepatocelular en pacientes con o sin virus de la hepatitis B y/o C.³⁶

La evidencia que el consumo de café tiene un efecto protector en enfermedades crónicas del hígado se ha determinado durante las décadas pasadas. Estudios epidemiológicos han mostrado que el consumo de más de dos tazas de café al día estaba asociado con niveles menores de alanino aminotransferasa en suero.³⁷

El principal compuesto farmacológico activo en el café es la cafeína, la cual se sabe que tiene efectos en diferentes funciones incluyendo la estimulación del sistema nervioso central. Existe evidencia que muestra que la cafeína ejerce efectos beneficiosos en el hígado. La cafeína mostró propiedades antioxidantes y de protección a membranas en contra del daño oxidativo, principalmente previene la fibrosis experimental inducida con la TAA, este efecto es principalmente debido al bloqueo de la expresión de la citocina fibrogénica TGF- β , lo cual conduce en una regulación a la baja de la síntesis de proteínas de matriz extracelular. También se observó que la cafeína puede bloquear la expresión de α -SMA y por lo tanto se evita la activación de las células estelares, ya que éstas una vez activadas, incrementan la producción de colágena fibrilar y son los principales tipos celulares encargados de la producción de matriz extracelular en el tejido hepático dañado³⁸.

JUSTIFICACIÓN

En México, las enfermedades del hígado se encuentran dentro de las seis principales causas de muerte en población de 30 a 60 años. Lamentablemente no existe tratamiento para este padecimiento.

A la cafeína se le han atribuido características hepatoprotectoras y, por lo tanto, en este proyecto nos planteamos evaluar la capacidad de esta molécula para detener la progresión de la fibrosis inducida con TAA en la rata.

HIPÓTESIS

Debido a que se ha demostrado que la cafeína tiene propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y es capaz de impedir el desarrollo de la fibrosis, se presume que este alcaloide será capaz de evitar la progresión del daño crónico inducido mediante la administración de TAA.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar la capacidad de la cafeína para evitar la progresión de la fibrosis hepática experimental.

Objetivos particulares

- Evaluar la capacidad antioxidante, antiinflamatoria y antifibrótica de la cafeína en un modelo de fibrosis, inducida con la TAA.
- Llevar a cabo un análisis histopatológico para determinar la capacidad de la cafeína de impedir alteraciones en el parénquima hepático inducidas mediante la administración de la TAA.
- Determinar los posibles mecanismos de acción por los cuales actúa la cafeína para evitar la progresión del daño crónico inducido mediante la administración de la TAA en la rata.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y seres vivos

Se utilizaron ratas Wistar macho de 100 ± 20 g de peso corporal. Se indujo fibrosis con la administración de TAA a una dosis de 200 mg/kg por vía intraperitoneal cada tercer día, durante 6 semanas, donde a partir de la cuarta semana se empezó a administrar cafeína a una dosis de 50 mg/kg por vía oral diariamente.

En seguida se muestran los grupos que se tenían para evaluar la capacidad de la cafeína para evitar la progresión de fibrosis hepática (Figura 13).

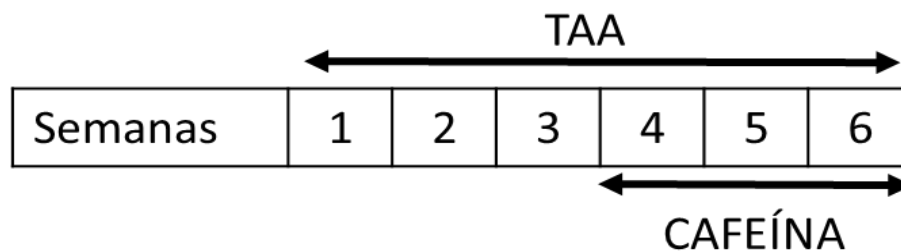


Figura 13. Esquema del diseño experimental.

Grupo 1. Control (solución salina)
Grupo 2. Daño TAA por 3 semanas (200 mg/kg tres veces por semana)
Grupo 3. Daño TAA por 6 semanas (200 mg/kg tres veces por semana)
Grupo 4. TAA + Cafeína
Grupo 5. Cafeína (50 mg/kg diariamente)

Los animales tuvieron libre acceso a alimento y se mantuvieron en ciclos de 12 h luz/oscuridad. Posteriormente se anestesiaron las ratas con un coctel de ketamina

y xilacina, después se sacrificaron por exanguinación y se colectó la sangre por punción cardiaca.

Las siguientes son las determinaciones bioquímicas en el plasma e hígado:

- Las ratas fueron sacrificadas por exanguinación, realizando una punción cardiaca a las 6 semanas de haber empezado el tratamiento; éstas fueron anestesiadas con un coctel de ketamina a una dosis de 100 mg/kg y xilacina a una dosis de 8 mg/kg, en una proporción de 1:3. La sangre fue centrifugada a 3000 rpm durante 15 minutos para separar el suero, por lo que se determinaron los siguientes parámetros, la actividad de las enzimas ALT, FA y γ -GTP. Posteriormente se extrajo el hígado para realizar pruebas y determinar el glucógeno presente, el GSH y la colágena. Además, se obtuvieron muestras para después ser procesadas y realizar un análisis histopatológico, en donde se realizaron tinciones de hematoxilina y eosina, al igual que de tricrómica de Masson. También se llevaron a cabo inmunohistoquímicas de TGF- β , - α -SMA y P-65, se determinaron proteínas por medio de western blot, como lo son TGF- β , - α -SMA, P-65, 4-HNE, IL-1 β , TNF- α , y por último se determinó la actividad de las MMP-9 y MMP-2.

A continuación se presenta un esquema representativo del protocolo a seguir.

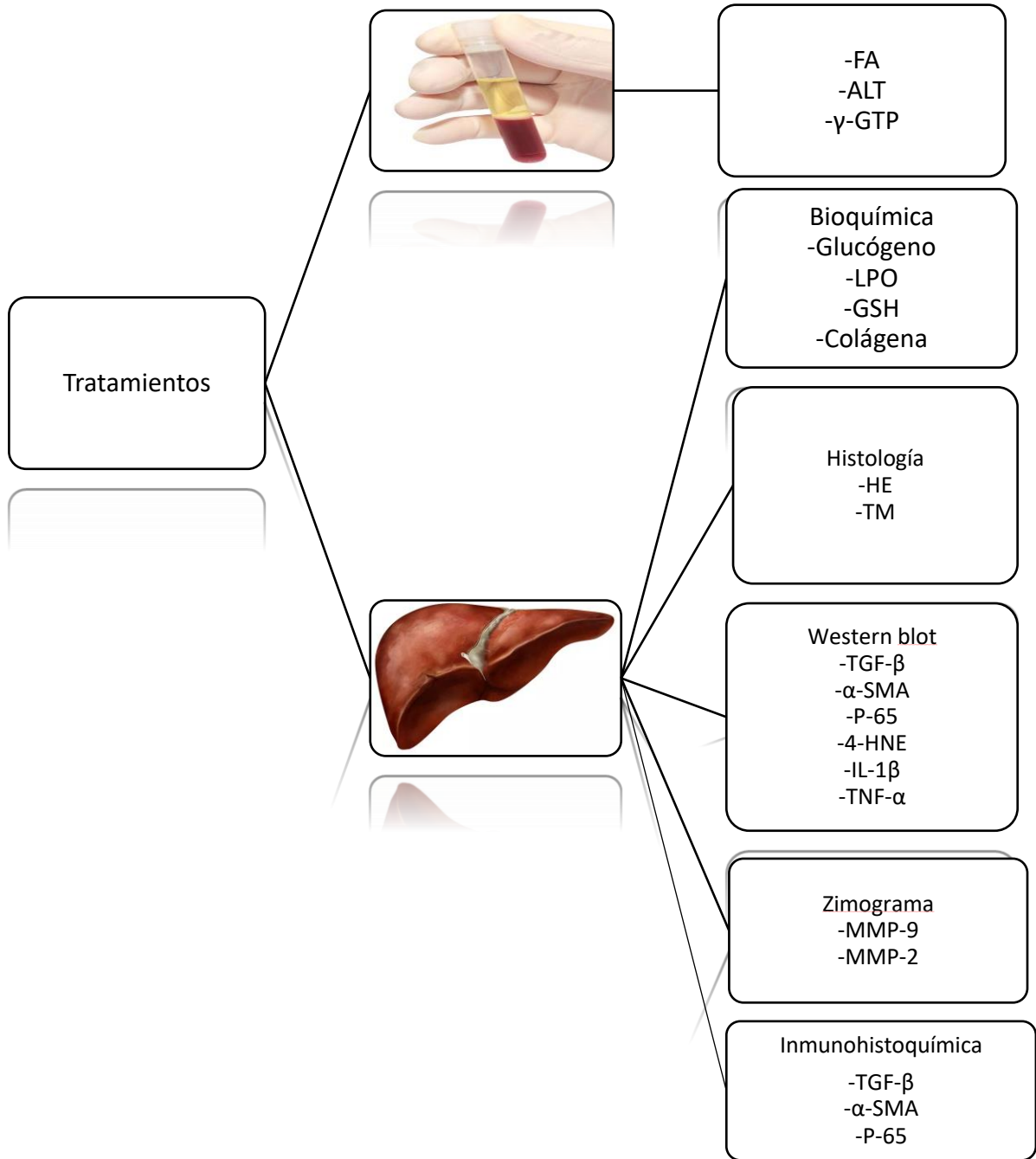


Figura 14. Metodología que se llevó a cabo.

Técnicas

Determinación de la actividad de ALT

La ALT es una enzima ampliamente distribuida en el organismo, especialmente en ciertos órganos como el hígado, el corazón, el riñón, etc. Se localiza en el citoplasma del hepatocito y se considera que la elevación de esta enzima en el suero sanguíneo indica necrosis.

Se describe a continuación la técnica

Se colocan tres series de ocho tubos de 15X150 mm y en cada tubo se adicionan

	Blanco (mL)	Problema (mL)
Solución de sustrato	0.25	0.25
Suero problema	---	0.25
Se mezcló, se agitó suavemente y se incubó a 37 °C durante 60 min.		
Reactivo cromógeno	0.25	0.25
Suero problema	0.050	---
Se incubó a 37 °C durante 15 min		
Se paró la reacción con		
NaOH 0.4 N	2.5	2.5
Se leyó a 515 nm		

En la tabla 2 se indican los reactivos y cantidades empleadas para preparar los distintos puntos de la curva estándar de calibración. Cada punto (concentración conocida del producto) se realizó por duplicado.

Tabla 2. Curva de calibración de ALT.

Curva estándar de calibración de la ALT						
Tubo	Solución sustrato (μl)	Solución estándar de piruvato (μl)	Buffer de fosfatos (μl)	Reactivo cromógeno (μl)	NaOH 0.4N (ml)	μmoles de piruvato
1	250	-	50	250	2.5	-
2	225	25	50	250	2.5	0.025
3	200	50	50	250	2.5	0.05
4	175	75	50	250	2.5	0.075
5	150	100	50	250	2.5	0.1
6	125	125	50	250	2.5	0.125
7	100	150	50	250	2.5	0.150

Se prepararon las siguientes soluciones:

1.- Buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.4: Se mezclaron 840 ml de solución 0.1 M de fosfato disódico con 160 ml de solución 0.1 M de fosfato monopotásico.

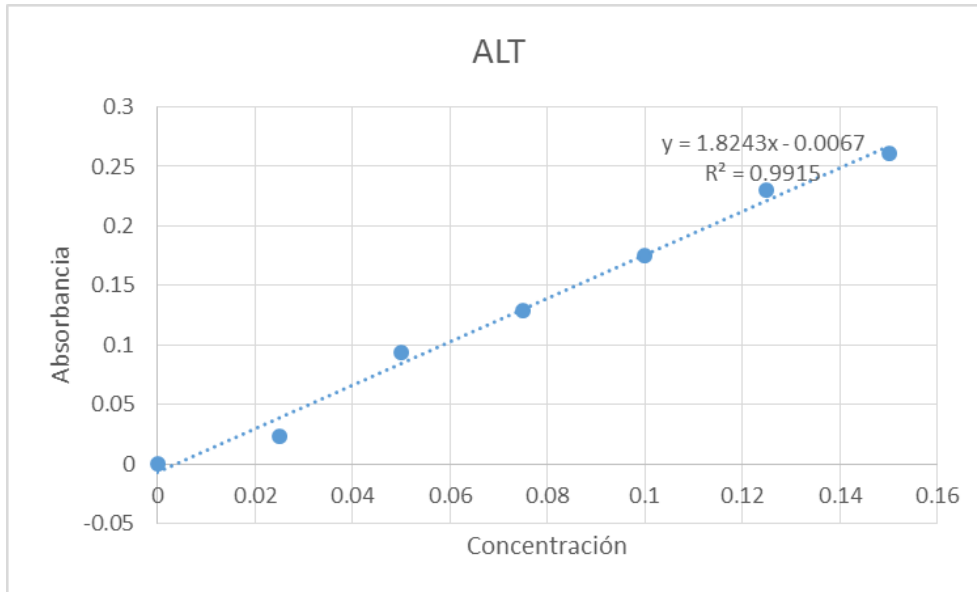
2.- Solución de sustrato: Se disolvieron 1.78 g de D/L alanina y 30 mg de ácido alfaoxoglutarico en solución buffer; se añadieron 0.5 ml de hidróxido de sodio 1 N y se completaron hasta 100 ml con solución buffer. Se conservó a 4 °C.

3.- Reactivo cromógeno: Se disolvieron 200 mg de 1,4 dinitrofenilhidrazina en ácido clorhídrico 1 N caliente y se completó hasta un litro con HCl 1 N y así la solución que se preparó es 1 mM.

4.- Solución estándar de piruvato: (1 μmol/ml) Se disolvieron 11 mg de piruvato sódico en 100 ml de solución buffer. Se preparó el mismo día que se utilizó.

Después se agitaron los tubos y se leyeron a 515 nm en un espectrofotómetro.

Posteriormente, los valores obtenidos de las absorbancias se alinearon con sus concentraciones y se usó la ecuación de la recta $y = mx + b$, en donde y corresponde a cada uno de los valores de absorbancia obtenidos en la lectura de las muestras de plasma sanguíneo, m la pendiente de la recta, b la ordenada al origen, y x corresponde al valor de concentración desconocido.



Gráfica 1. Curva para la determinación de la actividad de la enzima ALT. Se muestra la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación.

Determinación de la actividad de la FA

La FA es una enzima que se encuentra en todos los tejidos corporales. Los tejidos que contienen una cantidad más elevada de FA son el hígado, las vías biliares y los huesos. Una elevación en la actividad de la FA indica un alto grado de colestasis.

Se colocaron dos series de ocho tubos de 15X150 mm y en cada tubo se adicionaron:

- 250 μ L de buffer de glicina 0.1 M-MgCl₂ 1 mM, pH 10.5.
- 250 μ L de sustrato para nitrofenilfosfato

Previa incubación por 5 minutos a 37 ° C, se inicia la reacción con 50 μ L de suero y se mezcla suavemente.

Se incuba por un lapso de 30 minutos, se detiene la reacción con 5 mL de NaOH 0.02 N.

Al término de incubación, se realiza la lectura a una longitud de onda de 410 nm, se cuantifica la para-nitroanilina producida mediante la curva estándar.

Se hace un blanco sustituyendo los 50 μ L de suero por agua

En la tabla 3 se indican los reactivos y cantidades empleadas para preparar los distintos puntos de la curva estándar de calibración. Cada punto (concentración conocida del producto) se realizó por duplicado.

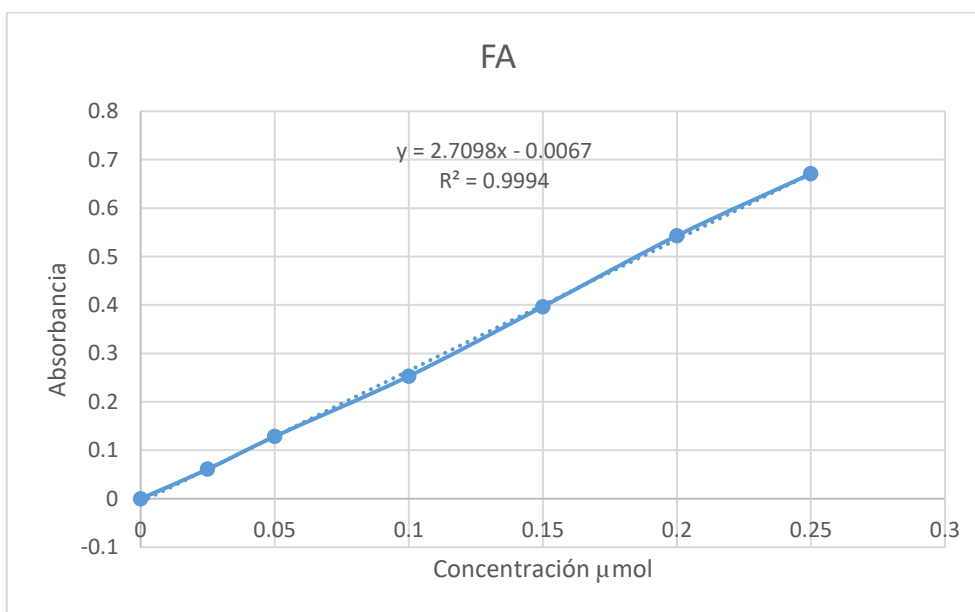
Tabla 3. Curva de calibración de la FA.

Curva estándar para la fosfatasa alcalina			
Tubo	Solución 2 (ml)	Solución 3 (ml)	Sustrato hidrolizado (μmoles)
1	0	5.5	0
2	0.5	5	0.025
3	1.0	4.5	0.050
4	2.0	3.5	0.10
5	3.0	2.5	0.15
6	4.0	1.5	0.20
7	5.0	0.5	0.25

Se prepararon las siguientes soluciones:

- 1.- p-nitrofenol 10 $\mu\text{moles/ml}$. Se pesaron 34.77 ml de p-nitrofenol en 25 ml de agua.
- 2.- Solución 2. Se tomaron 0.5 ml de la solución de p-nitrofenol y se lleva a 100 ml de NaOH 0.02 N.
- 3.- NaOH 0.02 N.

Posteriormente se agitaron los tubos y se leyeron a 410 nm en un espectrofotómetro. Luego de obtener las absorbancias, se les asignó su valor de concentración, después se construyó la ecuación $y = mx + b$, en donde y corresponde a cada uno de los valores de absorbancia obtenidos en la lectura de las muestras de plasma sanguíneo, m la pendiente de la recta, b la ordenada al origen, y x corresponde al valor de concentración desconocido.



Gráfica 2. Curva de calibración para la determinación de la actividad de FA. Se muestra la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación.

Determinación de γ -GTP

La γ -GTP es una enzima que, al igual que la FA indica colestasis. La función de esta enzima es transferir grupos γ -glutamil entre péptidos. Está presente en la membrana celular de muchos tejidos, siendo más abundante en el hígado, las vías biliares y el páncreas.

Se colocaron dos series de nueve tubos de 15X150 mm y en cada uno se adicionaron:

- 400 μ L de Tris-HCl 200 mM a pH 8.2.
- 100 μ L de MgCl₂ 200 mM
- 100 μ L de glicil-glicina 40 mM, pH 8.2
- 200 μ L de γ -glutamil- paranitroanilida

Se incubó previamente por 10 minutos a 37 °C, se inició la reacción con 200 μ L de suero.

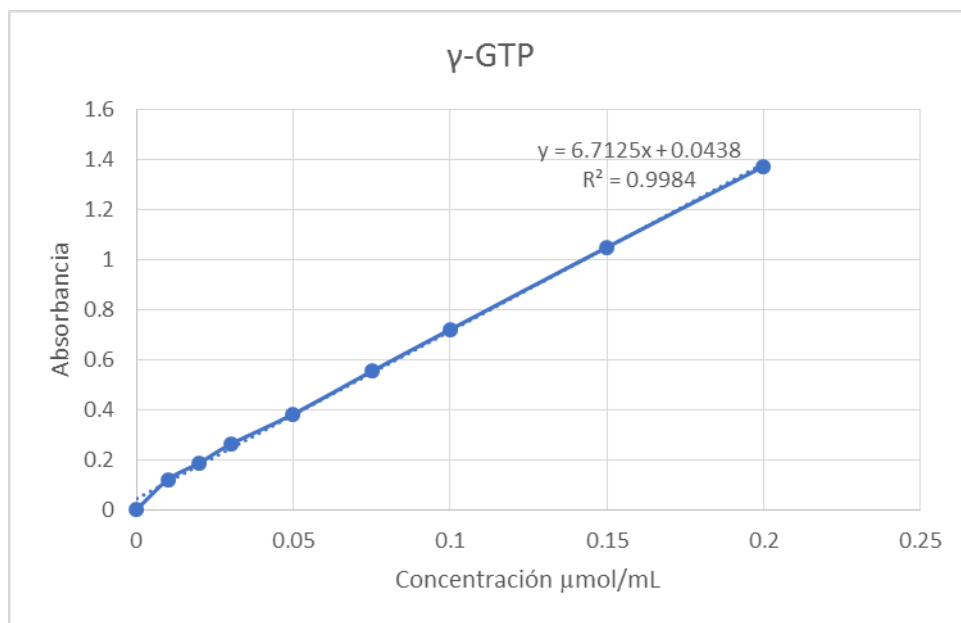
En la tabla 4 se indican los reactivos y cantidades empleadas para preparar los distintos puntos de la curva estándar de calibración. Cada punto (concentración conocida del producto) se realizó por duplicado.

Tabla 4. Curva de calibración de γ -GTP.

Tubo	Solución 1 (μl)	H₂O (μl)	nmoles/ml	μmoles/ml
1	50	1950	10	0.01
2	100	1900	20	0.02
3	150	1850	30	0.03
4	250	1750	50	0.05
5	375	1625	75	0.075
6	500	1500	100	0.1
7	750	1250	150	0.15
8	1000	1000	200	0.20

La solución 1 se preparó de la siguiente manera:

Se pesaron 13.8 mg de p-nitroanilina para llevarlos a 250ml con ácido acético 1.5 M. Después se agitaron los tubos y se leyeron a 410 nm en el espectrofotómetro. En seguida se obtuvieron las absorbancias de las concentraciones conocidas de p-nitroanilina y se construyó la ecuación $y = mx + b$, en donde y corresponde a cada uno de los valores de absorbancia obtenidos en la lectura de las muestras de plasma sanguíneo, m la pendiente de la recta, b la ordenada al origen, y x corresponde al valor de concentración desconocido.



Gráfica 3. Curva de calibración para la determinación de la actividad de Y-GTP. Se muestra la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación.

Determinación de glutatión reducido

Este parámetro fue evaluado como indicador de estrés oxidativo a nivel citoplasmático. El fundamento de esta técnica se basa en la medición de grupos sulfhidrilo. En 1959, Ellman introduce el uso del ácido 5,5'-ditio-*bis*-(2-nitrobenzoico), también conocido como DTNB, un compuesto versátil, soluble en agua, para la cuantificación de grupos sulfhidrilo. El DTNB reacciona con grupos sulfhidrilo libres para producir una mezcla de disulfuro y ácido 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB). El sitio diana del DTNB es la base conjugada (R-S*) de un grupo sulfhidrilo libre; por lo tanto, la velocidad de esta reacción es dependiente de varios factores: 1) el pH de la reacción, 2) el pKa de los grupos sulfhidrilo y 3) los efectos estéricos y electrostáticos. El TNB es la especie colorida (amarillo) en esta reacción; el coeficiente de extinción del TNB se observa a 412 nm a pH de 8.

- Se homogeneizaron 0.3 g de hígado en 1.2 mL de solución precipitante.
- Se centrifugaron por 20 min a 12000 rpm.
- Se tomó 0.1 mL de sobrenadante (por duplicado) más 2.1 solución de fosfatos más 0.25 mL de reactivo de Ellman.
- El blanco se realizó sustituyendo el sobrenadante de homogeneizado por agua.
- Se agitaron y se leyeron a una longitud de onda de 412 nm.

En la tabla 5 se indican los reactivos y cantidades empleadas para preparar los distintos puntos de la curva estándar de calibración. Cada punto (concentración conocida del producto) se realizó por duplicado.

Tabla 5. Curva de calibración de GSH.

Tubo	Vol. GSH (μl)	Nmol	Na₂HPO₄ (ml)	DTNB (ml)
B	0	0	2.2	0.25
1	10	10	2.19	0.25
3	50	50	2.15	0.25
4	100	100	2.10	0.25
5	250	250	1.95	0.25
6	450	450	1.75	0.25
7	650	650	1.55	0.25
8	850	850	1.35	0.25

Se prepararon reactivos previamente.

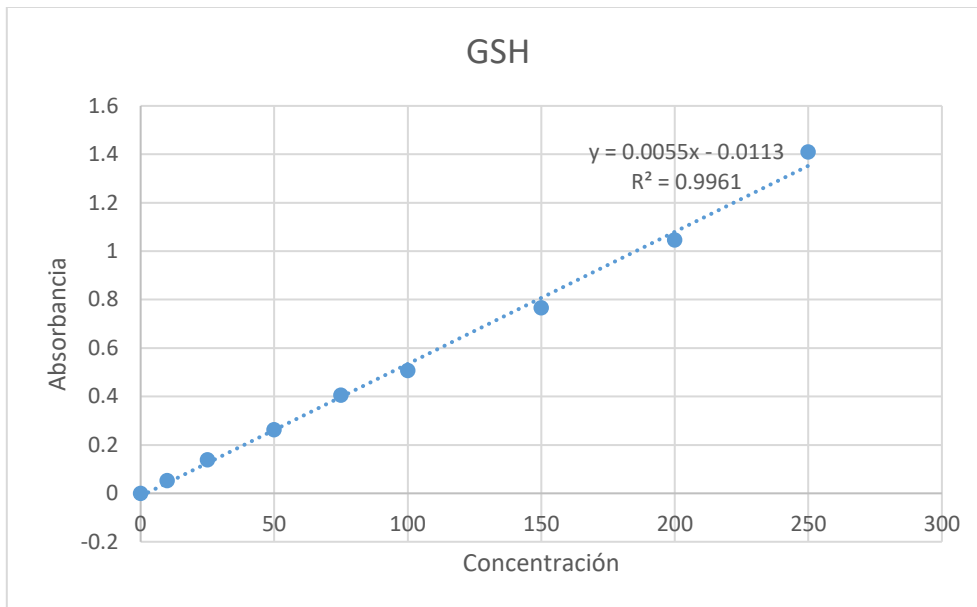
Reactivo de Ellman (DTNB)

Se pesaron 40 mg de ácido 5-5'-ditiobis nitrobenzónico (DTNB), posteriormente se preparó una solución de citrato de sodio al 1 % en 100 ml de agua, finalmente se disolvió el DTNB en la solución de citrato.

Posteriormente se preparó una solución de fosfatos Na₂HPO₄ 0.3 M (disuelto en agua).

La solución precipitante se preparó con una solución EDTA 5mM en TCA 5%.

Se agitaron las muestras y se leyeron en el espectrofotómetro a una absorbancia de 412 nm. Después de obtener las absorbancias de las concentraciones conocidas de GSH, se construyó la ecuación $y = mx + b$, en donde y corresponde a cada uno de los valores de absorbancia obtenidos en la lectura de las muestras de plasma sanguíneo, m la pendiente de la recta, b la ordenada al origen, y x corresponde al valor de concentración desconocido.



Gráfica 4. Curva de calibración para la determinación de GSH. Se muestra la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación.

Determinación de la cantidad de proteínas hepáticas por el método de Bradford

- Se colocaron tres series de ocho tubos de 13X100 mm.
- En una serie de ocho tubos, se tomaron 100 μL de homogenizado de hígado y se llevó a 1000 mL con agua tridestilada.
- Se tomaron alícuotas para proteínas y se llevaron a 100 μL con agua en las siguientes dos series de ocho tubos (de la dilución anterior se tomaron 20 μL más 80 μL de agua destilada).
- Se añadieron 2400 μL del reactivo de Bradford.
- Se leyó la absorbancia del complejo colorimétrico a 595 nm.
- Se preparó un blanco sustituyendo el homogenizado de hígado por 100 μL de agua.

En la tabla 6 se indican los reactivos y cantidades empleadas para preparar los distintos puntos de la curva estándar de calibración. Cada punto (concentración conocida de proteína) se realizó por duplicado.

Tabla 6. Curva de calibración de proteínas.

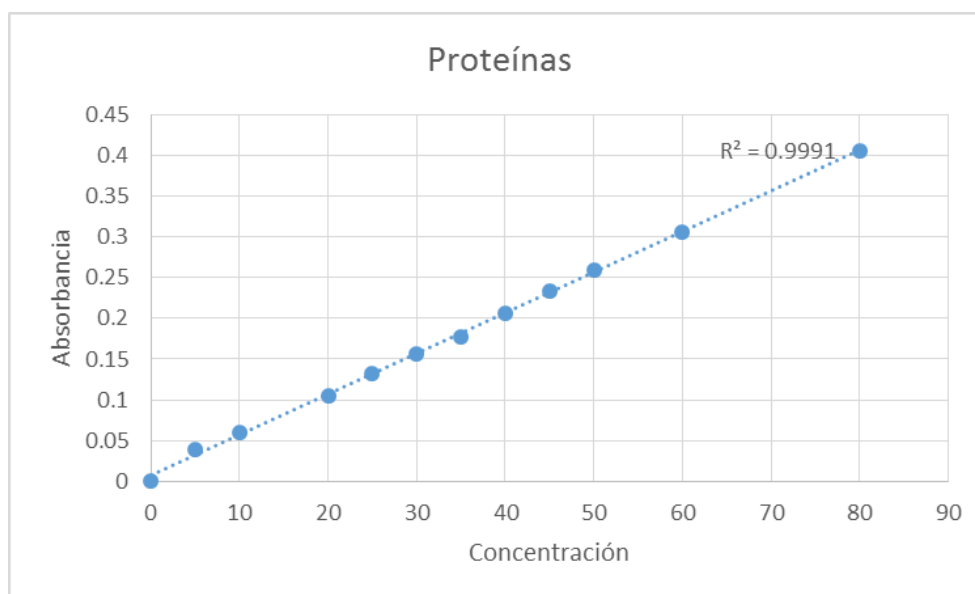
Tubo	Albúmina (μl)	Agua (μl)	Bradford (mL)
1	0	100	2.4
2	5	95	2.4
3	10	90	2.4
4	20	80	2.4
5	25	75	2.4
6	30	70	2.4
7	35	65	2.4
8	40	60	2.4
9	45	55	2.4
10	50	50	2.4
11	60	40	2.4
12	80	20	2.4

Se prepararon las soluciones previamente:

El reactivo de Bradford se preparó con 100 ml de ácido fosfórico al 85 %. Con 50 ml de alcohol etílico, 100 mg de azul de Coomassie, y esto se aforó a un litro de agua.

También se preparó albúmina sérica bovina, siendo que por cada mg de albúmina, se disolvió en 1 mL de agua.

Posteriormente, se agitaron los tubos y se leyeron en el espectrofotómetro a 595 nm, a partir de las absorbancias obtenidas se construyó una curva de calibración $y = mx + b$, en donde y corresponde a cada uno de los valores de absorbancia obtenidos en la lectura de las muestras de plasma sanguíneo, m la pendiente de la recta, b la ordenada al origen y x corresponde al valor de concentración desconocido.



Gráfica 5. Curva de calibración para la determinación de proteínas. Se muestra el coeficiente de determinación.

Determinación del grado de peroxidación lipídica

El fundamento correspondiente a esta técnica se basa en el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), en donde el ácido tiobarbitúrico (TBA) reacciona con el MDA, este último es un dialdehído de tres carbonos, altamente reactivo, generado como uno de los principales bioproductos de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados; de esta forma, el MDA que es la principal sustancia reactiva al TBA, ataca al grupo metileno activo del TBA. Un mol de MDA reacciona con dos moles de TBA en medio ácido y a alta temperatura, por lo tanto, la velocidad de la reacción depende de la concentración de TBA, el pH y la temperatura.

Se describe la técnica a continuación:

- Reactivos:
 - Tris-HCl 150 mM a pH 7.4.
 - Ácido tricloroacético (TCA).
 - Ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.375 % p/v en TCA al 15 % (se prepara en el momento la cantidad necesaria).
- Se usaron dos series de tubos de 13 x 100 mm y una serie de 8 tubos de 22 x 175 mm.
- Se pesó 0.5 g de hígado y se homogeneizó en 5 ml de agua.
- Se tomaron 300 µl de homogeneizado al 10 % y se agregaron 700 µl de tris-HCl .150 mM, pH 7.4 para completar a 1 ml.
- Se agregaron 2 ml de TBA al 0.375 %, disuelto en TCA al 15 %.
- Se pusieron en ebullición por 45 minutos.
- Se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos, se separa el sobrenadante y se leyó a 532 nm.
- Se realizó un blanco con 1 ml de Tris-HCl 150 mM, pH 7.4.

Determinación de colágena por medio de la hidroxiprolina

Este método se basa en la determinación de hidroxiprolina (HP). Este aminoácido no es esencia, sino producto de la hidroxilación de la prolina, presente en la colágena. La HP es sometida a un proceso de oxidación, dando como resultado la formación del ácido pirrol- 2 carboxílico o pirrol; de esta forma, el reactivo de Ehrlich (p-dimetilaminobenzaldehído), al reaccionar con el pirrol, forma un complejo color rojo que se lee a 560 nm.

- Se pesaron 0.1 g de hígado, previamente secado con papel filtro, y se colocaron en una ampolleta.
- Se agregaron 2 ml de HCl 6 N y se sellaron las ampolletas con un mechero. Posteriormente, se colocaron a 100 °C en el horno, durante 24 h.
- Una vez hidrolizada la muestra, se destaparon las ampolletas y se colocaron nuevamente en el horno a temperatura de 60 °C, hasta que se secaran.
- Las muestras ya secas se suspendieron con 2 ml de solución amortiguadora (sol. 1), se agitaron vigorosamente en el vórtex y se vaciaron en tubos de ensayo; las ampolletas se lavaron con la adición de 1 ml de la misma solución.
- En un tubo, conteniendo una pequeña porción de carbón activado, se depositó el sobrenadante, se agitó durante un minuto y se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos. Se repitió este paso, si el sobrenadante no quedaba claro.
- Se tomó 1 ml del sobrenadante más 1 ml de agua y 1 ml de Cloramina T (sol. 2); se dejó reposar exactamente por 20 minutos a temperatura ambiente. Se hizo un blanco, utilizando 1 ml de agua en lugar del sobrenadante.
- Transcurridos los 20 min, se adicionaron 0.5 ml de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 2 M, 1 ml de NaOH 1 N y aproximadamente 2 g de NaCl. Se agitó inmediatamente para detener la reacción.

- A cada tubo se le agregaron 6 ml de tolueno y se agitó durante 1 min. La fase de tolueno no se utilizó para la determinación de prolina, pero la fase acuosa se utilizó para la identificación de HP.
- Se extrajo la capa de tolueno y se desechó. La proporción acuosa se tapó y se colocó en un baño de agua hirviendo durante 20 minutos.
- Los tubos se enfriaron 15 minutos en un refrigerador. Ya fríos, se les adicionó 6 ml de tolueno y se agitó durante 1 minuto.
- Se prepararon 18 tubos de 15 x 150 mm, y de la fase de tolueno se tomaron alícuotas por duplicado de 1 ml, se les agregó 4 ml del reactivo de Ehrlich y se agitaron fuertemente.
- Se dejaron reposar durante 30 minutos para que se llevara a cabo la reacción colorida.
- Se leyó a una longitud de onda de 560 nm.

Para la preparación de reactivos se hizo de la siguiente manera:

Buffer de acetato de sodio-ácido cítrico pH 6

Solución amortiguadora (Relación para un litro)

- 50 g de ácido cítrico
- 120 g de acetato de sodio (3H₂O).
- 34 de hidróxido de sodio.
- 15 ml de ácido acético glacial

Solución 2. Solución de cloramina T (Relación para preparar 10 ml)

- 0.141 g de cloramina T se mezclaron con 2 ml de agua destilada, 3 ml de etilenglicol y 5 ml de solución amortiguadora. Esta solución se preparó en el momento que se usó.

Solución 3. Reactivo de Ehrlich

- Se tomaron 27.4 ml de H₂SO₄ concentrado y se agregaron lentamente a 200 ml de alcohol absoluto.

- Se pesaron 120 g de p-dimetilaminobenzaldehído y se disolvieron en alcohol absoluto.

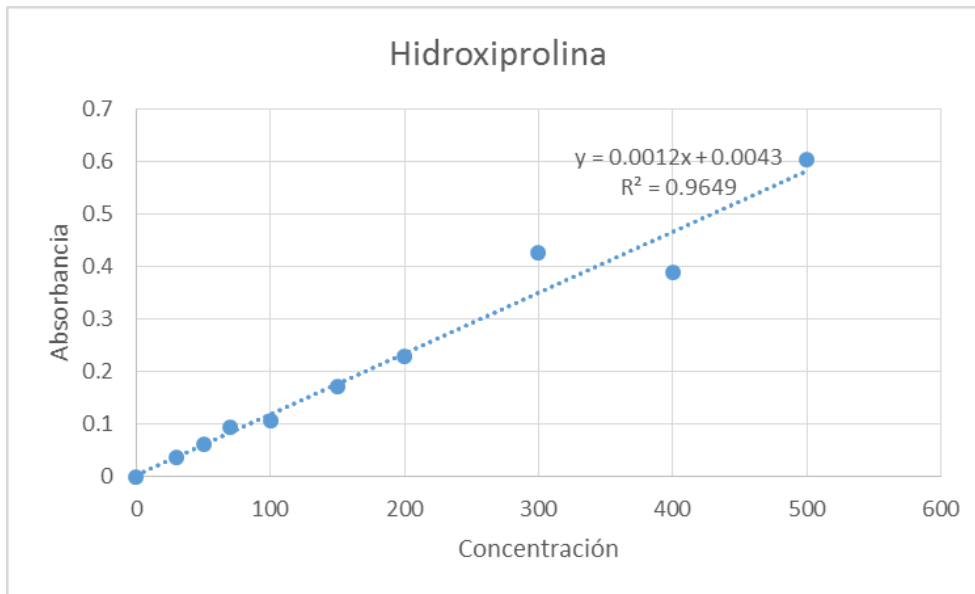
Solución 4. Solución de ninhidrina.

- Se pesaron 2.50 g de ninhidrina, se disolvieron en 60 ml de ácido acético glacial y 40 ml de ácido fosfórico 6N.

En la tabla 7 se indican los reactivos y cantidades empleadas para preparar los distintos puntos de la curva estándar de calibración. Cada punto (concentración conocida de hidroxiprolina) se realizó por duplicado.

Tabla 7. Curva de calibración de hidroxiprolina.

Tubo	HP μL	Agua ml	HP moles
1	10	1.99	10
2	30	1.97	30
3	50	1.95	50
4	70	1.93	70
5	100	1.90	100
6	150	1.85	150
7	200	1.80	200
8	300	1.70	300
9	400	1.60	400
10	500	1.50	500
B	-	2.00	-



Gráfica 6. Curva de calibración para la determinación de hidroxirolina. Se muestra la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación.

Determinación de glucógeno hepático

La reacción de color para medir la concentración de carbohidratos presentes en el hígado por espectrofotometría se basa en el uso de la antrona, un compuesto que se disuelve en ácido sulfúrico (H_2SO_4). El medio ácido hidroliza el enlace glucosídico de los oligosacáridos; así, los monosacáridos resultantes (furfural) reaccionan con la antrona, dando lugar a una coloración verde con un máximo de absorción de 612 nm. La determinación del glucógeno hepático se realiza mediante la técnica de la antrona.

Se describe la técnica a continuación:

- Se pesaron 0.5 g de hígado en ocho tubos de 15 x 150 mm con tapón esmerilado, se les adicionó 1.5 ml de KOH al 30 %, se taparon, se hirvió todo en baño de agua durante 30 minutos.
- Después de enfriar, se pasaron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 ml y se aforaron con agua, se agitaron muy bien.
- Del matraz anterior, se tomó de 40 a 160 μl con una pipeta volumétrica, se llevó a 1 ml en tubos de 13 X 100, esmerilados por duplicado; se preparó, además, un tubo blanco con 1 ml de agua y de los estándares (2) con 20 μl de una solución de glucosa estándar (1 mg/ml), y se llevaron a 1 ml con agua.
- Se preparó una solución de antrona 0.2 % en H_2SO_4 concentrado. Se añadieron 2 ml a cada tubo, agitando suavemente (con ayuda de una bureta) y se enfrió sobre hielo.
- Se taparon los tubos fríos y se pusieron en un baño de agua hirviendo por 15 minutos.
- Se enfriaron de inmediato con hielo y se leyeron a una longitud de onda de 620 nm.

Histología

Se utilizaron dos técnicas de tinción para teñir cortes de hígado. La primera fue la de H&E, donde la hematoxilina tiñó de color azul-púrpura componentes ácidos de la célula, tal como el núcleo; mientras que la eosina tiñó de color rosa componentes de la célula como el citoplasma y material extracelular.

La segunda fue la tinción de TM, la cual busca teñir a las bandas de colágena de color azul, los núcleos celulares de color negro y los citoplasmas de color rojo. Esta técnica se basa en el uso de un colorante ácido, como la escarlata de Biebrich, de esta forma, todos los elementos acidófilos de un tejido, como el citoplasma y la colágena, se unirán al colorante. Después de lo anterior, se utiliza el ácido fosfomolibdico/ácido fosfotúngstico, que permite que la escarlata de Biebrich difunda de la colágena pero no del citoplasma; lo último se debe a la menor permeabilidad por parte de la escarlata de Biebrich. Los ácidos mencionados anteriormente tienen numerosos grupos que probablemente actúan como medio de unión entre el colágeno y el azul de anilina, colorante que tiñe a la colágena. Puede ser que el pH de los ácidos fosfomolibdico/fosfotúngstico también aumente la coloración y ayude a la colágena en la difusión o retiro de las demás tinciones.

- Los cortes de hígado se depositaron en viales que contenían una solución fijadora de formaldehído (formol) al 10 % en agua. El tiempo mínimo de fijación fue de 24 horas.
- Los cortes se lavaron con agua corriente, se deshidrataron en alcoholes y se incluyeron en parafina.
- Se hicieron cortes de 6-7 μm de grosor y se colocaron en portaobjetos cubiertos con xilano.
- Los cortes se desparafinaron y rehidrataron en xileno, alcohol absoluto y alcohol al 95 %.
- Se enjuagaron con agua destilada.

Tinción de hematoxilina y eosina

- Se aplicó la hematoxilina de Harris durante 15 min y se enjuagó con agua corriente por 2 min.
- Se diferenció en alcohol ácido con 3-10 inmersiones y se verificó la diferenciación en el microscopio.
- Se lavaron con agua corriente.
- Se sumergió en agua amoniaca o saturada con carbonato de litio hasta que las secciones fueron de color azul brillante.
- Se lavó en agua corriente por 10-20 minutos.
- Se tiñó con eosina de 15 segundos a 20 minutos, dependiendo de la caducidad de la eosina y del grado del contraste deseado.
- Se lavó en alcohol al 95 % y después con alcohol absoluto y xileno.
- Se montó con el polímero permount o bálsamo.

Tinción tricrómica de Masson

- Se sumergió en fijador de Bouin 1 hora a 56 °C.
- Se enfrió y se lavó con agua corriente hasta que el color amarillo desapareció.
- Se enjuagaron con agua destilada.
- Se sumergió en la solución de hematoxilina de Weigert por 10 minutos. Se enjuagó con agua corriente al mismo tiempo.
- Se enjuagó con agua destilada.
- Se sumergieron en la solución de fucsina ácido-escarlata de Biebrich por 15 minutos. Se recuperó la solución.
- Se enjuagó con agua destilada.
- Se sumergió en la solución de ácido fosfomolibdico/pacido fosfotúngstico por 10-15 minutos. Se desechó la solución.
- Se sumergió en la solución de azul de anilina por 5-10 minutos. Se recuperó la solución.
- Se enjuagó con agua destilada.

- Se lavó con agua destilada.
- Se lavó con agua acética al 1% por 3-5 minutos. Se desechó la solución.
- Se lavó con alcohol al 95 %.
- Se lavó con alcohol absoluto (dos cambios de alcohol).
- Se lavó con xileno (dos cambios de xileno).
- Se montó el polímero permount o bálsamo.

Inmunohistoquímica

Es un procedimiento que tiene como objetivo hacer visible un antígeno específico, ya sea a nivel tisular o celular. Se basa en la interacción de un anticuerpo que se une específicamente a una proteína de interés.

- Los cortes de hígado se trataron de la misma manera que para las tinciones de H&E y TM.
- Las muestras se deshidrataron usando xileno por 5 minutos, tres veces, y etanol al 99.5 % por 3 minutos, cuatro veces. Después, las muestras se lavaron con agua corriente y se sumergieron en PBS por 5 minutos.
- Las muestras se metieron al autoclave, sumergidas en una solución 0.01 M de buffer de citrato a 121 °C por 20 minutos. Después, se lavó con PBS por cinco minutos, tres veces.
- La peroxidasa endógena se bloqueó con una mezcla de metanol-peróxido por una hora (46 ml de MeOH + 4 ml de H₂O₂), seguido de un lavado con PBS por 5 minutos, cinco veces.
- Por otro lado, para bloquear uniones no específicas, las muestras se embebieron en leche sin grasa al 5 % en PBS, por una hora, a temperatura ambiente.
- Subsecuentemente, las muestras se incubaron con anticuerpo primario diluido en SFB al 3 % toda la noche. Pasado este tiempo, se lavaron con PBS por cinco minutos, cinco veces.
- Seguido a esto, las muestras se incubaron en el anticuerpo secundario apropiado diluido en SBF al 3 %, por dos horas, a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, las muestras se lavaron con PBS por 5 minutos, cinco veces.
- Después, se incubaron con una solución de DAB-H₂O₂ en una relación 1:10 por 30 minutos. Posteriormente, las muestras se lavaron con PBS cinco veces, por 5 min.
- Pasado ese tiempo, las muestras se contracoloraron con hematoxilina para ser lavadas con agua corriente y PBS dos veces por 5 minutos.

- Finalmente, las muestras se rehidrataron con etanol al 85 %, tres veces, por 2 minutos, después, con etanol al 100 % dos veces por minuto, con xileno tres veces por 1 minuto, seguido de su montaje en resina.

Ensayo de zimografía

La zimografía permite observar la actividad de las enzimas sobre un gel, el cual puede ser de poliacrilamida o de gelatina, utilizando condiciones menos desnaturizantes para que la enzima no pierda su actividad lítica.

Se describe la técnica a continuación:

- 0.25 g de muestra de hígado se homogeneizaron con 1.7 ml de PBS en hielo con un homogeneizador, después se sonicaron y se centrifugaron a 13000 g por 10 minutos.
- El sobrenadante se recolectó y las proteínas se cuantificaron por el método de BCA.
- Volúmenes equivalentes a 50 µg de proteínas sin someter a ebullición se mezclaron con buffer de muestra (2.5 % de SDS, 1 % de sacarosa y 4 mg/ml de rojo de fenol), sin un agente reductor.
- Las muestras se sometieron a electroforesis a 90 V por 2 horas y media, en un gel al 8 % de acrilamida co-polimerizada con gelatina porcina (1 mg/ml).
- Después de la electroforesis, los geles se lavaron dos veces 2.5 % Tritón X-100 para remover el SDS. Posteriormente, se incubó en buffer de Tris-HCl (50 mM-pH 7.4) y 5 mM de CaCl₂ a 37 °C por 48 horas.
- Los geles se fijaron y tiñeron con azul brillante de Coomassie 0.25 % en ácido acético y 30 % de etanol.
- La actividad proteolítica se detectó como bandas claras que contrarrestan con un fondo azul de sustrato sin digerir en el gel.

Western blot

- Se pesaron 50 mg de hígado y se homogeneizó con 500 μ l de solución amortiguadora de lisis (Tris-HCl 1M pH 8.0, NaCl 5 M, NP4O, Tritón, EDTA 0.5 M pH 8.0, PMSF 0.1 M) que tenía inhibidor de proteasas y de fosfatasas en una relación 1:100.
- Las muestras se sonicaron 3 veces por 15 segundos, con descansos de 15 segundos y una amplitud del 60 %.
- Se centrifugó a 12 000 rpm por 2 minutos y el sobrenadante se guardó a 20 °C
- Se cuantificaron las proteínas del sobrenadante por el método del ácido bicinconínico con el kit Pierce BCA Protein Assay Prod #23223 Thermo Scientific.
- Volúmenes equivalentes a 50 y 250 μ g de proteína fueron cargados en geles de acrilamida de 15, 12 y 10 %.
- Se corrió una electroforesis a 100 V por 3 horas.
- Se transfirieron las proteínas a una membrana de PDVF por transferencia húmeda y fue corrida a 0.25 A por 1 hora y 40 minutos.
- La membrana con las proteínas transferidas se bloqueó con leche descremada al 0.7 % por 2 horas, a temperatura ambiente. La leche se diluyó en TBS 1X-Twen-20.
- Las membranas fueron incubadas con el respectivo anticuerpo primario que indica la Tabla 8 por toda la noche a 4 °C.

Tabla 8. Lista de anticuerpos utilizados para los ensayos de Western blot e inmunohistoquímica.

Proteína	Compañía	Número de catálogo	Dilución
β-actina	Ambion	AM4302	1:500
TGF- β	Abcam	Ab92486	1:500
α-SMA	Sigma	A5691	1:500
IL-1β	Millipore	Ab-61224	1:500
4-HNE	Abcam	Ab-46545	1:500
NF-κB (p-65)	Millipore	MAB3026	1:500
TNF-α	Santa Cruz	SC-52746	1:500
Nrf2	Abcam	Ab31163	1:500

Se lavaron las membranas con TBS 1X-Tween.-20 y luego se expusieron al correspondiente anticuerpo secundario por 2 horas a temperatura ambiente.

- Las membranas se lavaron con TBS 1X-Tween 20 en tres ocasiones: el primero fue de 5 minutos, el segundo de 10 minutos y el tercero de 15 minutos.
- Después se revelaron con el kit inmuno cruz western blotting luminol reagent-
- Las placas fueron tratadas con el revelador y fijador, posteriormente se escanearon y se realizó un análisis densitométrico con el programa image J. Se utilizó β -actina como control de carga.

Análisis estadístico

Todas las determinaciones de la presente tesis se realizaron por duplicado. Se obtuvo la media, así como el error estándar para cada uno de los diferentes indicadores medidos en los grupos de tratamiento.

Para cada uno de los indicadores se aplicó un análisis de varianza de una sola variable (ANOVA de una vía), seguido de una prueba de Tukey para realizar una comparación entre la media de cada grupo. Finalmente, se consideró que se presentaba una diferencia significativa cuando $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

Efecto de la cafeína sobre el parénquima hepático

Para determinar los efectos inducidos por la administración crónica de la TAA, se tomaron imágenes macro y microscópicas de los grupos de tratamiento (Figura 15). El hígado del grupo control aparentemente se observa como un hígado normal (Figura 15A), de color café rojizo y brillante. En el hígado del grupo de TAA 3 semanas (Figura 15D), hay un ligero cambio de color, pues disminuyó el brillo y cambió de textura, si se compara con el control. Cuando la administración de TAA se prolongó durante seis semanas (Figura 15G), se observó un mayor grado de daño, debido al cambio de coloración a pálido, con fibrosis macronodular, y al corte era friable. De manera notable, los hígados de las ratas tratadas con TAA y cafeína (Figura 15J) mostraron menos cambios que los que únicamente recibieron TAA por seis semanas. El tratamiento con cafeína por sí sola no produjo ningún cambio (Figura 15M).

Por otra parte, el parénquima hepático en el grupo control (Figura 15B) aparentemente es de un hígado normal, con los cordones de hepatocitos bien ordenados. El parénquima hepático del grupo de TAA 3 semanas (Figura 15E) se observa un poco desordenado, con infiltrado inflamatorio y necrosis. Cuando el daño se prolongó a seis semanas con TAA (Figura 15H), se observó un mayor grado de daño, ya que hubo más infiltrado inflamatorio, mayor necrosis y se observaron nódulos de regeneración; pero al administrar cafeína a partir de la cuarta semana, se observó un menor grado de daño (Figura 15K), comparado con el grupo de TAA 6 semanas. Cuando sólo se administró cafeína (Figura 15N), aparentemente no hubo ninguna modificación en el parénquima.

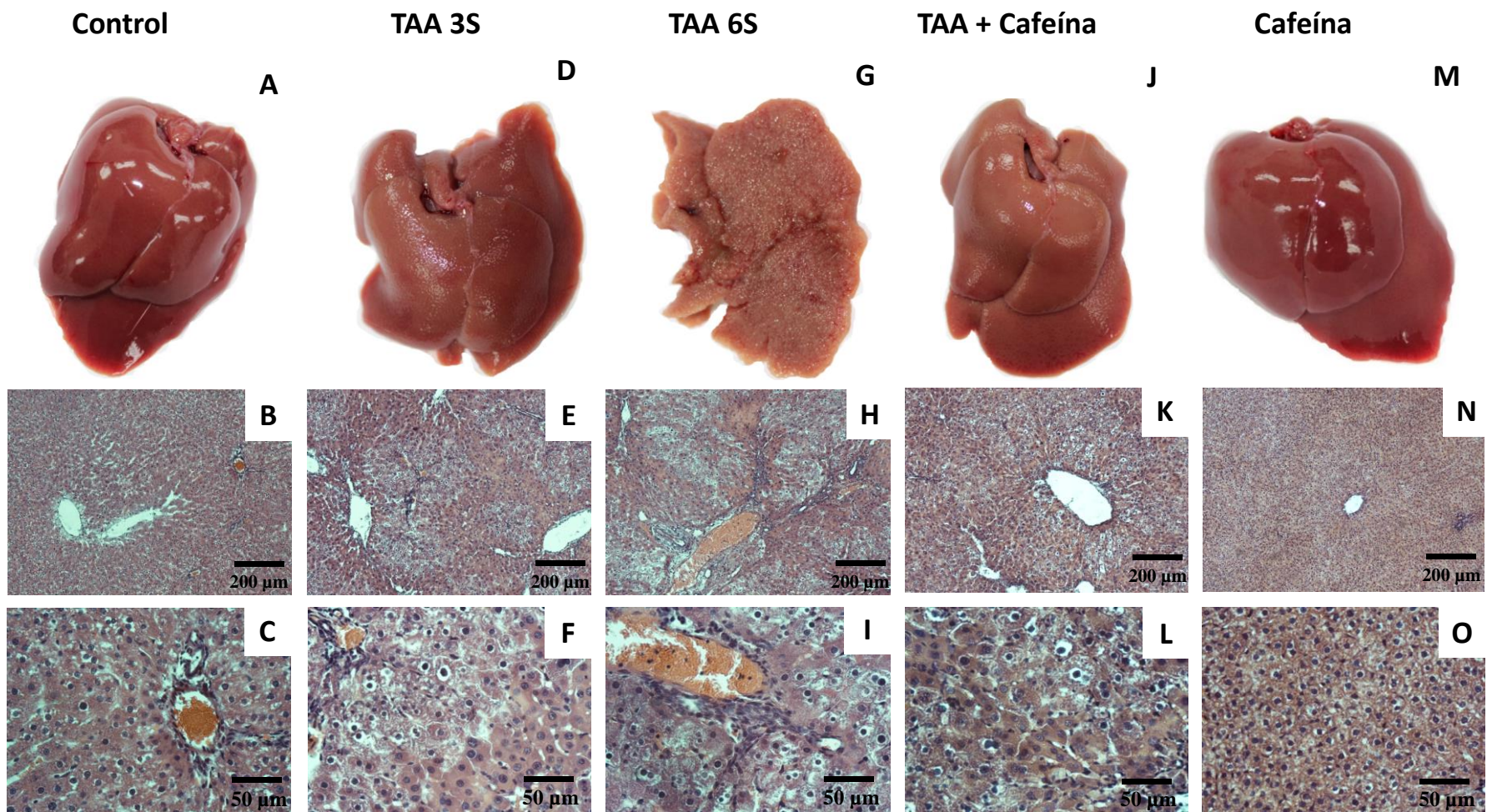


Figura 15. Fotos de los hígados representativos de cada grupo. Control (A); ratas tratadas con TAA por tres semanas (D); ratas tratadas con TAA por seis semanas (G); ratas tratadas con TAA durante seis semanas y a partir de la cuarta semana con cafeína (J); ratas tratadas con cafeína sola (M). Fotos de histologías con tinción de HE. Control (B, C); ratas tratadas con TAA por tres semanas (E, F); ratas tratadas con TAA por seis semanas (H, I); ratas tratadas con TAA durante seis semanas y a partir de la cuarta semana con cafeína (K, L); ratas administradas con cafeína sola (N, O).

Efecto de la cafeína sobre los marcadores de daño hepático

En la relación hígado/peso corporal (Figura 16A), se observa que cuando se administra TAA durante tres semanas, hay una tendencia al aumento, aunque no hay una diferencia significativa comparada con el control. La relación aumenta de manera significativa cuando se administra TAA durante seis semanas, y cuando se administra cafeína se evita el aumento de esta relación.

En la actividad de las enzimas ALT (Figura 16B), FA (Figura 16C) y γ -GTP (Figura 16D) en suero, se observó un aumento significativo cuando se administró TAA durante 6 semanas, comparado con el control; pero cuando se administró cafeína, se evitó que estos marcadores de daño hepático aumentaran.

Por último, se determinó el glucógeno hepático (Figura 16E) y se observó que con la administración de TAA por tres semanas disminuyeron los niveles de este carbohidrato de manera significativa, comparados con el grupo control; también con la administración de TAA durante seis semanas los niveles de glucógeno disminuyeron a un mayor grado de manera significativa, respecto al grupo control y al grupo de TAA de tres semanas. No obstante, cuando se administró cafeína además de TAA, se evitó que los niveles de polisacárido disminuyeran. La administración de cafeína sola no modificó ninguno de los parámetros anteriormente descritos.

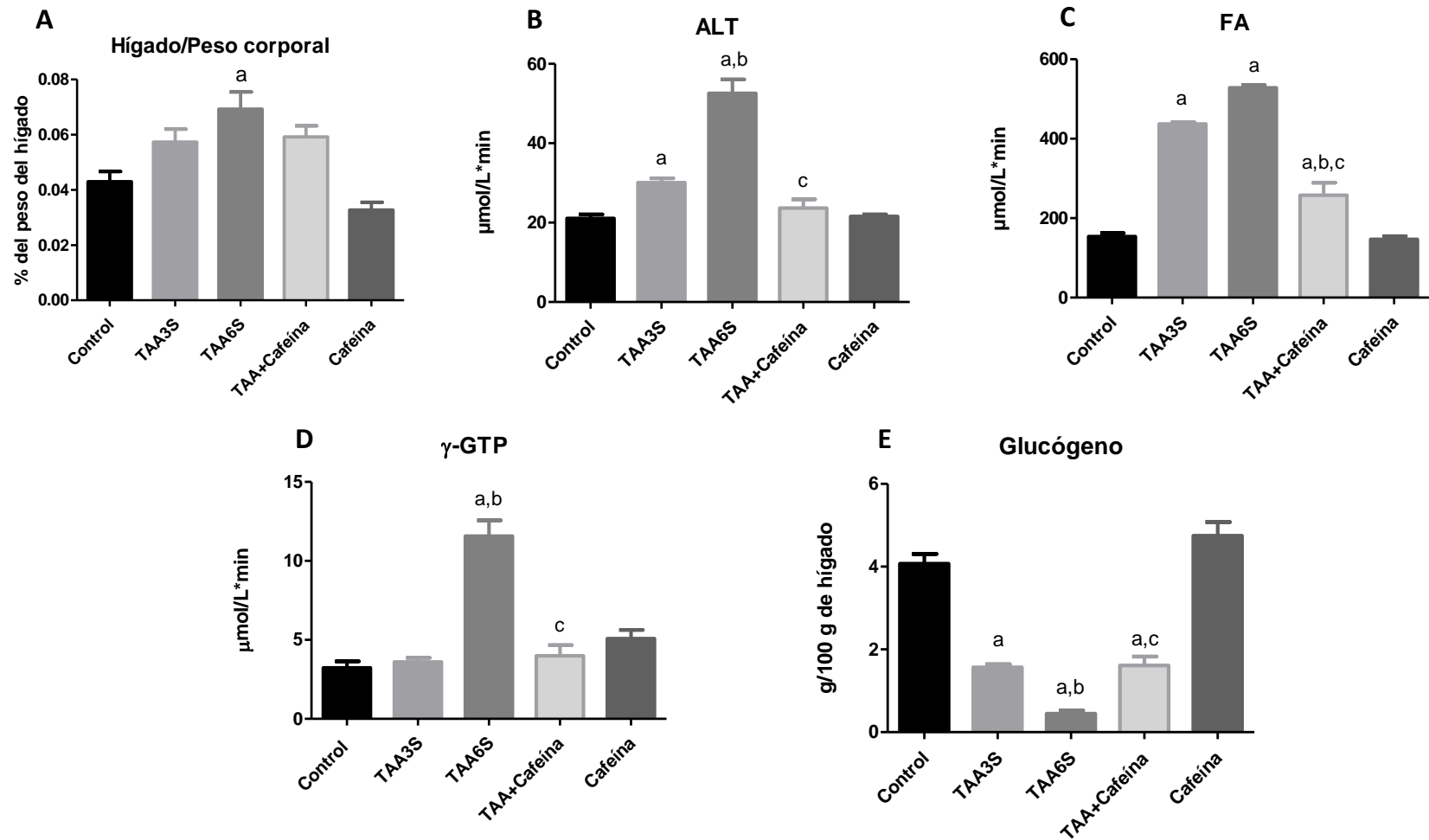


Figura 16. Marcadores de daño hepático. Relación hígado/peso corporal (A), actividad de la enzima ALT (B), actividad de la enzima FA (C), actividad de la enzima γ -GTP (D), determinadas en suero de rata y la cantidad de glucógeno (E), determinado en tejido hepático de las ratas control, ratas administradas con la TAA durante tres semanas, TAA seis semanas, TAA más cafeína y cafeína sola. Los datos indican el promedio \pm SEM: *a* significativamente diferente al control, $p < 0.05$; *b* significativamente diferente a TAA 3S, $p < 0.05$; *c* significativamente diferente a TAA 6S, $p < 0.05$.

Efecto antioxidante de la cafeína

En los marcadores de estrés oxidante a nivel de membrana, la LPO (Figura 17A) y el 4-HNE (Figura 17B) se observa que aumentan de manera significativa en el daño con TAA de seis semanas, comparándolos con el control, pero al administrar la cafeína, se evita que aumenten los niveles de estos. En el caso del GSH (Figura 17C), el cual es un antioxidante endógeno a nivel citoplasmático y el Nrf2, estos niveles disminuyen cuando se administró el hepatotóxico, pero al administrar cafeína se evitó que estos niveles disminuyan. La cafeína por sí sola no modificó ningún parámetro.

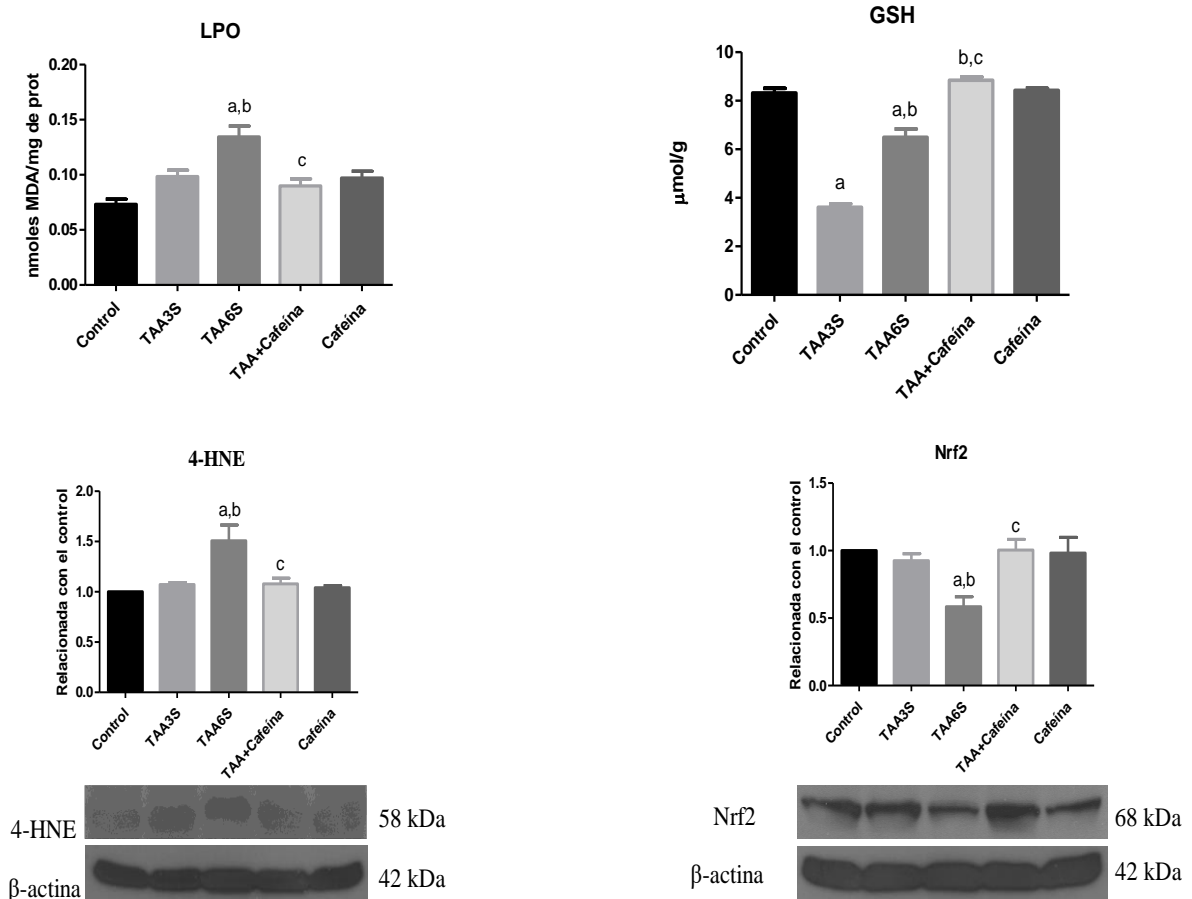


Figura 17. Marcadores de estrés oxidante. Grado de peroxidación lipídica (A); niveles de 4-HNE (B); determinado por WB, glutatión reducido (C); y los niveles de nrf2 (D); determinado por WB, los valores se expresan como el valor relativo normalizado con el grupo control (control=1) determinados de los hígados de las ratas control, ratas administradas con TAA durante tres semanas, TAA seis semanas, TAA más cafeína y cafeína sola. Los datos indican el promedio \pm SEM: *a* significativamente diferente al control, $p < 0.05$; *b* significativamente diferente a TAA 3S, $p < 0.05$; *c* significativamente diferente a TAA 6S, $p < 0.05$.

Efecto antiinflamatorio de la cafeína

Las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β (Figura 18H) y TNF- α (Figura 18I) aumentaron al haber un daño con TAA durante 3 semanas, pero siendo significativo hasta las 6 semanas respecto al grupo control, aunque cuando se administró cafeína a partir de la cuarta semana, no se aumentaron los niveles de estas citocinas. Enseguida se observa la activación del NF- κ B (p65) con la administración de TAA durante tres semanas (Figura 18B, 18F), la cual incrementó significativamente al compararlo con el grupo control (Figura 18A, 18F), la administración de seis semanas con TAA (Figura 18C, 18F) indujo un mayor grado la activación del NF- κ B, mientras que la administración de cafeína aminoró significativamente la elevación del NF- κ B (Figura 18D, 18F) al compararlo con el grupo tratado con TAA por seis semanas. El resultado anterior fue confirmado por western blot (Figura 18G), en donde se observa que la TAA incrementó los niveles de p65, mientras que la administración de cafeína evitó que se diera el aumento. El tratamiento únicamente con cafeína (Figura 18E) no produjo ningún efecto sobre ninguna proteína pro-inflamatoria.

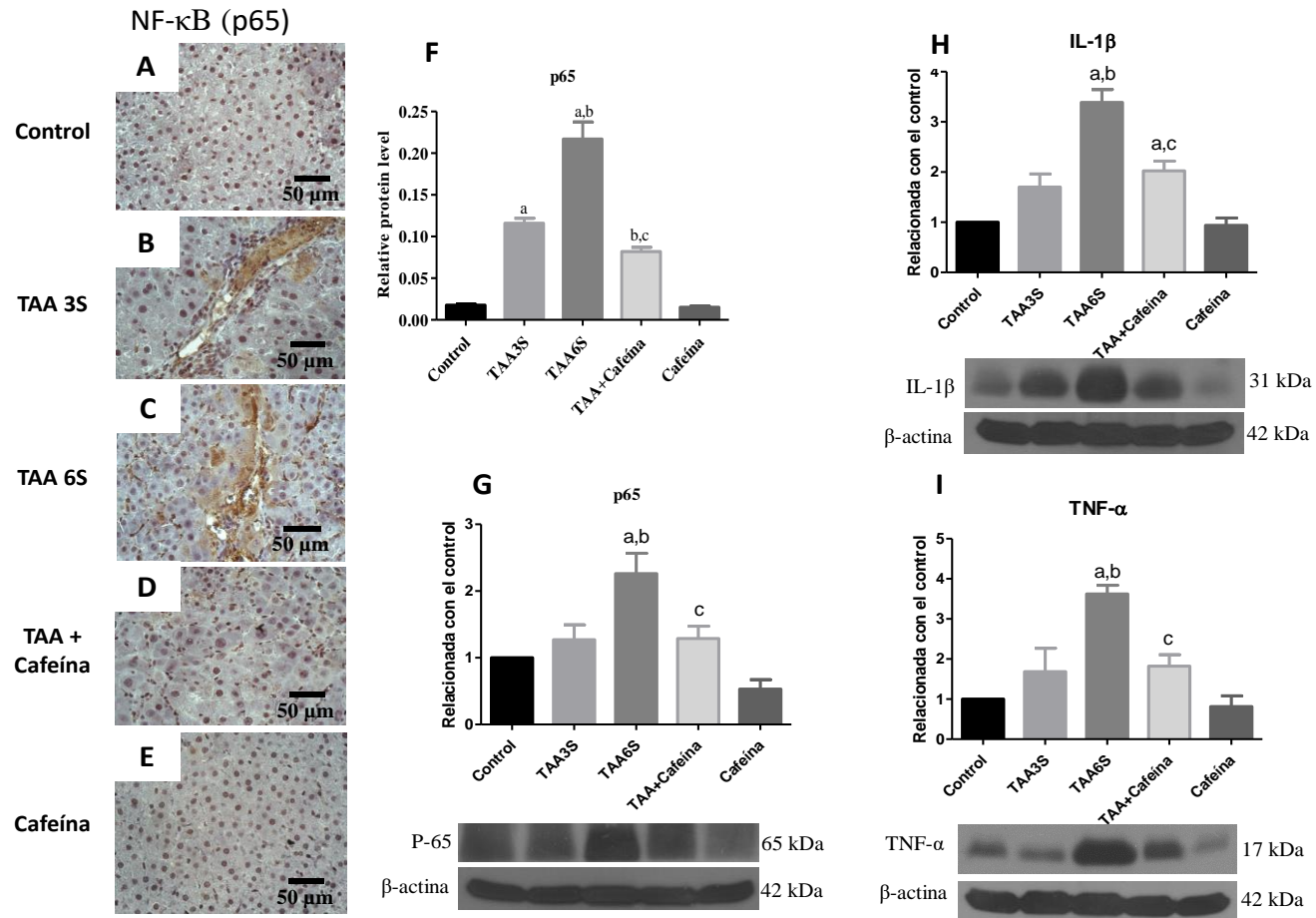


Figura 18. Efecto antiinflamatorio de la cafeína. Los paneles muestran imágenes representativas de cada grupo de inmunohistoquímica de NF-κB (A-E) del grupo control (A); grupo de TAA tres semanas (B); grupo de TAA 6 semanas (C); TAA+ cafeína (D); y cafeína sola (E). El histograma (F) representa el porcentaje de positividad de NF-κB (p65) a partir de cortes de inmunohistoquímica. Los niveles de NF-κB (p65) (G), IL-1β (H) y TNF-α (I) en muestras de tejido hepático determinadas por Western blot; los valores se expresan como el valor relativo normalizado con el grupo control (control=1), determinados en los diferentes grupos. Los datos indican el promedio ±SEM a significativamente diferente al control, $p < 0.05$; *b* significativamente diferente a TAA 3S, $p < 0.05$; *c* significativamente diferente a TAA 6S, $p < 0.05$.

Efecto antifibrótico de la cafeína

Efecto de la cafeína sobre la deposición de colágena en el parénquima hepático

La administración crónica de la TAA durante tres semanas (Figura 19B, 19F) incrementó la cantidad de colágena en el parénquima hepático de manera significativa, respecto al grupo control (Figura 19A, 19F), determinado por la tinción tricrómica de Masson y al hacer un análisis densitométrico de tres campos. Cuando se prolongó la administración de TAA a seis semanas (Figura 19C, 19F), de igual manera hubo un aumento significativo comparado con el grupo control, sin embargo, la administración de cafeína a partir de la cuarta semana (Figura 19D, 19F) evitó que aumentaran las fibras de colágena presentes en el parénquima hepático. Los resultados mostrados del contenido total de colágena (Figura 19F) confirman los resultados histopatológicos. Se observó que la cafeína no modificó ninguno de los parámetros mostrados.

Efecto antifibrótico de la cafeína a nivel molecular

La administración con TAA durante tres (Figura 20B) y seis semanas (Figura 20C) incrementó el área positiva a TGF- β detectada por inmunohistoquímica, comparada con el grupo control (Figura 20A), mientras que cuando se administró cafeína a partir de la cuarta semana (Figura 20D), se evitó que aumentara la expresión de esta proteína. Se muestra el área positiva de tres muestras determinadas por densitometría (Figura 20K). Además, se demuestra que la TAA aumentó los niveles de proteína determinados por Western blot (Figura 20F) respecto al grupo control, mientras que la administración de cafeína a partir de la cuarta semana evitó que aumentaran estos niveles. La cafeína por sí sola no modificó este parámetro.

En la inmunohistoquímica para la α -SMA, se indica que la expresión de esta proteína es significativamente mayor en los grupos tratados con TAA durante tres (Figura 20G) y seis semanas (Figura 20H), esto cuando se compara con el grupo control (Figura 20F). Sin embargo, el tratamiento con la cafeína (Figura 20I) evitó el aumento de estos niveles, al compararlos con el grupo de TAA con seis

semanas. Se muestra el área positiva obtenida de tres muestras (Figura 20L). Los resultados anteriores fueron corroborados a través de western blot (Figura 20N); la TAA incrementó los niveles de α -SMA al compararlos con el grupo control, mientras que la administración a partir de la cuarta semana de cafeína no aumentó los niveles de esta proteína, a pesar de que la TAA se administró durante seis semanas. Cuando se administró cafeína sola, no se modificó esta proteína.

Se muestra que la administración con TAA durante tres y seis semanas incrementó la actividad de las MMP-9 (Figura 20O) y MMP-2 (Figura 20P), siendo sólo a las 6 semanas de manera significativa, respecto al grupo control, pero cuando se administró cafeína, se evitó que aumentara la actividad de estas MMPs. La administración de cafeína sola no modificó la actividad de estas metaloproteinasas.

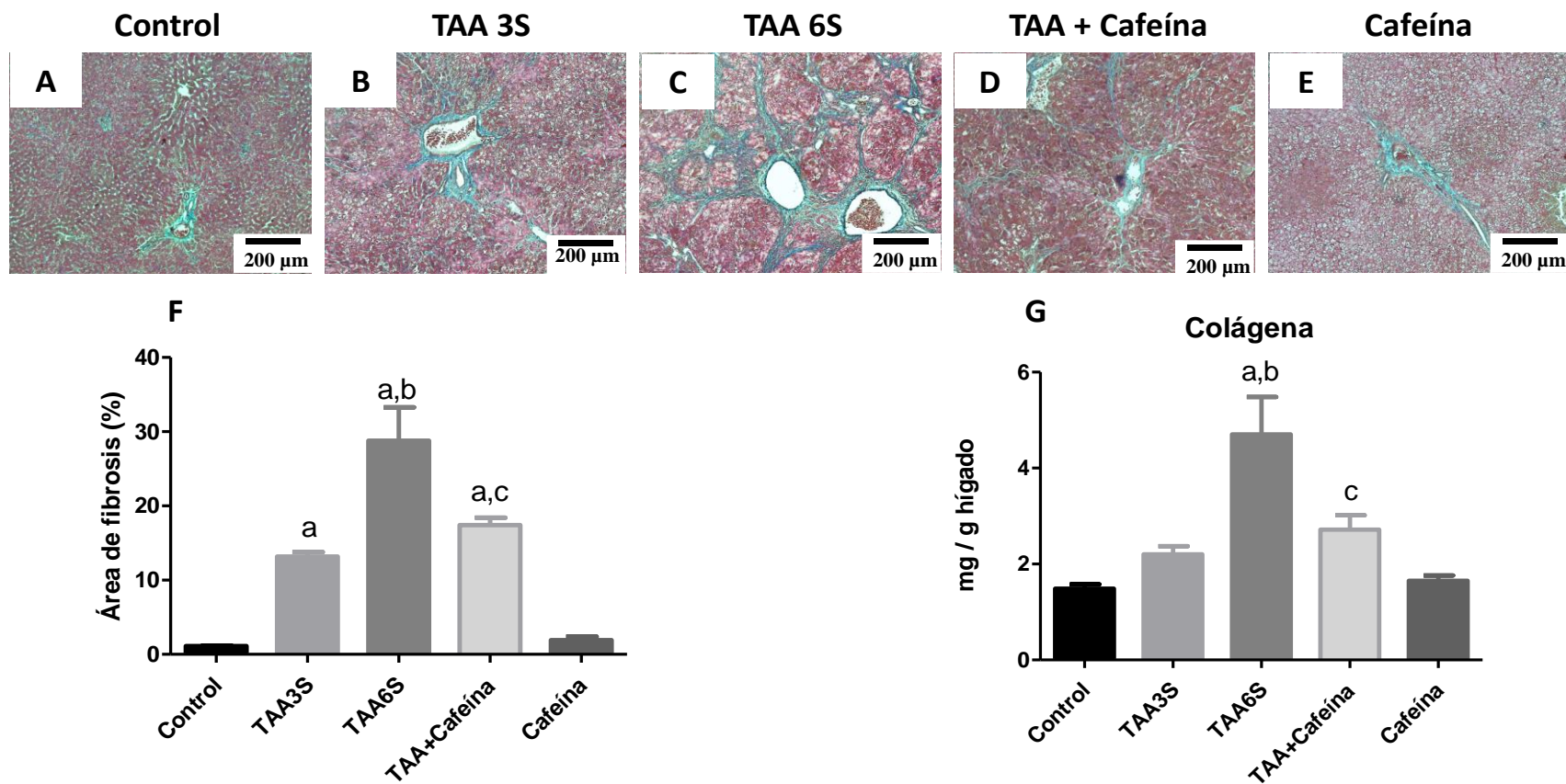


Figura 19. Efecto de la cafeína sobre la deposición de colágena en el parénquima hepático. Tinción tricrómica de Masson de hígados de ratas control (A); ratas tratadas con TAA durante tres semanas(B); ratas tratadas con TAA durante seis semanas (C); ratas tratadas con TAA + cafeína a partir de la cuarta semana (D); ratas tratadas con cafeína sola (E). Se muestra el histograma del porcentaje del área positiva a colágena obtenida de las tinciones tricrómica de Masson (F). Se muestra el contenido de hidroxiprolina de muestras de hígado. Los datos indican el promedio \pm SEM: a significativamente diferente al control, $p < 0.05$; b significativamente diferente a TAA 3S, $p < 0.05$; c significativamente diferente a TAA 6S, $p < 0.05$

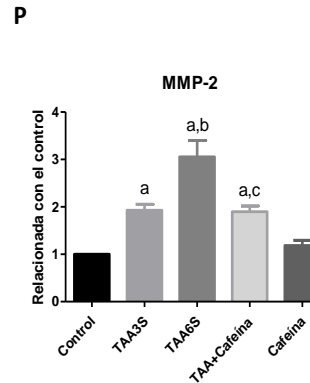
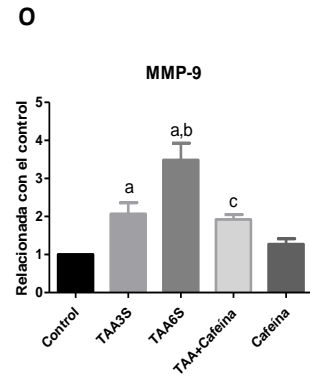
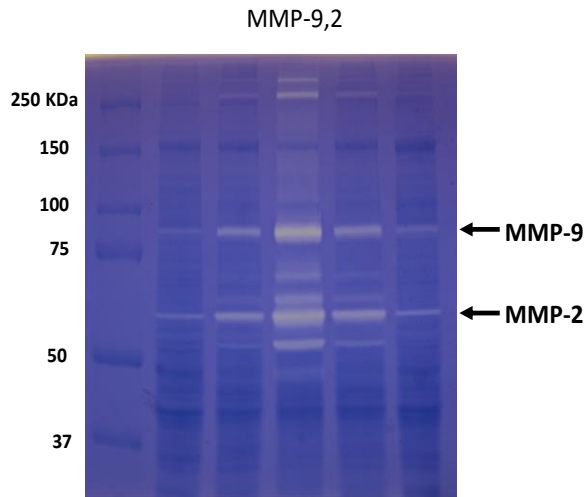
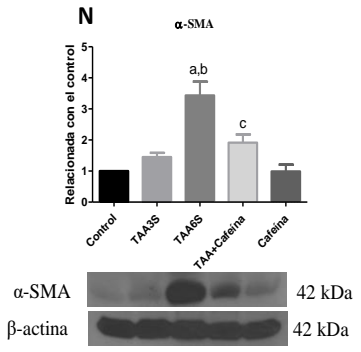
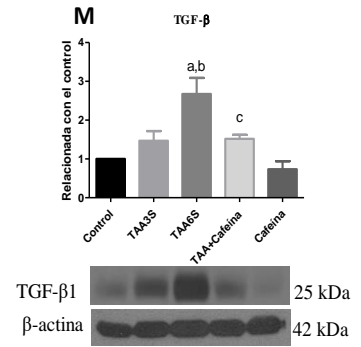
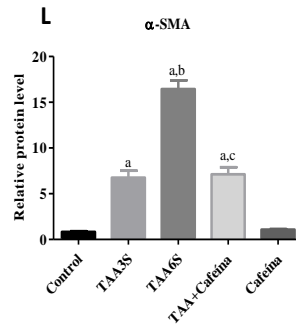
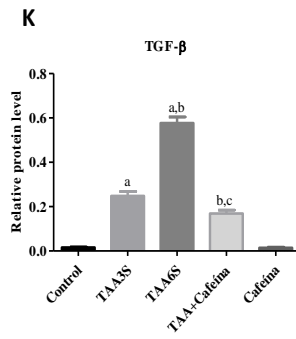
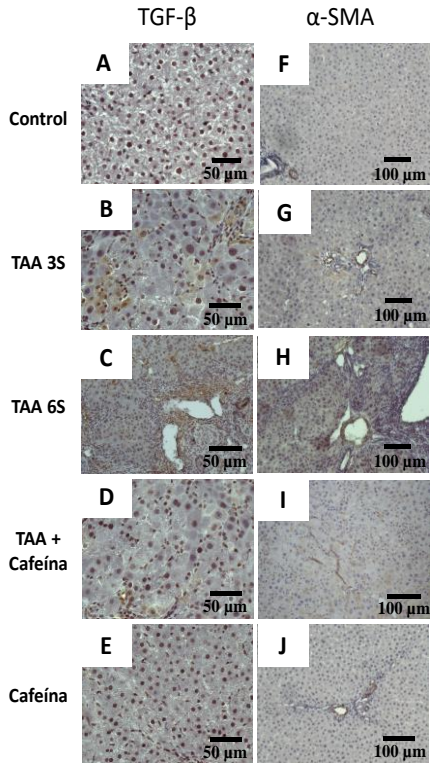


Figura 20. Efecto antifibrótico de la cafeína a nivel molecular. Inmunohistoquímica representativa para α -SMA y TGF- β 1 obtenidas de hígados de ratas control (A, F); ratas tratadas con TAA durante tres semanas (B, G); ratas tratadas con TAA durante 6 seis semanas (C, H); ratas tratadas con TAA + cafeína (D, I); y ratas tratadas con cafeína sola (E, J). Los histogramas mostrando el porcentaje de área positiva para α -SMA y TGF- β 1 obtenidas de las inmunohistoquímica (K, L), respectivamente. Los niveles proteicos de α -SMA y TGF- β 1 se midieron por WB en muestras de hígado (M, N), respectivamente. La β - actina fue utilizada como control. Los valores son expresados como el incremento en la densidad óptica normalizada al grupo control (n=1). La actividad de las MMP-9 y MMP-2 se midió a través de zimografía, usando geles con gelatina como sustrato para el control, TAA 3S, TAA 6S, TAA + cafeína y cafeína sola. Se muestran los histogramas demostrando la intensidad de señal por análisis densitométrico para la MMP-9 (O) y MMP-2 (P). Los datos indican el promedio \pm SEM: *a* significativamente diferente al control, $p < 0.05$; *b* significativamente diferente a TAA 3S, $p < 0.05$; *c* significativamente diferente a TAA 6S, $p < 0.05$.

DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue la evaluación del efecto protector de la cafeína, la sustancia psicoactiva más popular en el mundo, en el desarrollo de la cirrosis experimental. Los modelos de daño hepático nos han ayudado a poder estudiar las enfermedades hepáticas, debido a su alta reproducibilidad, facilidad de uso y reflejo apropiado de los mecanismos implicados en la fibrosis hepática humana. Uno de los modelos de daño hepático que se encuentra bien establecido es el de la TAA, al ser metabolizada en el hígado, permitiendo procesos de oxidación e induciendo estrés oxidante en las células hepáticas que posteriormente provoca necrosis y finalmente ocasiona el desarrollo de la fibrosis hepática, similar a la observada en el humano.²⁵⁻²⁷

La TAA incrementó los marcadores de daño hepático estudiados. La relación hígado/peso corporal puede dar un indicio de un problema hepático.³⁹ Se midieron los marcadores séricos de daño hepático: en el caso de la ALT, cuando hay aumento de este marcador en el suero, es indicador de necrosis.⁴⁰ El aumento de FA y γ -GTP en el suero denotan colestasis,^{41,42} en ambos casos, la cafeína logró evitar el aumento de estos marcadores y, por lo tanto, no permitir un daño hepático, manteniendo la integridad de la membrana plasmática como se ha reportado anteriormente.^{43,44} Además, se evitó la depleción del glucógeno con la administración de cafeína, como lo reportó Arauz *et al.*³⁸ en un análisis previo, aunque no se había observado esto con un daño establecido, ya que, a pesar de que se administró TAA durante 6 semanas, pareciera ser que la cafeína detiene el daño a partir de que se administra, pues el daño se parece al grupo de 3 semanas. Los hallazgos coinciden con la evidencia histopatológica de los hígados. Los resultados microscópicos en el grupo de TAA mostraron diferentes lesiones, incluyendo necrosis, inflamación; también se empezaron a formar nódulos de regeneración, mientras que con la administración de cafeína el daño fue menor; en seguida, se ahondará en los posibles mecanismos por los cuales actúa la cafeína.

El mecanismo de acción por el cual actúa la TAA es por la formación de radicales libres.²⁵ Al medir los productos finales de la LPO y 4-HNE, como se esperaba, aumentaron, pero cuando se administró cafeína, hizo que no aumentaran a niveles tales del grupo de TAA6S, lo que podría ser debido a que la cafeína tiene propiedades antioxidantes *per se*, ya que tiene afinidad por radicales libres y neutraliza esas moléculas al donar electrones, y así reducir su reactividad.^{18,45} Por otro lado, se evitó la disminución de los niveles de Nrf2 cuando se administró cafeína; éste es un importante mecanismo de defensa celular que previene el daño por especies reactivas de oxígeno, a través de la inducción de enzimas antioxidantes y otras moléculas protectoras,⁴²⁻⁴⁴ lo cual nos ayuda a comprender por qué los niveles de GSH con la administración de cafeína no se depletaron. Nuestros resultados concuerdan con lo anteriormente reportado por Gordillo-Bastidas⁴⁹ en una administración concomitante al daño hepático, aunque no se había reportado anteriormente el efecto de la cafeína con un daño ya establecido durante tres semanas previas.

El hígado se encuentra enriquecido de diferentes subconjuntos de células del sistema inmunológico innato⁵⁰, las cuales son responsables del reconocimiento de estructuras microbiales altamente conservadas, llamadas patrones moleculares, asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Este reconocimiento se realiza a través de receptores tipo toll (TLRs).⁵¹ Posteriormente, cuando existe un daño hepático crónico de cualquier etiología, se desencadenan respuestas inflamatorias y de remodelación del tejido, que a la larga promueven el desarrollo de fibrosis, durante la cual el sistema inmunológico se activa, así como los mediadores inflamatorios, incluyendo citocinas,⁵⁰ de las cuales se determinaron dos, la IL-1 β y el TNF- α , y se observó que el daño crónico con TAA provocó el aumento de estos marcadores. De igual manera, se observó que aumentaron los niveles de NF- κ B, el cual se sabe que se activa mediante las vías de señalización de los TLRs,⁴⁸⁻⁵⁰ pero al administrar cafeína, interesantemente se bloquea esta activación y posterior bloqueo de la producción de citocinas pro-inflamatorias, que son reguladas por este factor, esto correlaciona con las histologías con H&E, debido a

que cuando se administra cafeína, se observa menor infiltrado inflamatorio, lo que sugiere que la cafeína puede ejercer un efecto inmunomodulador sobre la fibrosis hepática.

La fibrosis hepática resulta del daño crónico al hígado, en conjunto con la acumulación de proteínas de ECM, la cual es una de las características de la mayoría de las enfermedades crónicas hepáticas.^{20,21} Con la administración crónica de la TAA, como era de esperarse, se observó la acumulación de colágena, pero con la cafeína se evitó esta acumulación. La inflamación crónica hepática se encuentra estrechamente relacionada a la fibrosis en prácticamente todos los individuos con enfermedad hepática, donde se ha reportado que TLR4 promueve la activación de HSCs y la fibrogénesis en el hígado, al igual que la modulación dependiente de TLR4 de la señalización de TGF- β proporciona un vínculo entre esta señal pro-inflamatoria y profibrogénica, además de que se estimula el reclutamiento de una serie de proteínas que llevan a la fosforilación y activación de la cinasa I κ B (IKK) que cataliza la fosforilación del inhibidor de kappa B (IKB) que inhibe al NF- κ B; esta fosforilación es necesaria para la degradación de IKB y a la translocación del NF- κ B al núcleo, favoreciendo la transición hacia células similares a miofibroblastos, estimulando la síntesis de proteínas de ECM, e inhibiendo su degradación.⁵³ La cafeína logró evitar el aumento de interleucinas dependientes del NF- κ B, como la IL-1 β y TNF- α , y por lo tanto, previno la inflamación a partir de que se empezó a administrar.

En las primeras etapas de la fibrosis, las HSCs ya muestran características de células similares al músculo liso, caracterizadas por la expresión de una serie de filamentos contráctiles e incrementan la expresión de α -SMA.^{14,55} Se observa que con el daño con TAA aumentan los niveles de TGF- β y de α -SMA, determinado por inmunohistoquímica y por western blot, siendo que la cafeína evitó el aumento de estas proteínas. La cafeína podría tener una alta capacidad inmunorreguladora y antifibrótica, bloqueando la expresión de estas moléculas. Además, se observó, por zimografía, que la TAA aumentó la actividad de las MMP-9 y MMP-2, siendo éstas metaloproteinasas de la familia de las gelatinasas, que participan en el

proceso de activación del TGF- β , IL-1 β y TNF- α , debido a que escinden el TGF- β de su depósito en la MEC, lo cual favorece al proceso de fibrogénesis promoviendo la activación, migración y proliferación de HSCs.^{56,57} También se observó que la cafeína es capaz de regular la respuesta profibrogénica a través de la disminución de la actividad de las MMP, por lo tanto, previene la activación de las HSCs. Podemos correlacionar esta disminución en la activación de HSCs con una menor cantidad de colágena presente en el parénquima hepático. Previamente se había reportado la importante actividad de la cafeína para prevenir la fibrosis experimental inducida con TAA,^{26,36,37,58} protegiendo a diferentes niveles, tanto antioxidante, antiinflamatorio y antifibrótico; resultando en la reducción de la proliferación y activación de las células HSCs, aunque no se había estudiado el efecto farmacológico de la cafeína en un daño establecido previamente, ya que pareciera ser que la cafeína evita la progresión del daño a partir de que se administra.

CONCLUSIONES

Conclusiones particulares

- La cafeína es capaz de evitar significativamente el daño inducido con TAA durante 6 semanas.
- El efecto antioxidante de la cafeína se debe probablemente a su estructura molecular que permite donar un electrón y lograr estabilizarse. Además de la capacidad de regular a la alza el Nrf2, el cual evita el estrés oxidante al generar moléculas antioxidantes.
- El efecto antiinflamatorio se debe probablemente, en parte, a que evita que se active el factor maestro NF- κ B y no aumenten los niveles de las citocinas pro-inflamatorias.
- El efecto antifibrogénico observado por parte de la cafeína se debe probablemente, en parte, a que se disminuyeron niveles de TGF- β , α -SMA y por lo tanto no hubo síntesis de colágena.

Conclusión general

La administración de la cafeína evitó la progresión de la fibrosis hepática producida por el hepatotóxico TAA. Se observó un efecto antioxidante, al evitar el aumento de marcadores de estrés oxidante, como lo son el 4-HNE y la LPO y al preservar al Nrf2 y evitar la depleción de GSH. Además, se observó un posible mecanismo antifibrótico, al prevenir el aumento de la colágena, del TGF- β y la activación de las HSCs. Por último, se logró dilucidar un posible efecto antiinflamatorio, al evitar el aumento de niveles del factor maestro de la inflamación, el NF- κ B, e interleucinas pro-inflamatorias.

PERSPECTIVAS

- Establecer un modelo de daño hepático en el que se pueda evaluar la reversión de la fibrosis hepática con ayuda de un tratamiento como la cafeína.
- Evaluar la capacidad de la cafeína para revertir la fibrosis hepática en el modelo establecido de daño hepático.
- Estudiar mecanismos antifibróticos, antiinflamatorios y antioxidantes del modelo de reversión de fibrosis hepática. No sólo evaluando los aquí determinados, sino agregar otros parámetros para que nos ayuden a dilucidar el posible mecanismo de acción de la cafeína.
- Probar el efecto de reversión en cultivos de HSCs y poder visualizar la resolución de la fibrosis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Muriel P. The liver: General Aspects and Epidemiology. In: Muriel P, ed. Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants. Waltham, MA: Elsevier; 2017:3-22.
2. Wolfe JL, Schwarz KB. Congenital and Structural Abnormalities of the Liver. In: Diseases of the Liver and Biliary System in Children. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2009:231-252.
3. Patológica SC de A. Histología Básica para Patólogos. http://www.conganat.org/7congreso/imagenes_trabajos/hppweb/paginas/hgado.ado.htm. Published 2014. Accessed August 15, 2019.
4. Barret K. Anatomía funcional del hígado y el sistema biliar. In: Raff H, Levitzky M, eds. Fisiología Médica Un Enfoque Por Aparatos y Sistemas. Mc Graw Hill Lange; 2013:559-564.
5. Sleisenger MH, Fordtran JS, Brandt LJ, Friedman LS, Fiedman M. Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management. 2010.
6. Corless John K, Middleton HM. Normal liver function; a basis for understandig hepatic disease. Arch Intern Med. 1983; 143: 2291-2294.
7. Tortora G, Derrickson B. Hígado y vesícula biliar. In: Principios de Anatomía y Fisiología. Ciudad de México, México: Panamericana; 2013:990.
8. Herrine k S. Estructura y función del hígado. Manual Msd. <https://www.msdmanuals.com/es-mx/professional/trastornos-hepáticos-y-biliares/aproximación-al-paciente-con-hepatopatías/estructura-y-función-del-hgado#>. Published 2016.
9. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. Curr Biol. 2017; 27: 1147-1151.
10. Roy-Chowdhury N, Roy-Chowdhury J. Liver physiology and energy metabolism. In: Feldman M, Friedman L, Brandt L, ed Gastrointestinal and

- Liver Disease. Philadelphia: Elsevier; 2010:1207-1220.
11. Megías M, Molist P, Pombal MA. Atlas de Histología Vegetal y Animal: Tipos Celulares, Hepatocito. Vigo: Universidad de Vigo; 2018.
 12. Tsutsumi V, Nakamura T, Ueno T, Torimura T, Aguirre-García J. Structure and Ultrastucture of the Normal and Diseased Liver. In: Muriel P, ed. Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants. Waltham, MA: Elsevier; 2017:21-30.
 13. Poisson J, Lemoinne S, Boulanger C, et al. Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *J Hepatol.* 2017; 66:212-227.
 14. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017; 14: 397-411.
 15. Li N, Hua J. Immune cells in liver regeneration. *Oncotarget.* 2017;8: 3628-3639.
 16. Li S, Tan HY, Wang N, et al. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int J Mol Sci.* 2015; 16: 26087-26124.
 17. Ramos-Tovar E, Muriel P. Hepatoprotective effect of coffee. In: Farah A, ed. Coffee Consumption and Healt Implications. United Kingdom: Royal society of chemistry; 2019:211-227.
 18. Casas-Grajales S. Antioxidants in liver health. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* 2015; 6:59-72.
 19. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet.* 2008; 371: 838-851.
 20. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest.* 2005; 115: 209-218.
 21. Pinzani M, Interna M, Morgagni VGB. Liver fibrosis. *Springer Semin Immunopathol.* 2000; 21:475-490.
 22. Friedman SL. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. *Gastroenterology.* 2008; 134:1655-1669.

23. Zhou WC, Zhang QB, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2014; 20: 7312-7324.
24. Morales R. La cirrosis hepática y sus consecuencias. <https://vallartaopina.net/2018/08/10/s-gente-pv/toma-control/la-cirrosis-hepatica-y-sus-consecuencias/>. Published 2018.
25. Akhtar T, Sheikh N. An overview of thioacetamide-induced hepatotoxicity. *Toxin Rev.* 2013; 32:43-46.
26. Wallace M, Hamesch K, Lunova M, et al. Standard Operating Procedures in Experimental Liver Research: Thioacetamide model in mice and rats. *Lab Anim.* 2015; 49:21-29.
27. Crespo Yanguas S, Cogliati B, Willebrords J, et al. Experimental models of liver fibrosis. *Arch Toxicol.* 2016; 90:1025-1048.
28. Klatsky AL, Armstrong MA. Alcohol, Smoking, Coffee, and Cirrhosis. 1992; 136: 1248-1257.
29. Ruhl CE, Everhart JE. Coffee and Tea Consumption Are Associated With a Lower. *Gastroenterology.* 2005; 129:1928-1936.
30. Khalaf N, White D, Kanwal F, et al. Coffee and Caffeine Are Associated With Decreased Risk of Advanced Hepatic Fibrosis Among Patients With Hepatitis C. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2015; 13:1521-1531.
31. Alferink LJM, Fittipaldi J, Kiefte-de Jong JC, et al. Coffee and herbal tea consumption is associated with lower liver stiffness in the general population: The Rotterdam study. *J Hepatol.* 2017; 67: 339-348.
32. Centro de Estudio para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria. El Café En México Diagnóstico Y Perspectiva. 2018:33. [http://www.cedrssa.gob.mx/files/10/30El café en México: diagnóstico y perspectiva.pdf](http://www.cedrssa.gob.mx/files/10/30El%20café%20en%20México%20diagnóstico%20y%20perspectiva.pdf).
33. Bennett AW, Bonnie KB. El Mundo de La Cafeína La Ciencia y La Cultura

- En Torno a La Droga Más Popular Del Mundo. México: Fondo de la cultura económica; 2012.
34. Farah A, De Paula Lima J. Caffeine Consumption. In: Farah A, ed. Coffee Consumption and Health Implications. United Kingdom: The Royal Society of Chemistry; 2019:313-339.
 35. Hatzold T. Introduction. In: Chu Y-F, ed. Coffee Emerging Health Effects and Disease Prevention. Wiley-Blackwell, United Kingdom; 2012:1-17.
 36. Furtado KS, Prado MG, Aguiar e Silva MA, et al. Coffee and Caffeine Protect against Liver Injury Induced by Thioacetamide in Male Wistar Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012; 111: 339-347.
 37. Shim SG, Jun DW, Kim EK, et al. Caffeine attenuates liver fibrosis via defective adhesion of hepatic stellate cells in cirrhotic model. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013; 28: 1877-1884.
 38. Arauz J, Zarco N, Segovia J, Shibayama M, Tsutsumi V, Muriel P. Caffeine prevents experimental liver fibrosis by blocking the expression of TGF- β . *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2014; 26:164-173
 39. Mayo Clinic. Agrandamiento del hígado. <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/enlarged-liver/symptoms-causes/syc-20372167>. Published 2018.
 40. Durani Y. Análisis de sangre: alanina aminotransferasa (ALT). Rady Children's Hospital-San Diego. <https://www.mayoclinic.org/es-es/diseases-conditions/enlarged-liver/symptoms-causes/syc-20372167>. Published 2014.
 41. Cabrera-Rubio R, Patterson AM, Cotter PD, Beraza N. Cholestasis induced by bile duct ligation promotes changes in the intestinal microbiome in mice. *Sci Rep*. 2019;9: 12324.
 42. Arauz J, Zarco N, Hernández-Aquino E, et al. Coffee consumption prevents fibrosis in a rat model that mimics secondary biliary cirrhosis in humans. *Nutr Res*. 2017; 40:65-74.

43. Rezaie A, Pashmforosh M, Haghi Karamallah M, Fazlara A, Haghghat N, Shahriari A. Hepatoprotective effect of caffeine on diethylnitrosamine-induced liver injury in rats. *Bulg J Vet Med.* 2014; 17: 183-190.
44. Amer MG, Mazen NF, Mohamed AM. Caffeine intake decreases oxidative stress and inflammatory biomarkers in experimental liver diseases induced by thioacetamide: Biochemical and histological study. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2017; 30: 13-24.
45. Azam S, Hadi N, Khan NU, Hadi SM. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. *Med Sci Monit.* 2003 ; 9: 325-331.
46. Boettler U, Volz N, Teller N, et al. Induction of antioxidative Nrf2 gene transcription by coffee in humans: Depending on genotype? *Mol Biol Rep.* 2012;39: 7155-7162.
47. Kalthoff S, Ehmer U, Freiberg N, Manns MP, Strassburg CP. Coffee induces expression of glucuronosyl transferases by the aryl hydrocarbon receptor and Nrf2 in liver and stomach. *Gastroenterology.* 2010; 139: 1699-1710.
48. Aoyama K, Watabe M, Nakaki T. Critical Review Regulation of Neuronal Glutathione Synthesis. *J Pharmacol Sci.* 2008; 108: 227-238.
49. Gordillo-Bastidas D, Ocegüera-Contreras E, Salazar-Montes A, González-Cuevas J, Hernández-Ortega LD, Armendáriz-Borunda J. Nrf2 and Snail-1 in the prevention of experimental liver fibrosis by caffeine. *World J Gastroenterol.* 2013; 19: 9020-9033.
50. Racanelli V, Rehmann B. The liver as an immunological organ. *Hepatology.* 2006; 43.
51. Jin HS, Park JK, Jo EK. Toll-like receptors and NOD-like receptors in innate immune defense during pathogenic infection. *J Bacteriol Virol.* 2014; 44: 215-225.
52. Kawai T, Akira S. Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors. *Trends Mol Med.* 2007; 13: 460-469.

53. Seki E, De Minicis S, Österreicher CH, et al. TLR4 enhances TGF- β signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med.* 2007;13: 1324-1332.
54. Luedde T, Schwabe RF. NF- κ B in the liver injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2011; 8: 108-118.
55. Weiskirchen R, Tacke F. Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2014;3: 344-34463.
56. Duarte S, Baber J, Fujii T, Coito AJ. Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix Biol.* 2015; 44-46:147-156.
57. Lachowski D, Cortes E, Rice A, Pinato D, Rombouts K, del Rio Hernandez A. Matrix stiffness modulates the activity of MMP-9 and TIMP-1 in hepatic stellate cells to perpetuate fibrosis. *Sci Rep.* 2019; 9: 1-9.
58. Wang Q, Dai X, Yang W, et al. Caffeine protects against alcohol-induced liver fibrosis by dampening the cAMP/PKA/CREB pathway in rat hepatic stellate cells. *Int Immunopharmacol.* 2015;25 :340-352.