



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL IPN**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**Evaluación farmacológica de la administración de café
en el daño hepático experimental.**

Tesis que presenta

M. en C. Jonathan Isaac Arauz Cabrera

Para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

En la especialidad de

Farmacología

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Pablo Muriel de la Torre

México, Distrito Federal

Noviembre, 2013.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Farmacología, pertenece al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la tutoría del Doctor Pablo Muriel de la Torre.

Se contó además con una beca del CONACYT para estudios de posgrado con la clave de registro: 169271.

INDICE

1. ABSTRACT	1
2. RESUMEN	2
3. INTRODUCCION	4
3.1 Generalidades del hígado.....	4
3.2 Lobulillo hepático.....	6
3.3 Tipos celulares.....	8
3.3.1 Células parenquimatosas.....	8
3.3.2 Células no parenquimatosas.....	8
3.3.3 Células endoteliales.....	9
3.3.4 Células de Kupffer.....	9
3.3.5 Células de Pit.....	9
3.3.6 Células estelares (HSC).....	10
3.4 Funciones principales del hígado.....	11
4. DAÑO HEPÁTICO.....	12
4.1 Estrés oxidativo	14
4.2 Mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo.....	16
4.2.2 Antioxidantes enzimáticos.....	16
4.2.3 Antioxidantes no enzimáticos.....	16
4.3 Daño hepático y TGF- β	19
4.4 El café y las enfermedades hepáticas.....	21
5. MODELOS EXPERIMENTALES DE DAÑO HEPÁTICO.....	23
5.1 Modelo de Tioacetamida (TAA).....	23
6. JUSTIFICACION.....	25
7. HIPÓTESIS.....	26
8. OBJETIVOS.....	27
9. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	28

10. METODOLOGIA.....	30
10.1 Actividad de alanino amino trasferasa (ALT).....	30
10.2 Determinación de la actividad de la gamma glutamil transpeptidasa (γ -GTP).....	31
10.3 Determinación de la fosfatasa alcalina (FA).....	32
10.4 Determinación del glucógeno hepático.....	33
10.5 Determinación del grado de peroxidación lipídica.....	34
10.6 Determinación de proteínas por el método de Bradford.....	35
10.7 Determinación de la actividad enzimática de la GPx.....	36
10.8 Determinación del contenido de colágena (hidroxiprolina).....	37
10.9 Histología.....	38
10.10 Western Blot de las citocinas TGF- β , CTGF, α -SMA, IL-10, MMP-13.....	40
10.11 Zimograma para MMP-2 Y 9.....	41
10.12 Extracción de RNA y RT-PCR.....	41
10.13 Análisis estadístico.....	43
11. RESULTADOS.....	44
11.1 Actividad enzimática de la alanino aminotransferasa (ALT).....	44
11.2 Actividad enzimática de la FA y , γ -GTP.....	45
11.3 Contenido de glucógeno hepático.....	46
11.4 Peroxidación lipídica.....	47
11.5 Actividad enzimática de la glutatión peroxidasa (GPx).....	48
11.6 Contenido de colágena.....	49
11.7 Histologías de H&E y Tricrómica.....	50
11.8 Western blot de la citocina TGF- β	52
11.9 Western blot de la citocina CTGF.....	54
11.10 Western blot de la citocina α -SMA.....	56
11.11 Western blot de la citocina IL-10.....	58
11.12 Western blot de la citocina MMP-13.....	60
11.13 Actividad de las MMP-2 y 9.....	61
11.14 Ensayo de RT-PCR para TGF- β , CTGF, α -SMA, Col α 1 y TIMP-1.....	63
12. DISCUSIÓN.....	64

13. CONCLUSIONES.	73
14. BIBLIOGRAFIA	74

1. ABSTRACT

Previous clinical observations suggested that coffee might have beneficial effects on the liver. However, the action mechanism of coffee has not been established. This study was designed to evaluate the antifibrotic properties of coffee and its compounds. In this work, liver cirrhosis was induced by thioacetamide 200 mg/ kg, (i.p.) three times a weekly for 8 weeks. One group of rats concomitantly received coffee or decaffeinated coffee 300 mg/kg (p.o), other group received caffeine or nicotinic acid 20 mg/kg (p.o) respectively daily, 8 weeks; the control group received vehicle only (saline, i.p.). Liver injury was assessed by serological analysis, as well as Hematoxylin and Eosin (H&E) and Masson's stains. Oxidative stress was evaluated by lipid peroxidation and glutathione peroxidase (GPx) activity was decreased. Whole liver lysates were investigated for TGF- β , CTGF, α -SMA and IL-10 by Western blot and RT-PCR. MMP-2 and 9 were analyzed by zymography. TAA administration elevated serum alkaline phosphatase, γ -glutamyl transpeptidase and alanine aminotransferase, liver lipid peroxidation, collagen content, depleted liver glycogen and glutathione peroxidase (GPx) activity. Additionally there were increased levels of proteins: TGF- β , CTGF and α -SMA, MMP-2, 9 and 13. Interestingly, administration of coffee suppressed most of the changes produced by TAA. Histopathological analysis was in agreement with biochemical and molecular findings. Our results indicate that coffee prevents experimental cirrhosis; the action mechanisms are probably associated to its antioxidant properties and mainly by its ability of blocking the elevation of the profibrogenic cytokine TGF- β and CTGF. Various components of coffee that have been related to such a favorable effect, including caffeine and nicotinic acid. These findings suggest a beneficial effect of coffee on the liver.

2. RESUMEN

Estudios epidemiológicos muestran que el consumo del café está relacionado con la disminución de las enzimas hepáticas, además de reducir el riesgo de desarrollar una enfermedad hepática crónica como la cirrosis, estos estudios han sido de tipo observacional. Sin embargo, el mecanismo de acción no ha sido establecido. El objetivo de este estudio fue evaluar las propiedades hepatoprotectoras del café y dos de sus principales componentes como es la cafeína y el ácido nicotínico en un modelo de daño hepático inducido por la administración crónica de tioacetamida (TAA) en ratas Wistar macho. La fibrosis fue inducida por la administración de 200 mg/kg de TAA por vía intraperitoneal cada tercer día durante 8 semanas, concomitantemente de forma diaria se administró por vía oral café y café descafeinado a una dosis de 300 mg/kg, de manera similar se administró cafeína y ácido nicotínico a una dosis de 20 mg/kg. El café y sus compuestos fueron administrados de manera diaria con sus respectivos controles. La actividad de la alanino amino transferasa (ALT), la γ -glutamyl transpeptidasa (γ -GTP) y la fosfatasa alcalina (FA) fueron cuantificadas en plasma. En muestras de hígado se determinó el contenido de colágena, peroxidación lipídica, el glucógeno y la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx). Se realizó un estudio histopatológico, y por medio Western Blot se midió la expresión de TGF- β , CTGF, α -SMA, IL-10, MMP13, y por zimograma MMP-2, 9. Los niveles de RNAm se midió por RT-PCR para TGF- β , CTGF, α -SMA, Col-1 y TIMP-1. La administración crónica de TAA aumentó los niveles de las enzimas ALT, γ -GTP y FA, en hígado se muestra un aumento de la peroxidación lipídica, del contenido de colágena, así como una depleción del glucógeno y la disminución de la actividad de la GPx. Además hubo un incremento en la expresión de las proteínas TGF- β , CTGF, α -SMA, IL-10, y un aumento de la actividad de las MMPs. El café previno la mayoría de los cambios producidos por TAA. Fue capaz de prevenir el aumento de la actividad de las enzimas hepáticas, así como disminuir la deposición de colágena.

De forma interesante el tratamiento disminuyó la expresión de las citocinas profibrogénicas como TGF- β y CTGF, así como previno la activación de las células estelares hepáticas. Disminuye la expresión y actividad de las MMPs. Así también disminuye los niveles de RNAm TGF- β , CTGF, α -SMA y Col-1. Encontramos que la cafeína juega un papel muy importante en el efecto hepatoprotector, sin embargo el ácido nicotínico también muestra efectos importantes. Nuestros resultados muestran que el café previene la fibrosis experimental, el mecanismo de acción se asocia probablemente a sus propiedades antioxidantes y principalmente a su capacidad de bloquear la elevación de las citocinas profibrogénicas TGF- β y CTGF, las cuales atenúan el proceso inflamatorio. La cafeína juega un papel muy importante, sin embargo, otros compuestos antioxidantes presentes en el café muestran efectos favorables. Estos hallazgos sugieren un efecto benéfico del café en el hígado. Sin embargo, se necesitan realizar más estudios básicos y clínicos antes de llegar a una recomendación final.

3. INTRODUCCION

3.1 Generalidades del hígado.

El hígado es el órgano interno más grande del cuerpo, constituye aproximadamente del 2 al 5% del peso corporal en el adulto y el 5% en el neonato. Es de color marrón rojizo, pesa aproximadamente de 1,400 a 1,600 g en los varones adultos y está rodeado de una delgada cápsula fibrosa (cápsula de Glisson), que es la prolongación de la serosa que rodea a todos los elementos del pedículo hepático. El hígado tiende a moldearse sobre estructuras adyacentes; sin embargo, es lo bastante consistente para mantener su forma de cuña que casi llena el hipocondrio derecho, aunque se adelgaza al cruzar el epigastrio hacia el hipocondrio izquierdo. Está situado bajo las costillas, en la parte superior derecha del abdomen. Consta de dos lóbulos principales, el derecho y el izquierdo, los cuales se encuentran divididos por los ligamentos, falciforme y redondo [Netter, 1983]. El lóbulo izquierdo, además, tiene otros dos pequeños lóbulos: el cuadrado y el caudado (figura1).

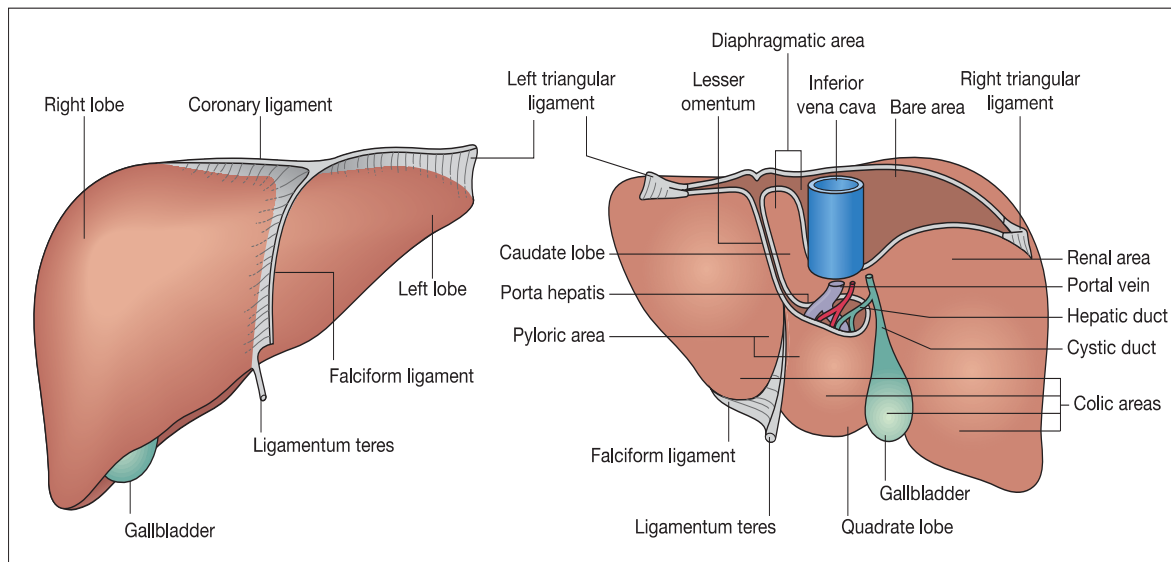


Figura.1. Imagen del hígado, el cual se divide en el lóbulo derecho e izquierdo, los cuales están separados por el ligamento falciforme.

De acuerdo a su anatomía funcional la proyección vertical de las venas suprahepáticas divide al hígado en cuatro secciones: posterior derecha, anterior derecha, medial izquierda y lateral izquierda. Las fronteras anatómicas entre las cuatro secciones así definidas se denominan cisuras (cisura portal derecha, cisura sagital o media y cisura portal izquierda) y no se corresponden con las cisuras de la anatomía morfológica clásica. Su importancia radica en que se trata de líneas fundamentales para la penetración en el interior del parénquima durante una resección reglada. Si se traza un plano horizontal imaginario sobre el eje de la bifurcación portal, se observa cómo las cuatro secciones antes definidas se dividen en ocho segmentos, que componen la base de la anatomía funcional hepática (figura 2). Cada segmento recibe una rama de la tríada portal independiente formada por arteria, porta y conducto biliar rodeada por una vaina de tejido conectivo, prolongación de la cápsula de Glisson que rodea al hígado, de ahí la denominación de pedículo glissoniano [Lockhart y cols.,1998].

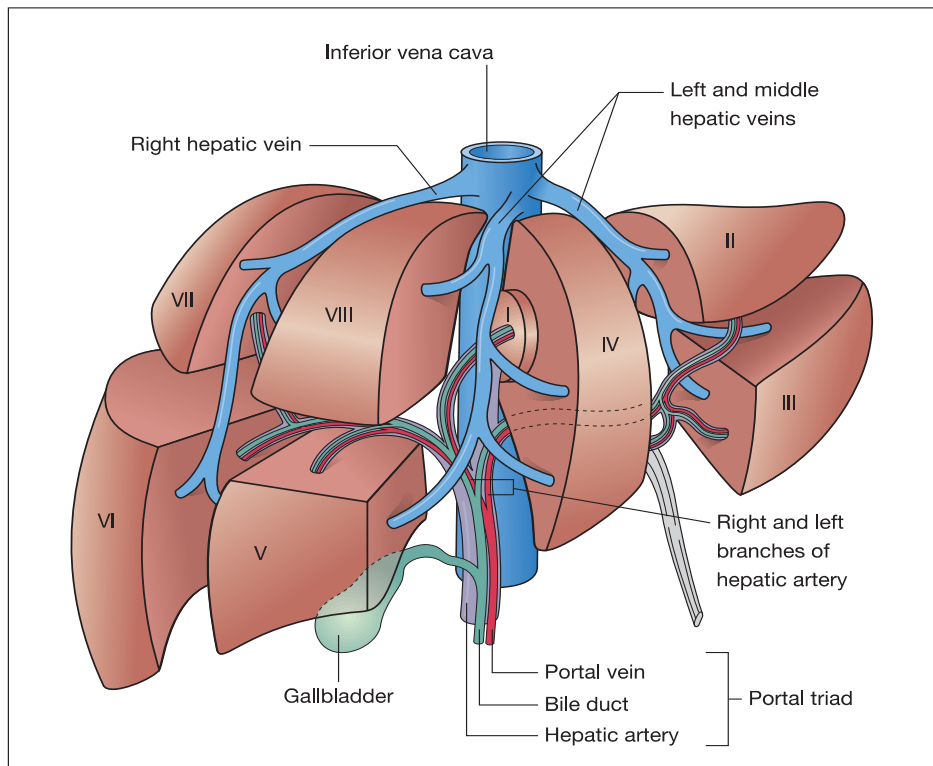


Figura 2. Flujo sanguíneo hepático.

El hígado es el centro de la actividad bioquímica del cuerpo. Presenta una posición estratégica ya que se encuentra entre la circulación intestinal y la general. Además cuenta con un extenso suministro sanguíneo. Recibe sangre rica en oxígeno a través de la arteria hepática (aproximadamente el 25%). La vena porta le suministra sangre (aproximadamente 75%) que transporta nutrientes, toxinas y otras sustancias absorbidas desde el intestino. La sangre de estos dos vasos se mezcla y recorre el hígado a través de los sinusoides hepáticos. Entre las paredes de los sinusoides y los hepatocitos se extiende el espacio de Disse, en el que se proyectan gran número de vellosidades y existen fibras de retícula, así como distintos tipos de células perisinusoidales [Netter y cols., 1983].

3.2 Lobulillo hepático.

La unidad funcional básica es el lobulillo hepático, una estructura cilíndrica de varios milímetros de longitud y de 0.8 a 2 milímetros de diámetro. El hígado humano contiene entre 50,000 y 100,000 lobulillos (Guyton y Hall, 2001) (figura 3).

El lobulillo hepático, se constituye alrededor de una vena central que desemboca en las venas hepáticas y luego en la vena cava. El propio lobulillo se compone en esencia, de placas celulares hepáticas múltiples, que se alejan de la vena central como los radios de una rueda. Cada placa hepática suele estar formada por dos células y entre las células adyacentes se encuentran pequeños canalículos biliares que drenan en los canalículos biliares, en los tabiques fibrosos que separan los lobulillos hepáticos adyacentes (Guyton y Hall, 2001).

Los tabiques también llevan vénulas portales que reciben, sobre todo, la sangre portal del tubo digestivo. Desde las vénulas, la sangre se dirige hacia los sinusoides hepáticos planos, ramificados, ubicados entre las placas hepáticas, y después, hacia la vena central. Así pues, la células hepáticas están constantemente expuestas a la sangre venosa portal.

Además de las vénulas portales, los tabiques interlobulillares contienen arteriolas hepáticas, que suministran sangre arterial a los tejidos septales intercalados entre los lobulillos; muchas de las pequeñas arteriolas también desembocan directamente en los sinusoides hepáticos, de ordinario en los situados a un tercio de la distancia de los tabiques interlobulillares, como muestra la figura 3.

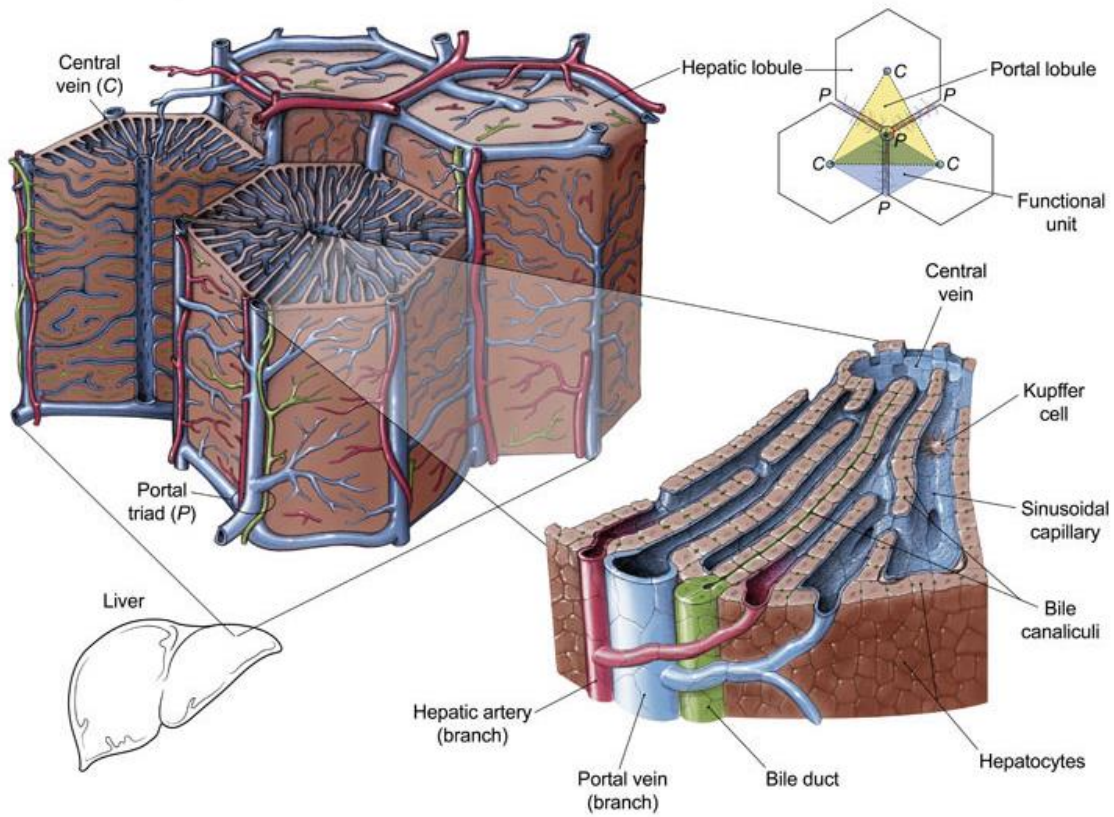


Figura 3. Estructura básica del lobulillo hepático con las placas celulares hepáticas, los vasos sanguíneos, el sistema conductor de la bilis compuestos por el espacio de Disse.

3.3 Tipos celulares.

El hígado contiene distintos tipos celulares. Las células del hígado están divididas en células parenquimatosas y células no parenquimatosas.

3.3.1 Células parenquimatosas.

Los hepatocitos son células epiteliales poliédricas de 30 a 40 μm de diámetro, altamente polarizadas que constituyen el 70% del parénquima hepático, y su función es principalmente metabólica. Están dispuestos en cordones o hileras que conectan a las diferentes zonas. El espacio entre hilera e hilera se le denomina sinusoides hepáticos mientras que el espacio entre hilera y endotelio se le conoce como espacio de Disse. El complejo formado por hepatocitos, capilar de la arteria hepática, capilar porta, conductillo biliar, vasos linfáticos y nervios, forman la llamada triada o espacio porta.

3.3.2 Células no parenquimatosas.

Cuadro I. Organización de las distintas poblaciones celulares no parenquimatosas existentes en el hígado

Células no parenquimatosas	Tipo celular	Importancia
40%	Células estelares hepáticas	Profibrogénicas
20%	Endoteliales (sinusoidales)	Intercomunicación celular
20%	Células de Kupffer	Respuesta inflamatoria ante un estímulo
20%	Linfocitos intrahepáticos	Respuesta inmune y/o tolerancia

Estas incluyen a las células endoteliales, células de Kupffer, células estelares y células de Pit.

3.3.3 Células endoteliales.

La pared de los sinusoides está formada por una capa discontinua de células endoteliales fenestradas que carecen de membrana basal, lo que permite dar a los sinusoides una función de filtro. Gracias a las fenestraciones se permite el rápido intercambio de moléculas pequeñas y grandes entre la sangre de los sinusoides y los hepatocitos [Bacon y Di Bisceglie, 2000]. Las zonas fenestradas controlan el intercambio entre la sangre y el espacio perinusoidal. Este intercambio esta influenciado por agentes endógenos (hormonas y neurotransmisores) y xenobióticos (etanol, fármacos) aparentemente por la contracción del citoesqueleto [Desmet, 1994].

3.3.4 Células de Kupffer.

Son macrófagos hepáticos, poseen actividad fagocítica y se encuentran localizadas a lo largo de los sinusoides. Su función es la de receptáculo de desechos para todo tipo de material viejo, innecesario, dañado, alterado o extraño. Después de la activación de las células de Kupffer por un agente (endotoxina u otro), ellas secretan un numero de productos con potente actividad biológica, incluyendo citocinas, fibronectina, prostaglandinas, factor activador de plaquetas y el factor transformante- β (TGF- β) [Bacon y Di Bisceglie, 2000].

3.3.5 Células de Pit.

También conocidas como "natural killer", son generalmente encontradas en el lumen del sinusoides y por su polaridad están en relación principalmente con las células endoteliales, pero también se encuentran a veces entre la célula endotelial y una célula de Kupffer. Las células de Pit son una defensa antitumoral hepática y también contra infecciones virales [Bacon y Di Bisceglie, 2000].

3.3.6 Células estelares (HSC).

También llamadas perisinusoidales, células de Ito, almacenadoras de grasa o cebadas; su núcleo presenta frecuentemente invaginaciones originadas por las gotas lipídicas citoplasmáticas que lo comprimen. En el citoplasma que contiene las gotas de lípidos se halla almacenada la vitamina A [Gonzales y cols., 1996]. Las proteínas liberadas por el daño a los hepatocitos pueden actuar como los primeros mitógenos paracrinos proinflamatorios de las células estelares. Por otra parte las células estelares juegan un papel muy importante en la fibrosis hepática, sin embargo también participan en la homeostasis de la matriz hepática normal, ya que no solo producen componentes de la matriz extracelular, si no que también producen enzimas para su degradación [Desmet, 1994].

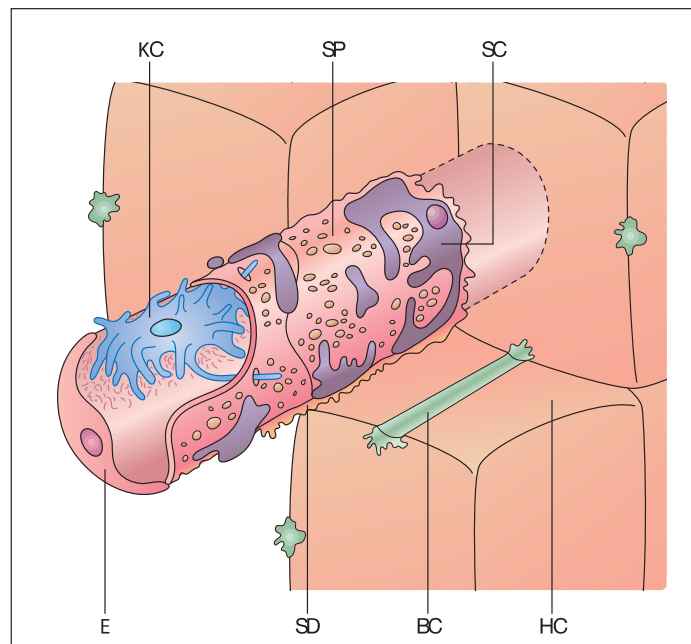


Figura 4. Tipos celulares hepáticos y su localización. Células endoteliales (E), células de Kupffer (KC), células estelares (SC).

3.4 Funciones principales del hígado.

El hígado se encarga de cerca de 500 funciones orgánicas. Tiene un papel importante en la digestión, en el metabolismo de los azúcares y las grasas, e incluso en el sistema inmunitario. Recibe toda la circulación procedente del intestino delgado y la mayoría del grueso, así como del páncreas y bazo a través de la vena porta. Su localización estratégica le permite su función como defensor bioquímico contra tóxicos químicos que penetran a través de la comida y como procesador de los ingredientes de la comida absorbida [Michalopoulos, 2007].

Las células hepáticas producen la bilis, cuya misión es facilitar la digestión y absorción de nutrientes liposolubles; también catabolizan el grupo hemo hasta bilirrubina [Highleyman y Franciscus, 2003].

El hígado es esencial para la función óptima del cerebro. La pérdida de la función del hígado conduce a una encefalopatía hepática crónica y finalmente al coma [Michalopoulos, 2007].

El hígado almacena varios nutrientes, entre ellos las vitaminas A, D, B9 (folato) y B12. Asimismo, almacena hierro y participa en la síntesis del hemo. Sintetiza varias proteínas esenciales (enzimas, hormonas, factores de coagulación y factores inmunitarios). Entre ellas, destacan ciertas proteínas de fijación (que adhieren y transportan vitaminas, minerales, hormonas y grasas) y la albúmina (que ayuda a mantener el volumen sanguíneo adecuado). Los factores de coagulación producidos por el hígado son el fibrinógeno, la protrombina (Factor II) y el Factor VII. Otras proteínas sintetizadas por el hígado son la fosfatasa alcalina, la gamma-glutamil transferasa (GGT) y el factor de crecimiento insulínico [Highleyman y Franciscus, 2003]. Tiene función detoxificante tanto de fármacos como de otro tipo de xenobióticos, incluido el amoníaco procedente del metabolismo proteico y que transforma en urea para poder ser eliminado. Es el órgano central que controla el metabolismo de hidratos de carbono, grasas y proteínas [Michalopoulos, 2007].

4. DAÑO HEPÁTICO.

La cirrosis es una enfermedad crónica e irreversible que afecta al hígado y que consiste en la muerte progresiva del tejido hepático normal, que es sustituido por un tejido fibroso o cicatricial que incapacita al hígado para ejercer sus funciones normales. Inicialmente el hígado se inflama y hay destrucción de un gran número de hepatocitos. Si el estímulo o agente etiológico que ha producido este daño desaparece, el tejido puede recuperar sus funciones puesto que se estimula la regeneración hepática, la cual incluye síntesis y degradación de colágena, lo que da lugar a la remodelación del tejido. Sin embargo, cuando el daño es de menor intensidad y es producido periódicamente, no se estimula la regeneración sino que se comienza el proceso cicatricial y se produce primero fibrosis y posteriormente cirrosis hepática (figura 5).

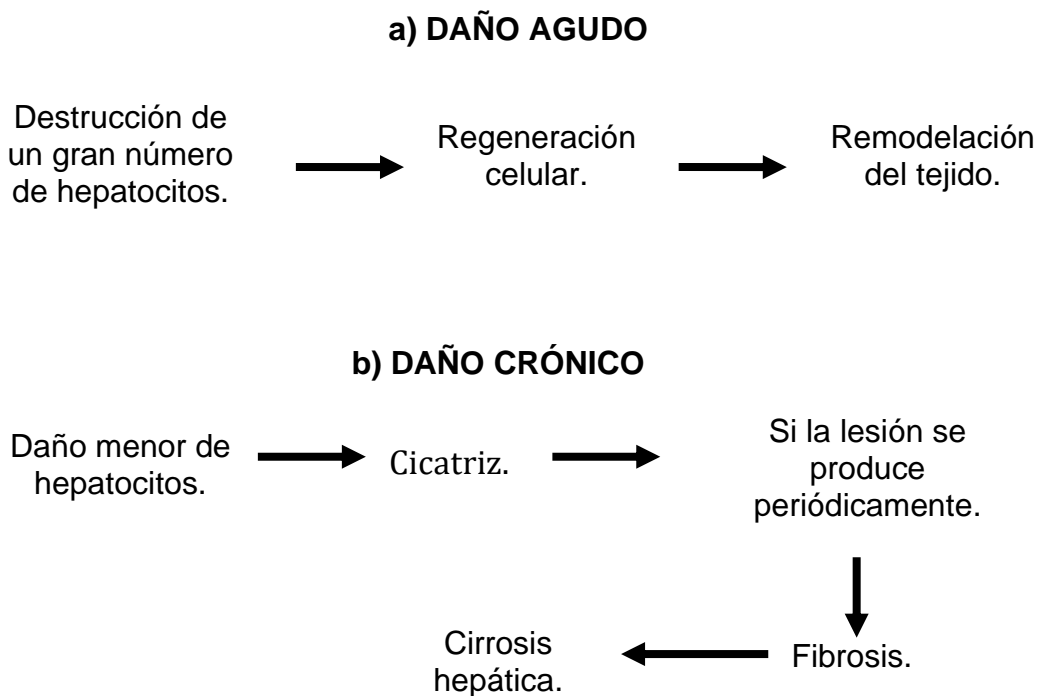


Figura 5. Esquema de a) daño agudo y b) daño crónico al hígado.

Los detonantes más frecuentes de este padecimiento son los virus de la hepatitis tipo B y C, el abuso en el consumo de alcohol, exposición prolongada a fármacos o sustancias tóxicas y el bloqueo de las vías biliares que también pueden culminar en un daño crónico [Olaso y Fridman, 1998].

La fibrosis es el evento que antecede a la cirrosis hepática, la cual se considera un estado dinámico, bidireccional y en ciertos casos reversible con fases de inicio, progresión y regresión. Se puede definir como una patología cuya principal característica es la acumulación desordenada de proteínas de matriz extracelular (MEC) de tipo fibrilar (principalmente colágenas) que reduce las fenestraciones entre las células sinusoidales hasta eliminarlas por completo (capilarización del sinusoides), declinando así las funciones del hígado, con una pérdida de la arquitectura normal y formación de nódulos de regeneración. La mayor parte de la colágena depositada durante la fibrosis hepática es producto de las células estelares hepáticas, esta población celular sufre un cambio radical llamado activación que consta de varias fases y características, entre otras, adquieren un fenotipo miofibroblástico, las cuales migran y proliferan en los focos de necrosis hepatocelular además de reclutar células inflamatorias [Friedman, 2003]. La mayor parte de las sustancias que regulan la transformación fenotípica y la proliferación de las células estelares se derivan de los hepatocitos dañados, de las células de Kupffer activadas y del propio infiltrado inflamatorio. Diversos factores de crecimiento como el TGF- β y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), además de sustancias vasoactivas como vasopresina, trombina, angiotensina II y endotelina 1, contribuyen a la acumulación de células estelares activadas y en consecuencia ejercen una acción profibrogénica en el daño crónico [Méndez y Uribe, 2003]. Todos los tipos de colágena hepática están aumentados en la cirrosis; en especial, en bandas de tejido conectivo que rodean a los hepatocitos. El aumento del contenido de tejido conectivo hepático puede deberse a un incremento en su síntesis, aunado a disminución en su degradación o a una combinación de ambos factores (figura 6).

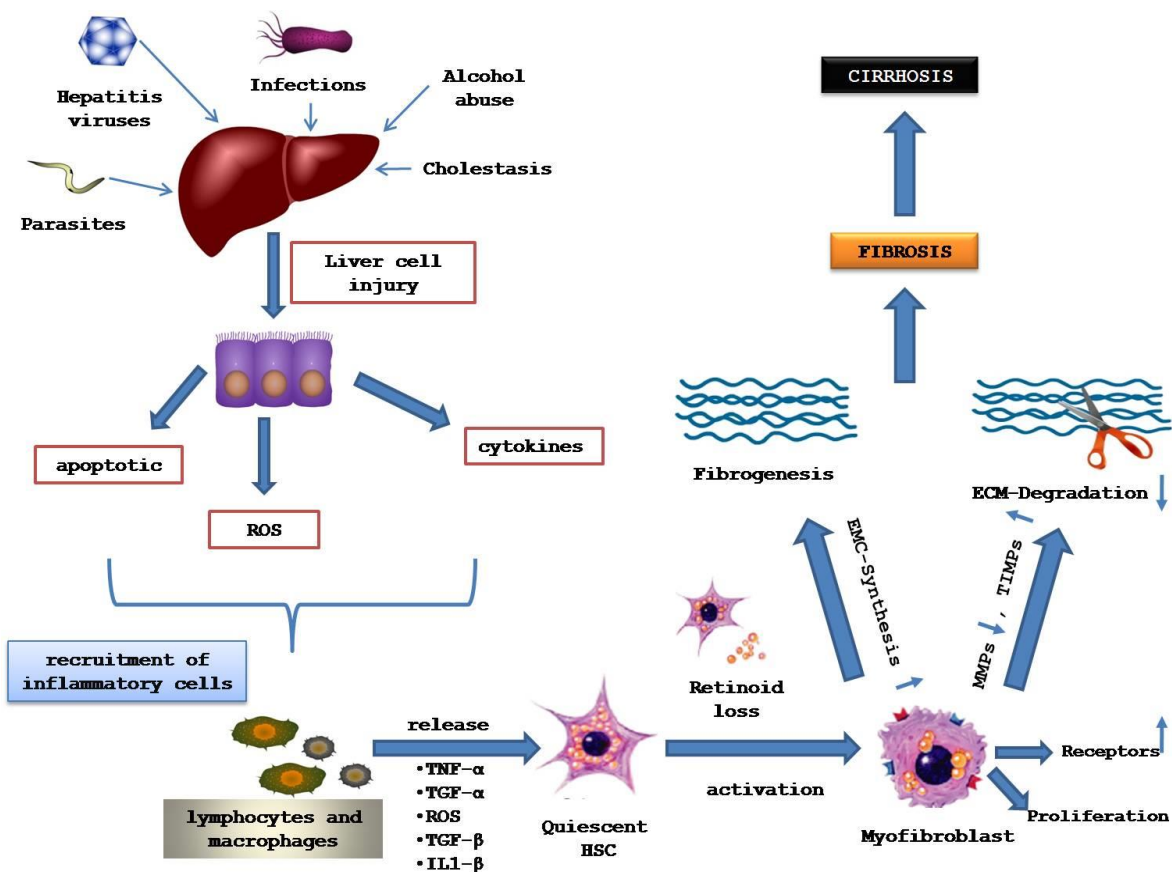


Figura 6. Diagrama esquemático que resume la secuencia patogénica y la activación de las células estelares hepáticas (HSC), que conduce a la fibrosis y la cirrosis (Arauz y Muriel 2012).

4.1 Estrés oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno, tales como H_2O_2 , OH^\bullet , O_2^\bullet , conocidos por sus siglas en inglés como (ROS reactive oxygen species) desempeñan importantes funciones fisiológicas y también puede causar un extenso daño celular. Los seres vivos poseen un conjunto de sistemas fisiológicos que se encargan de eliminar las ROS ocupándose de mantener el estado de equilibrio que existe entre oxidantes y antioxidantes [Heffner y Repine, 1989]. Se define al estrés oxidativo como un desequilibrio entre la generación de ROS y la capacidad de defensa antioxidante de la célula, el cual afecta a los principales componentes celulares, incluyendo los lípidos, proteínas y ADN (figura 7) [Evans y Halliwell, 2001].

La fibrosis y la cirrosis hepática está asociada con el consumo de alcohol y infección de virus de hepatitis B y C. En ambos agentes etiológicos, se ha demostrado que aumentan la producción de ROS independiente y sinérgicamente. Interesantemente las ROS están implicadas en el desarrollo de fibrosis y cirrosis hepática en estas condiciones patológicas [Perlemuter y cols., 2003].

Varios estudios indican que las ROS juegan un papel central en la actividad fibrogénica del TGF- β , aunque el mecanismo subyacente no está claro (figura 7). El TGF- β aumenta la producción de ROS en numerosos tipos de células no fagocíticas, tales como células endoteliales, células epiteliales y fibroblastos [Carmona y cols., 2008, Muriel y Arauz, 2012].

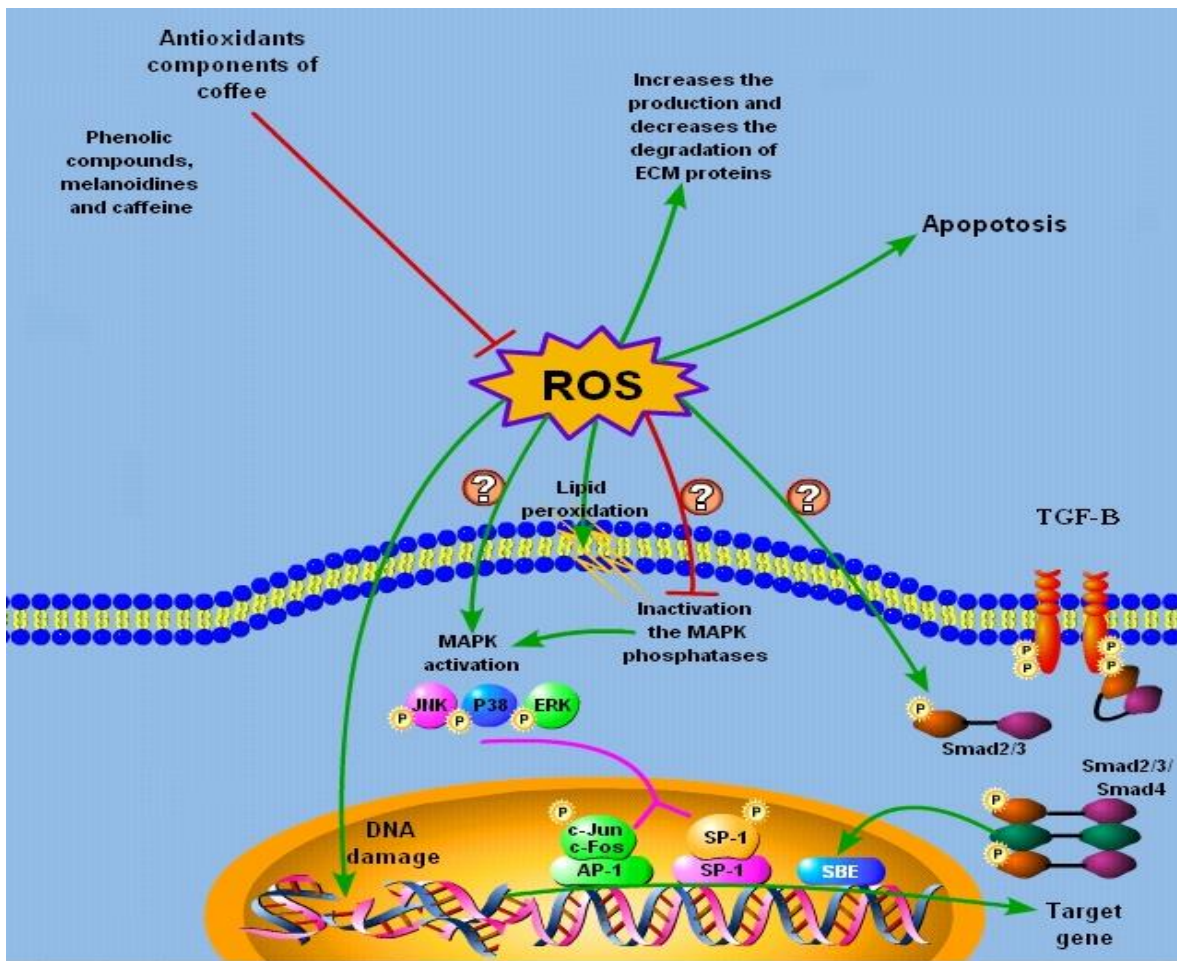


Figura 7. Modelo de ROS induce síntesis de matriz extracelular y fibrogénesis (Muriel y Arauz, 2012)

4.2 Mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo.

Los seres vivos poseen un conjunto de sistemas fisiológicos que se encargan de eliminar las ROS ocupándose de mantener el estado de equilibrio que existe entre oxidantes y antioxidantes [Heffner y Repine, 1989; Evans y Halliwell, 2001].

La gran diversidad en la vida media de los distintos prooxidantes, desde nanosegundos para el caso del radical hidroxilo hasta varios segundos para los radicales peroxilo o el óxido nítrico y peroxinitrito pone de manifiesto la gran variedad de sistemas de defensa necesarios para hacerles frente [Sies y Stahl, 1995].

4.2.2 Antioxidantes enzimáticos.

La función de los antioxidantes enzimáticos es prevenir la iniciación de las oxidaciones en cadena, al eliminar las ROS ($O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2). En este grupo encontramos 3 enzimas:

Catalasa. La catalasa es una hemoproteína tetramérica cuya función es reducir el peróxido de hidrógeno para formar oxígeno molecular y agua. Así mismo, posee actividad peroxidasa [Nohl y Hegner, 1978].

Superóxido dismutasa. Son un grupo de enzimas que catalizan la dismutación del radical superóxido para formar peróxido de hidrógeno [Weiss, 1986].

Glutación peroxidasa. Complementa la actividad de la catalasa como sistema reductor del peróxido de hidrógeno. Esta enzima clave del ciclo del glutatión, actúa además sobre grandes moléculas de peróxidos lipídicos y sobre productos derivados de las reacciones catalizadas por la lipooxigenasa.

4.2.3 Antioxidantes no enzimáticos.

Además de los mecanismos enzimáticos anteriormente mencionados, la célula dispone de un conjunto de mecanismos no enzimáticos que permiten contrarrestar la agresión oxidativa que causan los radicales libres.

Vitamina C.

La vitamina C o ácido L-ascórbico es hidrosoluble, y bajo la mayoría de condiciones fisiológicas se encuentra en su forma desprotonada. Se le considera un antioxidante muy importante en fluidos extracelulares [Stocker y cols., 1991]. Actúa eficientemente atrapando los radicales peroxilo en fase acuosa, antes de que éstos puedan iniciar la peroxidación lipídica; de esta forma el ácido ascórbico puede proteger a las membranas del daño peroxidativo. Además, la vitamina C puede llevar a cabo esta protección frente a la peroxidación aumentando la actividad del α -tocoferol [Sies y Stahl, 1995].

Glutati3n.

El glutati3n es un tripéptido ubicuo, γ -glutamyl-cisteinil-glicina, descubierto por Hopkins en 1921. Es el tiol no proteico, soluble en el citoplasma, más abundante en la célula y juega un papel central en la defensa antioxidante. La molécula de glutati3n puede encontrarse en dos estados de oxidaci3n distintos: en forma reducida, como tiol (GSH) y en forma oxidada, compuesta por 2 moléculas unidas por un puente disulfuro (GSSG) [De Leve y Kaplowitz, 1991]. Las células eucariotas poseen tres reservorios principales para el GSH. Casi el 90% del GSH celular está en el citosol, el 10% en la mitocondria y un pequeño porcentaje en el retículo endoplasmático [Meredith y Reed, 1982]. Mientras que en este último compartimento la proporci3n GSH/GSSG es de 3:1, en el citoplasma y la mitocondria este cociente sobrepasa la proporci3n 10:1 [Meredith y Reed, 1982].

Centrándonos en su funci3n antioxidante, el GSH en presencia de una GSH-peroxidasa selenio-dependiente, reduce a los peróxidos producidos de manera end3gena (Figura 8). Como resultado de esto, el GSH se oxida a GSSG, que es nuevamente reducido a GSH por la GSSG reductasa, a expensas del NADPH, formando así un ciclo redox.

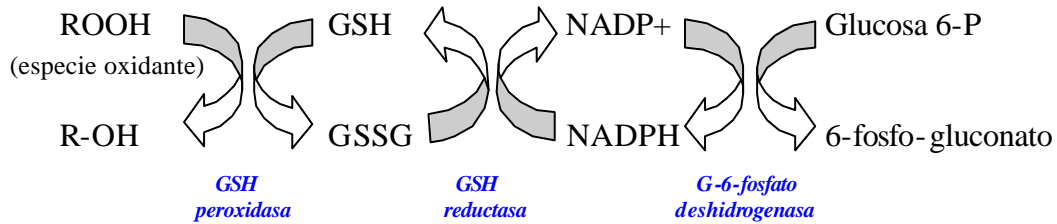


Figura 8. Actividad antioxidante del GSH y GSSG.

Vitamina A y β -CAROTENOS.

La vitamina A y sus derivados biológicamente activos, retinal y ácido retinoico, junto con un gran número de análogos sintéticos comprenden el grupo de compuestos denominados retinoides [Evans y Kaye, 1999]. La vitamina A es esencial para la visión, la diferenciación y proliferación celular, la reproducción, el normal desarrollo neonatal y la integridad del sistema inmune. Su naturaleza lipofílica y su localización en el compartimento hidrofóbico de las membranas biológicas y lipoproteínas hacen que la vitamina A sea un compuesto efectivo en la reducción de la peroxidación lipídica, actuando como inhibidor de las reacciones de oxidación en cadena [Evans y Kaye, 1999].

Vitamina E.

El tocoferol es el compuesto principal de esta vitamina, corresponde químicamente a un derivado metil-6-hidroxicromano, con una cadena alifática de 16 carbonos laterales. La vitamina E se encuentra ampliamente distribuida en los alimentos, de estos las grasas y aceites contienen mas vitamina E, otras fuentes son los cereales, aves, carnes, pescados, etc.

Esta vitamina tiene diversas funciones metabólicas, entre ellas tal vez la más importante y mejor estudiada es el papel protector de las membranas biológicas, ya sea evitando la oxidación de sus componentes celulares esenciales o evitando la formación de productos tóxicos de oxidación como los peróxidos de ácidos grasos, actuando así como estabilizador de la estructura lipídica de los tejidos [Evans y Kaye, 1999].

4.3 Daño hepático y TGF- β .

El TGF- β 1 desempeña también un papel importante en la reparación tisular normal pero deja de formarse al completarse el proceso de curación, mientras que esto no ocurre cuando las lesiones son crónicas [Gressner y cols 2002]. Existen numerosos reportes que muestran que el proceso fibrótico hepático está regulado por el TGF- β , por su acción profibrogénica. Las células estelares hepáticas son inducidas por el TGF- β para diferenciarse en miofibroblastos y producir mayores cantidades de proteínas de matriz extracelular [Wells, 2000]. Sin embargo recientemente ha sido reportado que los hepatocitos son reconocidos como importantes células que participan activamente en el proceso fibrogénico, además de las CEH.

Se ha reportado que los hepatocitos sintetizan factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) tanto en cultivo y en el daño hepático, además el CTGF es sobre regulado por el TGF- β , y los hepatocitos son probablemente la principal fuente de CTGF [Gressner y cols., 2008].

El CTGF se propuso entonces como un importante modulador río abajo de TGF- β , lo que amplifica la acción profibrogénica de esta citocina en el hígado y en otros tejidos [Leask y Abraham 2006]. El TGF- β induce la expresión del CTGF en los hepatocitos y la fibrogénesis. La activación a través del dominio intracelular de receptor de cinasa ALK5 desencadena la fosforilación de Smad2 pero no de Smad3 permitiendo translocación nuclear con un mediador común, la Smad4 y subsecuentemente la expresión CTGF (figura 9). El papel crucial del CTGF en la fibrogénesis se muestra por una importante sobre modulación en el hígado fibrótico. Por lo tanto, CTGF aparece como un blanco terapéutico interesante para combatir la fibrosis y la cirrosis.

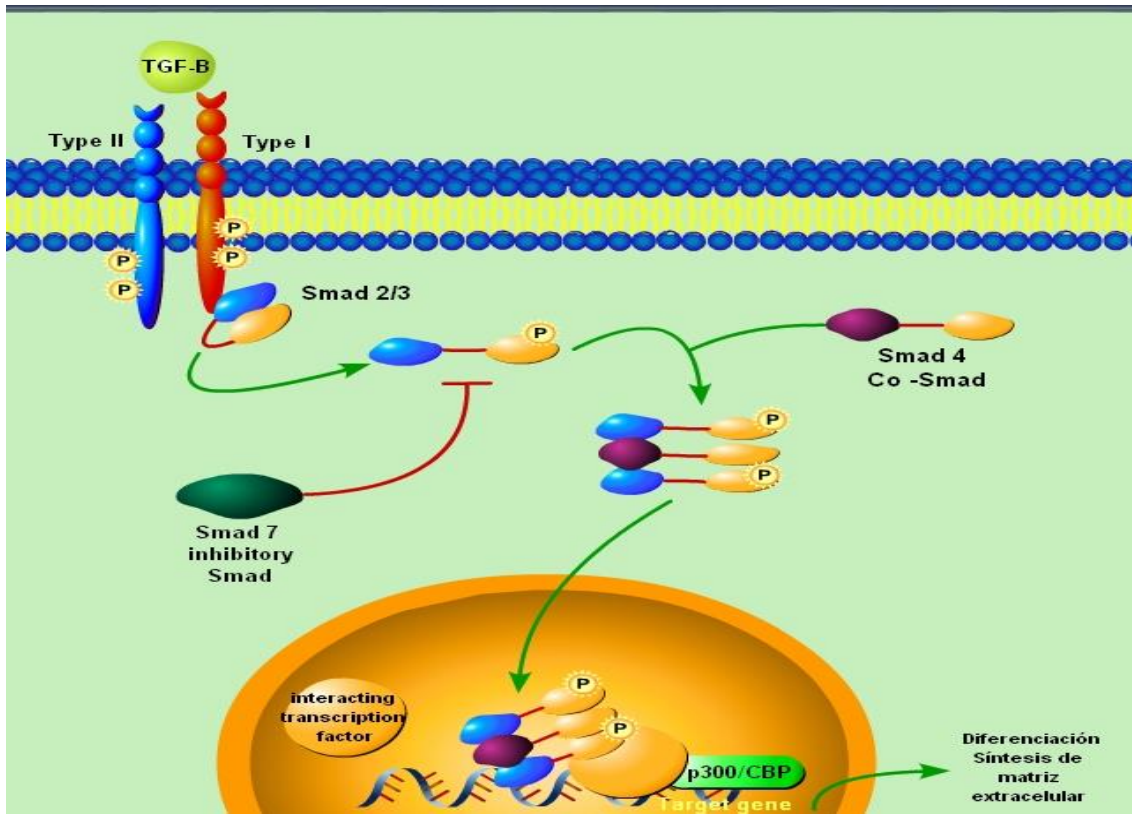


Figura 9. Modelo del TGF-β induce síntesis de matriz extracelular y fibrogénesis (Muriel y Arauz, 2010).

4.4 El café y las enfermedades hepáticas.

El café se encuentra entre las bebidas más consumidas en el mundo, es apreciado por su aroma y sabor, pero el contenido de cafeína desempeña un papel importante en su popularidad. El café es una mezcla química compleja conteniendo más de un millar de diferentes productos químicos incluidos carbohidratos, lípidos, vitaminas, alcaloides, compuestos nitrogenados y compuestos fenólicos [Spiller, 1998].

Durante el proceso de tostado del grano existe una pérdida de agua, así como la degradación de muchos de los compuestos antioxidantes, sin embargo, no existe mucha diferencia entre los antioxidantes totales y los diferentes grados de tostado del grano. [Daglia et al., 2000].

Sin embargo, desde el punto de vista de la concentración total del café, antes de la detección del compuesto original o sus metabolitos en el cuerpo, y los efectos fisiológicos, hay esencialmente sólo tres ingredientes que son importantes: la cafeína, diterpenos alcoholes (cafestol y kahweol), y ácido clorogénico y otros polifenoles (McCusker et al., 2003). La mayoría de los estudios sobre los efectos en la salud del consumo del café en los humanos ha sido observacional. En los últimos años una serie de estudios han sugerido posibles riesgos asociados con el consumo de café, sin embargo, los resultados son controvertidos.

Algunos investigadores han reportado que el consumo del café incrementa los factores de riesgo cardiovasculares, tales como aumento de la presión sanguínea y aumento del colesterol [Nurminen y cols., 1999; Jec y cols., 2001] pero estudios prospectivos no reportan un incremento de los factores de riesgo cardiovasculares [Myers y Basinsk, 1992; Kawachi y cols., 1994].

Más recientemente, el consumo de café se ha asociado con una reducción en el riesgo de varias enfermedades crónicas. Varios investigadores han centrado su atención en la relación entre el consumo de café y las enfermedades hepáticas. Los científicos de los Institutos Nacionales de Salud han informado que el aumento en el consumo de café se asocia con una progresión más lenta de la fibrogénesis en pacientes con enfermedad hepática alcohólica crónica, así también en una reducción

en la incidencia de hepatocarcinoma (HCC), y estos efectos benéficos sobre la salud humana, son a consecuencia de sus componentes específicos contenidos en esta bebida, tales como el cafestol, kahweol, ácido clorogénico, ácido nicotínico y la cafeína [Tanaka y cols., 1998, Corrao y cols., 2001, Ruhl y Jeverhart, 2005].

Existe evidencia de que las personas que consumen 3 o más tazas de café presentan menor daño hepático. Sin embargo no se ha encontrado una relación causal entre el consumo de café y las enfermedades hepáticas [Benoit y cols., 2001]. El consumo de café se asocia con una progresión más lenta de la fibrogénesis en pacientes con enfermedad hepática alcohólica crónica, y una reducción en la incidencia de la cirrosis. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los que el café ejerce estos efectos no se han identificado (Tabla 2).

Tabla 2. Relación entre el café y las enzimas hepáticas.

Referencia	País	Asociación
Tanaka <i>et al.</i> , 1998.	Japón: 12687 hombres y mujeres , 40-69 años	Café: inversa γ-GTP, ALT, AST
Nakanishi <i>et al.</i> ,2000.	Japón: 1353 trabajadores de oficina varones, 35-59 años	Café: inversa GGT
Corrao <i>et al.</i> , 2001.	Italia: 732	Café: relación dosis respuesta entre café y el riesgo de cirrosis
Ruhl y Everhart . 2005	Estados Unidos: 5944 personas	Café: inversa (ALT)

5. MODELOS EXPERIMENTALES DE DAÑO HEPÁTICO.

Diferentes modelos de daño hepático pueden proveer herramientas útiles para el estudio de la patología hepática. Muchas de las lesiones agudas y crónicas conocidas del hígado pueden ser inducidas experimentalmente; éstas incluyen necrosis (local, masiva o difusa), esteatosis, lesión venular hepática y cirrosis de diferentes tipos morfológicos [Muriel, 2007].

5.1 Modelo de Tioacetamida (TAA)

La TAA (CH_3CSNH_2), comenzó a utilizarse como fungicida de los naranjos y cobro importancia en 1943 cuando se detectó su presencia en el jugo con el consiguiente riesgo para la salud. La tioacetamida ha sido muy utilizada en la investigación desde 1948, fecha en la que se afirmó que su administración crónica producía cirrosis hepática [Fitzhugh y Nelson, 1948]. Se ha demostrado que son varios los productos resultantes del metabolismo de la TAA: acetamida, sulfato ($\text{CH}_3\text{CSO}_2\text{NH}_2$) y sulfóxido ($\text{CH}_3\text{CSO}_2\text{NH}_2$) (figura 10). El primero de ellos no produce lesiones hepáticas, ni siquiera en dosis muy altas; el sulfato, en cambio, posee una elevada capacidad para originar necrosis en hígado. El sulfóxido de tioacetamida resulta por la acción de una mono-oxigenasa microsomal ligada al citocromo P450 sobre la TAA. Algunos autores indican que aun es posible la activación de la TAA-sulfóxido hasta TAA-sulfona por medio de la isoenzima hepática, y que ambos serían los responsables de los efectos tóxicos [Castro y cols., 1974].

Precisamente los niveles microsomales de citocromo P450 descienden como consecuencia de la administración de la TAA [Hunter y cols., 1977]. La mayoría de los estudios aceptan que la cirrosis producida por la TAA es similar a la enfermedad humana, ya que existe bastante similitud en los cambios histológicos y bioquímicos entre ambos tipos de cirrosis.

En general se puede afirmar que la cirrosis producida por TAA reproduce las alteraciones morfológicas y bioquímicas de la cirrosis humana: la hipertensión portal, las disminuciones en el flujo sanguíneo portal, en la excreción hepática y los contenidos del citocromo P450 y de glucógeno hepáticos, la elevación de la fosfatasa alcalina sérica, así como las alteraciones histológicas y del metabolismo lipídico producidas por la administración de TAA. Sin embargo, no se puede dejar de señalar que, por supuesto, existen diferencias con la enfermedad humana. Entre ellas destacan dos: el agente etiológico y la reversibilidad de las lesiones. En efecto, las alteraciones debidas a la TAA acaban desapareciendo, algunas en cuestión de días o semanas y otras al cabo de varios meses [Zimmermann y cols., 1987].

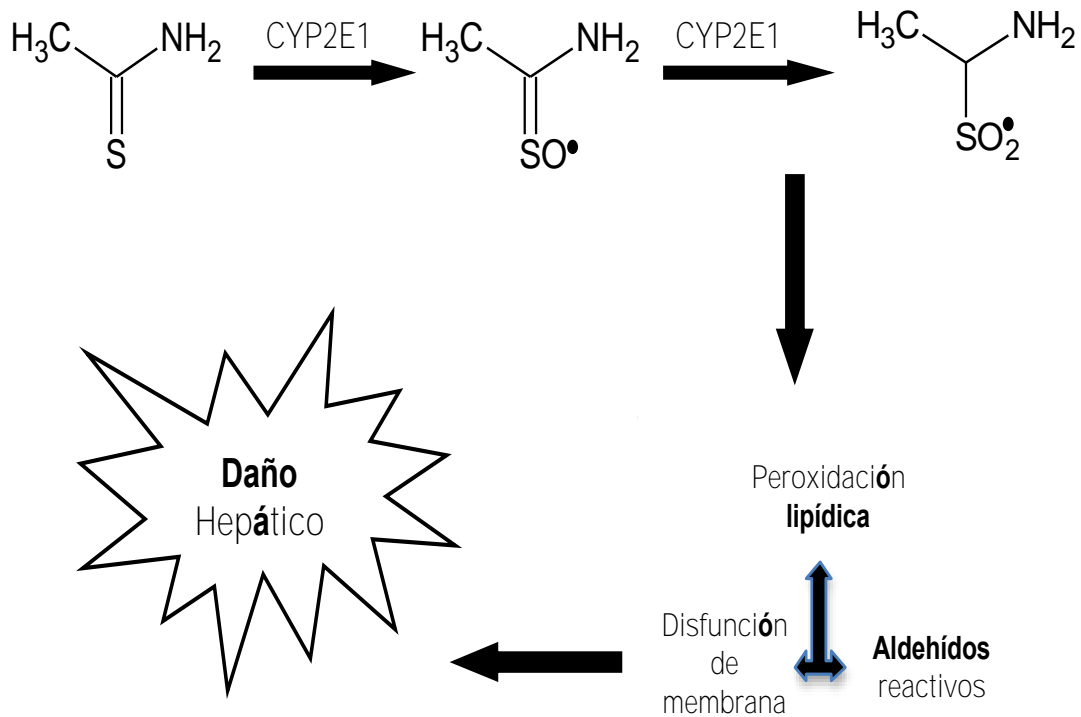


Figura 10. Metabolismo de TAA y daño hepático.

6. JUSTIFICACION

En México las enfermedades crónicas del hígado se ubican desde 1990 como la quinta causa de muerte, obteniendo un porcentaje del 5.9% del total de defunciones en el 2006 y ocupa el primer lugar en hombres de 30 a 64 años de edad, debido principalmente al consumo en exceso de alcohol (INEGI).

En la actualidad, el número de fármacos utilizados en el tratamiento de las enfermedades hepáticas es reducido y únicamente son útiles para disminuir los síntomas de la enfermedad. Cuando la cirrosis hepática se encuentra en una etapa avanzada, el trasplante de este órgano es el último recurso, no debemos olvidar que la disponibilidad de órganos es limitada, además de que se presentan otros inconvenientes como la falta de compatibilidad entre el donador y receptor entre otros. Debido a esto y ante la falta de tratamientos efectivos contra estos padecimientos, es necesario ampliar el conocimiento sobre los mecanismos por los que se establecen las enfermedades hepáticas, con el fin de diseñar y generar terapias útiles para estos padecimientos. Actualmente se cuenta con modelos de daño hepático experimentales útiles que mimetizan algunos estados patológicos clínicos.

El café es una bebida de alto consumo, a la cual se le han atribuido acciones benéficas en el hígado, por lo tanto el realizar estudios *in vivo* del café así como algunos de los compuestos que están contenidos en él, serán relevantes para considerarlos como opciones terapéuticas en las enfermedades hepáticas.

7. HIPÓTESIS.

El daño hepático inducido por la administración crónica de TAA en ratas, produce un aumento de las especies reactivas de oxígeno lo que trae como consecuencia la activación de las células de Kupffer promoviendo la expresión de la citocina profibrogénica TGF- β y su inductor río abajo CTGF el cual amplifica el proceso fibrótico, estas citocinas promueven la activación de las células estelares hepáticas a un tipo miofibroblasto, aumentando la síntesis de matriz extracelular y disminuyendo su degradación hasta producir fibrosis. La administración concomitante de café y café descafeinado, y dos de sus principales compuestos como son; cafeína y ácido nicotínico, previenen el daño hepático debido a sus propiedades antioxidantes y a su capacidad de disminuir la expresión de TGF- β .

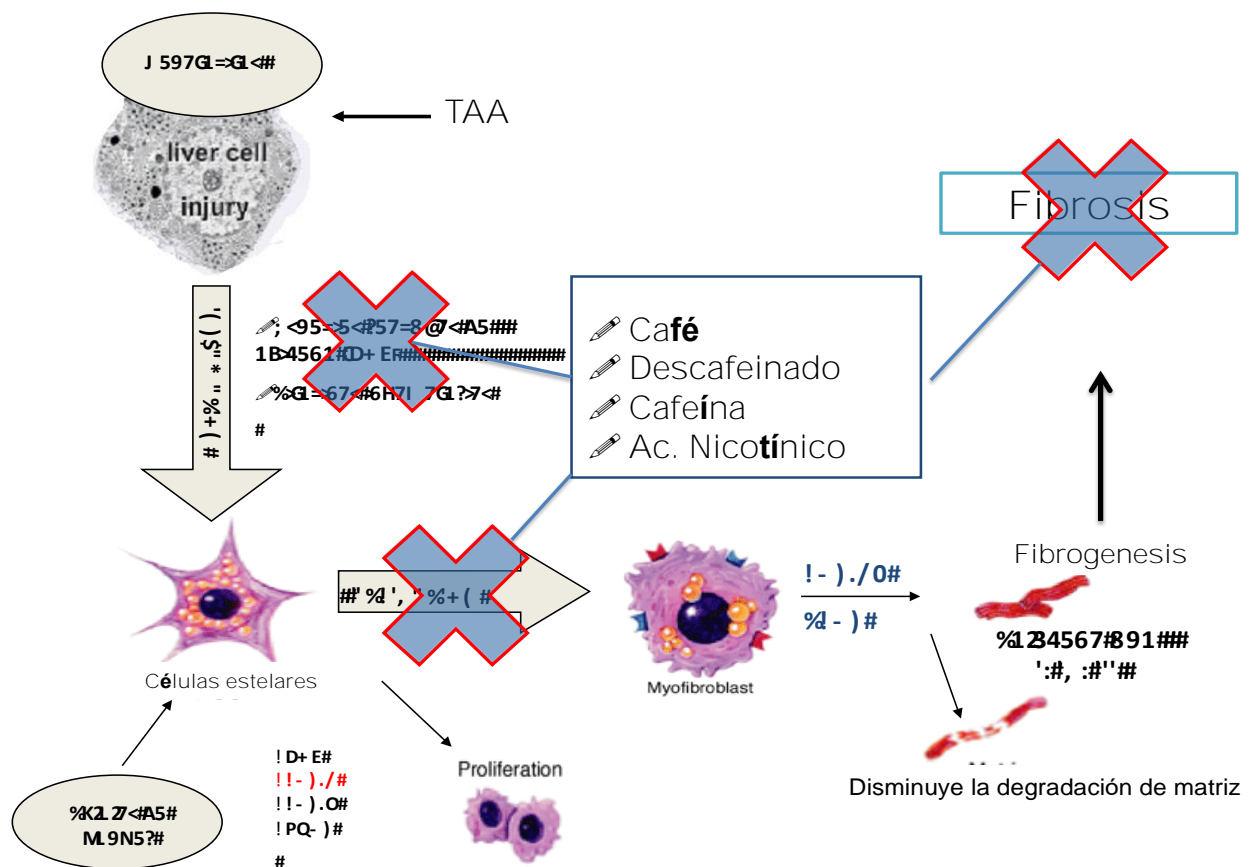


Figura 11. Representación esquemática de la hipótesis.

8. OBJETIVOS.

General.

Evaluar el posible efecto hepatoprotector del café, café descafeinado, cafeína y ácido nicotínico en el modelo de daño hepático inducido por TAA en la rata.

Específicos.

- Evaluar el efecto del café, la cafeína y el ácido nicotínico en la prevención del daño hepático inducido por TAA.
- Evaluar el efecto antioxidante del café, la cafeína y el ácido nicotínico en el modelo de daño hepático con TAA.
- Caracterizar el posible efecto anti-fibrótico del café, café descafeinado, cafeína y ácido nicotínico mediante la inhibición de la expresión del CTGF inducida por TGF- β , en el modelo de TAA.

9. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso inicial de 110-130g. La fibrosis fue inducida por la administración de 200 mg/kg de TAA por vía intraperitoneal cada tercer día durante 8 semanas, concomitantemente de forma diaria se administró por vía oral café y café descafeinado a una dosis de 300 mg/kg, de manera similar se administró cafeína y ácido nicotínico a una dosis de 20 mg/kg. El café y sus compuestos fueron administrados de manera diaria con sus respectivos controles, tal como se muestra en la siguiente figura:



Figura 11. Esquema de tratamiento en el modelo de prevención.

Para cumplir los objetivos planteados se utilizaron los fármacos mostrados en la siguiente tabla.

Tabla 3. Fármacos evaluados y dosificación.

FÁRMACO	DOSIS
Tioacetamida (TAA)	200 mg/kg i.p
Café	300 mg/kg p.o
Café descafeinado	300 mg/kg p.o
Cafeína	20 mg/kg p.o
Acido Nicotínico	20 mg/kg p.o

Control: A este grupo se le administró agua destilada (vehículo con el cual se administró la TAA), más agua Milli Q (vehículo con el cual se administraron los fármacos)

Al término del tratamiento los animales se sacrificaron para obtener una muestra de sangre por punción cardiaca, se extrajo el hígado y se realizaron las determinaciones experimentales mostradas en la figura 11.

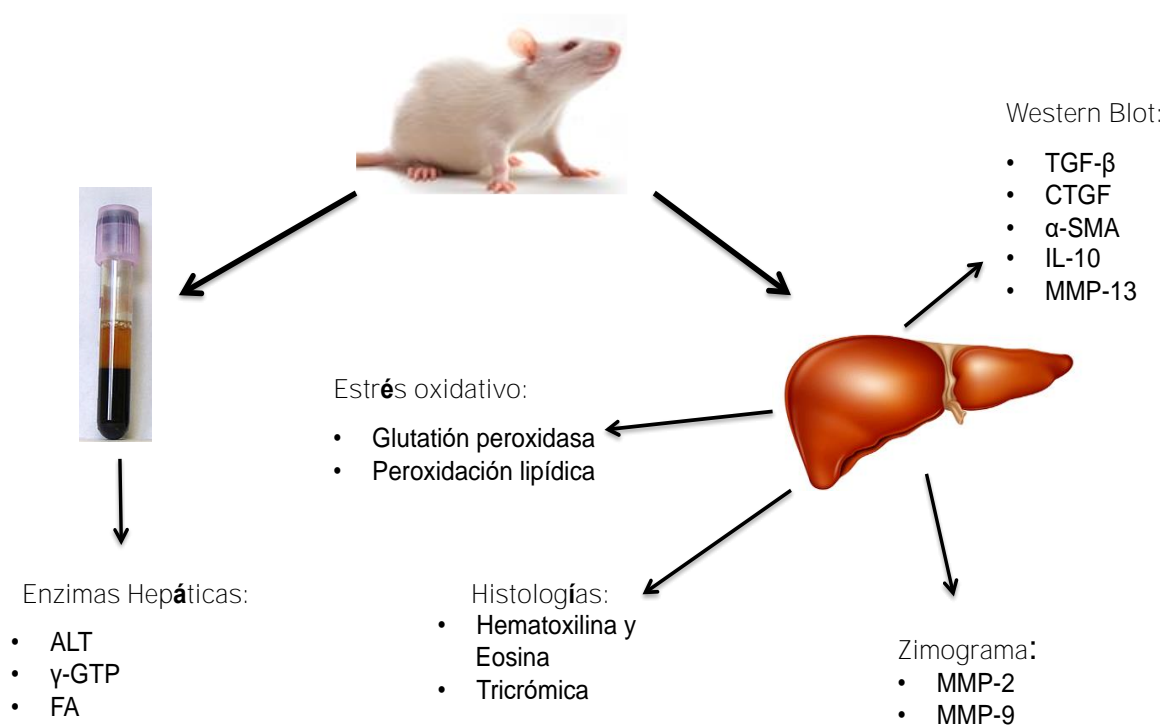


Figura 12. Determinaciones experimentales.

Además se realizó un ensayo de RT-PCR para monitorear los niveles de RNAm de las siguientes proteínas:

- TGF- β (Factor de crecimiento transformante beta)
- CTGF (Factor de crecimiento transformante de tejido conectivo)
- α -SMA (Alfa actina del músculo liso)
- Col α 1 (Colágeno alfa 1)
- TIMP-1 (Inhibidor de metaloproteinasas 1)

10. METODOLOGIA.

10.1 Actividad de alanino amino transferasa (ALT).

La actividad de la enzima alanina aminotransferasa se determina por el método de (Reitman y Frankl, 1957), en el que se mide el complejo colorido formado por el piruvato y la 2,4 dinitrofenilhidrazina, que se absorbe a 515nm.

Se rotularon los tubos blancos y problemas para cada muestra.

La determinación se realiza de la siguiente manera:

	BLANCO (ml)	PROBLEMA (ml)
1.- Solución de sustrato	0.25	0.25
2.- Suero Problema	---	0.05
3.- Mezclar y agitar suavemente, incubar a 37°C durante 60 min.		
4.- Reactivo cromógeno	0.25	0.25
5.- Suero problema.	0.050	---
6.- Incubar a 37°C durante 15 min.		
7.- NaOH 0.4 N.	2.5	2.5
8.- Leer los tubos a 515 nm.		

10.2 Determinación de la actividad de la gamma glutamil transpeptidasa (γ -GTP)

El fundamento de la determinación de la actividad enzimática de la γ -GTP es que el sustrato, la glutamil-p-nitroanilida, en presencia de la enzima γ -GTP y del receptor γ -1-glutamil, como lo es la glicil-glicina, produce γ -1-glutamilglicina y p-nitroanilina que se puede cuantificar con un espectrofotómetro a 410nm [Glossmann y Neville, 1972].

En un tubo de ensaye de 13x100mm se agregaron los siguientes reactivos:

- 400 μ l de Tris-HCl 200 mM, pH 8.2
 - 100 μ l $MgCl_2$ 200 mM
 - 100 μ l Glicil-glicina 40 mM, pH 8.2
 - 200 μ l Gamma-glutamil-p-nitroanilida 10 mM.
-
- ✓ Previa incubación por 10 min a 37 C, se inicia la reacción al agregar 200 μ L de plasma.
 - ✓ Se incuba a 37 C durante 30 min, y se detiene la reacción con 2 ml de ácido acético 1.5 M.
 - ✓ Se lee a 410 nm en el espectrofotómetro.
 - ✓ Se hace un blanco sustituyendo los 200 μ L de plasma por agua.
 - ✓ La actividad enzimática se determina interpolando el valor de la muestra en una curva estándar de p-nitroanilina y se reporta en μ mol de sustrato hidrolizado por litro de plasma por minuto.

10.3 Determinación de la fosfatasa alcalina (FA).

Se siguió la técnica que a continuación se describe (Berger y Rudolph, 1963).

Se rotularon los tubos blancos y problemas para cada muestra.

- 1.- 0.25 ml buffer de glicina 0.1 M y MgCl_2 1mM, pH 10.5
- 2.- 0.25 ml de sustrato p-nitro fenilfosfato.
- 3.- Colocar los tubos en baño maría a 37°C por 5 minutos.
- 4.- Añadir 50 μl de la muestra, mezclar suavemente.
- 5.- Incubar 30 minutos a 37°C.
- 6.- Parar la reacción con 5 ml de NaOH 0.02 N, agitar por inversión.
- 7.- Leer absorbancia a 410 nm.

El blanco es idéntico pero colocando 50 μl de agua en lugar de muestra.

10.4 Determinación del glucógeno hepático.

La determinación del glucógeno hepático se realiza con la técnica de la antrona (Seifter y cols, 1950).

- 1) Se pesan 0.5 g de hígado en tubos de tapón esmerilado, se les adiciona 1.5 ml de KOH al 30%, se tapan y se hierven en baño de agua durante 30 min.
- 2) Después de enfriar los tubos, se pasa la solución cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 ml, y se afora con agua agitando.
- 3) Del matraz anterior se toma de 40 a 160 μL con pipeta volumétrica , llevándolo a 1 ml en tubos esmerilados de 13x100, por duplicado , se prepara además un tubo blanco con 1 ml de agua y otros 2 estándares con 20 μL de una solución de glucosa estándar (1 mg/ml) se lleva a 1 ml con agua.
- 4) Se prepara una solución de antrona 0.2% en H_2SO_4 concentrado. Se añaden 2ml a cada tubo enfriado sobre hielo agitando suavemente con ayuda de una bureta.
- 5) Se tapan los tubos fríos y se ponen en un baño de agua hirviendo por 15 min.
- 6) Se enfrían de inmediato sobre agua con hielo. Se leen a 620 nm.

CALCULOS

$$\frac{20 \times A(\text{mtra})}{1.11 \times A(\text{std})} = \mu\text{g de glucógeno en la alícuota}$$

$A(\text{mtra})$ = Absorbancia de la muestra.

$A(\text{std})$ = Absorbancia del estándar.

Se expresan los resultados como gramos de glucógeno/100 g de hígado teniendo en cuenta las diluciones realizadas.

10.5 Determinación del grado de peroxidación lipídica.

Esta técnica es colorimétrica y se basa en el método del ácido tiobarbitúrico que reacciona con el Malondialdeído y sus subespecies reactivas oxidadas [Buege y Aust, 1978].

Reactivos:

- Tris HCl 150 mM pH=7.4
- Acido Tricloroacético (TCA) al 15%
- Acido Tiobarbitúrico (TBA) 0.375% p/v en TCA al 15% (Se prepara en el momento la cantidad necesaria)

Procedimiento:

1. Pesar 0.5 g de hígado.
2. Homogenizar en 5 ml de agua.
3. Tomar 300 μ l del homogenado al 10% y agregar 700 μ l de Tris-HCl 150 mM para
4. completar 1 ml
5. Incubar a 37°C por 30 minutos.
6. Agregar 2 ml de TBA al 0.375% disuelto en TCA al 15 %.
7. Poner a ebullición por 45 minutos.
8. Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos y leer el sobrenadante a 532 nm.

10.6 Determinación de proteínas por el método de Bradford.

Esta determinación se efectúa por el método de [Bradford, 1976], en el que las proteínas se unen al azul brillante de Coomassie. Este último presenta dos coloraciones, rojo y azul. La forma de color rojo se convierte en azul cuando se une a las proteínas.

Reactivos:

- Acido Fosfórico al 85 % 100 ml
- Alcohol Etílico 50 ml
- Azul de Coomassie G-250 100 mg
- Aforar a un litro con agua.

Procedimiento:

1. Se toman 100 μ l del homogenado y se lleva a 1,000 μ l el agua tridestilada.
2. Tomar alícuotas para proteínas y llevarlas a 100 μ l con agua (20 μ l de la dilución anterior + 80 μ l de agua tridestilada).
3. El blanco se prepara poniendo 100 μ l de agua.
4. Añadir 2.4 ml del reactivo.
5. Leer absorbancia a 595 nm.
6. Se prepara una curva de calibración utilizando Albúmina sérica bovina (1mg/ml). Poniendo 0, 10, 15, 25, 20, 30, 35, 40, 45, 50 μ l.
7. Completar con agua a 100 μ l

10.7 Determinación de la actividad enzimática de la GPx.

El método de Lawrence y Burk [Lawrence y Burk, 1976] fue utilizado para analizar la actividad de la GPx con hidroperóxido de cumeno como sustrato. Una alícuota de 1.5 ml del homogenizado de hígado al 10% con buffer de fosfato de potasio (75 mM, pH 7) se filtró a través de muselina y se centrifugó a 900 g por 5 min a 4°C. La mezcla de reacción contenía 200 µl del sobrenadante obtenido de la centrifugación del homogenado, 2 ml de buffer de fosfato de potasio (75mM, pH 7), 50 µl de glutatión (60 mM), 0.1 ml de 30 Uml⁻¹ de glutatión reductasa, 0.1 ml de EDTA (15 mM), 0.1 ml de β-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH 3mM) y 0.3 ml de agua. La reacción se inició con la adición de 0.1 ml de hidroperóxido de cumeno (35 mM). La oxidación de NADPH se registró a 340 nm durante 4 min y la actividad enzimática se calculó como los nmol de NADPH oxidado min⁻¹mg⁻¹ de proteína utilizando un coeficiente de extinción molar de 6.22x10⁶M⁻¹cm⁻¹.

10.8 Determinación del contenido de colágena (hidroxiprolina).

La técnica se basa en el método de Rojkind y Gonzalez [1974].

1. Se pesa 0.1 g de hígado de rata previamente secado con papel filtro y se coloca en una ampolleta.
2. Se agregan 2 ml de HCl 6N y se sellan con el mechero ó soplete, para posteriormente colocarlas a 100°C en el horno durante 24 hrs.
3. Una vez hidrolizada la muestra, se rompe la ampolleta y se coloca nuevamente al horno a temperatura de 60-80°C aproximadamente 24 hrs o hasta que seque.
4. Las muestras ya secas se resuspenden con 2 ml de solución amortiguadora (Sol. 1); se agitan vigorosamente en el vortex y se vacía en un tubo de ensaye, las ampolletas se lavan con la adición de 1 ml de la misma solución. Centrifugar a 3000 rpm durante 15 min.
5. En un tubo conteniendo una pequeña porción de anorita se deposita el sobrenadante, se agita durante un minuto, centrifugar a 3000 rpm por 15 min, si se observa que el sobrenadante no queda claro repetir nuevamente este paso.
6. Se toma 1 ml de este sobrenadante más 1 ml de H₂O y 1 ml de cloramina T (Sol. 2). Se deja reposar exactamente 20 minutos a temperatura ambiente. Se hace un blanco.
7. Transcurridos los 20 min, se adicionan 0.5 ml de tiosulfato de sodio 2 M, 1 ml de NaOH 1N y aproximadamente 2 g de NaCl. Se agitan inmediatamente para detener la reacción.
8. A cada tubo se le agregan 6 ml de tolueno y se agitan por 1 minuto. La fase de tolueno se utiliza para la determinación de prolina y la fase acuosa para la hidroxiprolina.
9. Se extrae la capa de tolueno y se desecha. La porción acuosa se cubre y se coloca a un baño de agua hirviendo durante 20 minutos.
10. Los tubos se enfrían 15 minutos preferentemente en refrigerador. Ya fríos se les adiciona 6 ml de tolueno y se agitan durante 1 min.
11. De la fase de tolueno se toman alícuotas por duplicado de 1 ml y se les agrega 4 ml del reactivo de Ehrlich y se agitan vigorosamente.
12. Se dejan reposar durante 30 minutos para que se lleve a cabo la reacción colorida. Pasados los mismos, leer a 560 nm.

10.9 Histología.

La técnica utilizada fue la tinción Tricrómica de Masson (TM) la que busca teñir a las bandas de colágena hepática en color azul, el núcleo celular en color negro y el citoplasma en color rojo [Masson, 1929]. Se lleva acabo el siguiente procedimiento:

Los cortes de hígado se depositan en un vial conteniendo una solución fijadora de formaldehido (formol) al 10% en PBS, el tiempo mínimo de fijación es de 24 horas. Los cortes se lavan con agua corriente, se deshidratan en alcoholes y se embeben en parafina. Se hacen cortes de 6-7 micras de grosor y se cubren con silano. Se realiza lo siguiente:

- 1) Las rebanadas se desparafinan y rehidratan con xileno, alcohol absoluto y alcohol al 95%.
- 2) Se enjuagan con agua destilada.
- 3) Se sumergen en el fijador de Bouin por 1 hr a 56 °C, o toda la noche a temperatura ambiente.
- 4) Se enfrían y lavan con agua corriente hasta que el color amarillo desaparece.
- 5) Se enjuagan con agua destilada.
- 6) Se sumergen en la solución de hematoxilina de hierro de Weigert por 10 min. Se lavan con agua corriente al mismo tiempo.
- 7) Se enjuagan con agua destilada.
- 8) Se sumergen en la solución de fucsina acido-escarlata de Biebrich por 15 min. Se recupera la solución.
- 9) Se enjuaga con agua destilada.
- 10) Se colocan en la solución de acido fosfomolibdico/acido fosfotungstinico por 10 a 15 min antes de la solución de anilina de azul y en acido fosfotungstinico acuoso al 5% por 15 min antes del contraste verde claro. Se desecha la solución.
- 11) Se colocan en la solución de anilina azul por 5 a 10 min o con la solución verde claro por 1 min. Se recupera la solución.

- 12) Se enjuagan con agua destilada
- 13) Se lava con agua acética el 1% por 3 a 5 min. Se desecha la solución.
- 14) Se lava con alcohol al 95%.
- 15) Se lavan con alcohol absoluto (dos cambios de alcohol).
- 16) Se lavan con xileno (dos cambios de alcohol)
- 17) Se montan en el polímero Permout o bálsamo.

10.10 Western Blot de las citocinas TGF- β , CTGF, α -SMA, IL-10, MMP-13.

El reactivo "Tripure™ Isolation Reagent (Roche)" fue utilizado para aislar la proteína total de las muestras de tejido de hígado de acuerdo con las instrucciones del fabricante para la obtención de una fracción enriquecida en proteínas en la cual se determinó la concentración de estas por el medio el método del ácido bicinconinico. Posteriormente, 50 μ g de proteína de cada muestra fue cargada en un gel de poliacrilamida-SDS al 12% para su separación por electroforesis en condiciones desnaturizantes. Una vez hecho este proceso, las proteínas separadas en el gel fueron transferidas a una membrana PVDF (BIO-RAD) por medio de una cámara de transferencia húmeda. Posteriormente, las membranas fueron tratadas durante 30 min con una solución de bloqueo de leche descremada al 5% y Tween 20 al 0.05%. las membranas fueron incubadas durante toda la noche con anticuerpos primarios dirigidos contra las citocinas TGF- β , metaloproteinasa de matriz (MMP-13) (MAB1032 y MAB13426, respectivamente; Millipore Corp. Billerica, MA, USA), interleucina-10 (IL-10), CTGF (SC-57245 and SC-14939, respectivamente; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) y alfa actina del musculo liso (α -SMA,) (A5691; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Al día siguiente las membranas fueron lavadas y posteriormente expuestas al anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (Zymed) durante 2 horas. Finalmente la detección de las bandas de interés se llevo a cabo con un kit de quioluminiscencia (Amersham). La intensidad de las bandas de señal para la proteína de interés fueron digitalizadas y analizadas por densitometría utilizando el software lab Works 4.0 imaging. Se llevaron a cabo correcciones de la cantidad de proteína cargadas con el gel utilizando un anticuerpo monoclonal con la proteína estructural β -actina (Perez-Severiano y cols, 2002)

10.11 Zimograma para MMP-2 Y 9.

Geles de SDS-poliacrilamida al 10% se co-polimerizaron con gelatina (1 mg/mL) y se utilizan para separar las proteínas totales, los geles se recuperan y se lavan 3 veces por 30 min, empleando una solución de Tritón X-100 AL 2.5%, mediante agitación constante. Posteriormente, se incuban con buffer de activación, el cual contiene: Tris-HCl 0.05 M pH 7.4, NaCl₂ 10 mM y NaN₃ 0.02%, por 36 h. A continuación el gel se tiñe con azul de Coomasie R-250, para lograr apreciar las bandas de degradación.

10.12 Extracción de RNA y RT-PCR.

Se aisló el RNA total de hígado de rata utilizando Trizol (Invitrogen) y la concentración y pureza del RNA se determinó mediante la medición de la relación de absorbancia A260-A280 nm. Posteriormente, 1 µg de ARN total fue tratado con DNAasa I (New England Biolabs) siguiendo las instrucciones del fabricante, usando M-MLV transcriptasa inversa (Invitrogen), y 2 µl del cDNA resultante fue amplificado por PCR con Taq polimerasa (Invitrogen). La secuencia de los cebadores utilizados para amplificar el TGF-β, CTGF, α-SMA, colágeno α1, inhibidor de metalopeptidasas 1 (TIMP-1), las condiciones del cDNA y PCR se presentan en la Tabla 4. Como control positivo se utilizó cDNA de β-actina. Las imágenes fueron digitalizadas con un sistema de imágenes BioDoc-It Imaging System (UVP).

Table 4. Primers usados para RT-PCR

Gene	Numero de acceso al Banco de Gen	Secuencia del primer	Numero de ciclos	Tm (°C)	Tamaño del producto (bp)
TGF- β	NM_021578.2	F 5' AACCCCCATTGCTGTCCCGT 3' R 5' TTCAGCCACTGCCGGACAAC 3'	35	58	190
CTGF	NM_022266.2	F 5' CAAGGACCGCACAGTGGTT 3' R 5' ACTCTGCTTCTCCAGCCTGC 3'	35	58	196
α -SMA	NM_031004.2	F 5' GAATGAACGCTTCCGCTGCC 3' R 5' TCCTGTCAGCAATGCCTGGG 3'	35	58	185
Collagen α 1	NM_053304.1	F 5' TTCAGCTTTGTGGACCTCCG 3' R 5' TAGCACGCCATCGCACACA 3'	35	58	192
TIMP-1	NM_053819.1	F 5' CTGCAACTCGGACCTGGTT 3' R 5' GGTTCTGGGACTTGTGGACA 3'	35	50	200

10.13 Análisis estadístico.

Todas las determinaciones se hicieron por duplicado. Se obtuvo la media y el error estándar para cada uno de los diferentes indicadores medidos en los grupos de tratamientos.

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. Se consideró que hubo una diferencia significativa cuando $p \leq 0.05$.

11. RESULTADOS.

11.1 Actividad enzimática de la alanino aminotransferasa (ALT).

La ALT es una enzima presente en los hepatocitos, un incremento en los niveles séricos de esta enzima refleja un aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática y por tanto un daño a los hepatocitos. En la figura 13 podemos observar cómo se encuentra incrementada la actividad de esta enzima de manera significativa en el grupo tratado con TAA durante 8 semanas ($p \leq 0.05$). Los tratamientos con café, café descafeinado, cafeína y ácido nicotínico previnieron parcialmente el incremento de la actividad de esta enzima ($p \leq 0.05$). Los grupos control mostraron valores similares al grupo control.

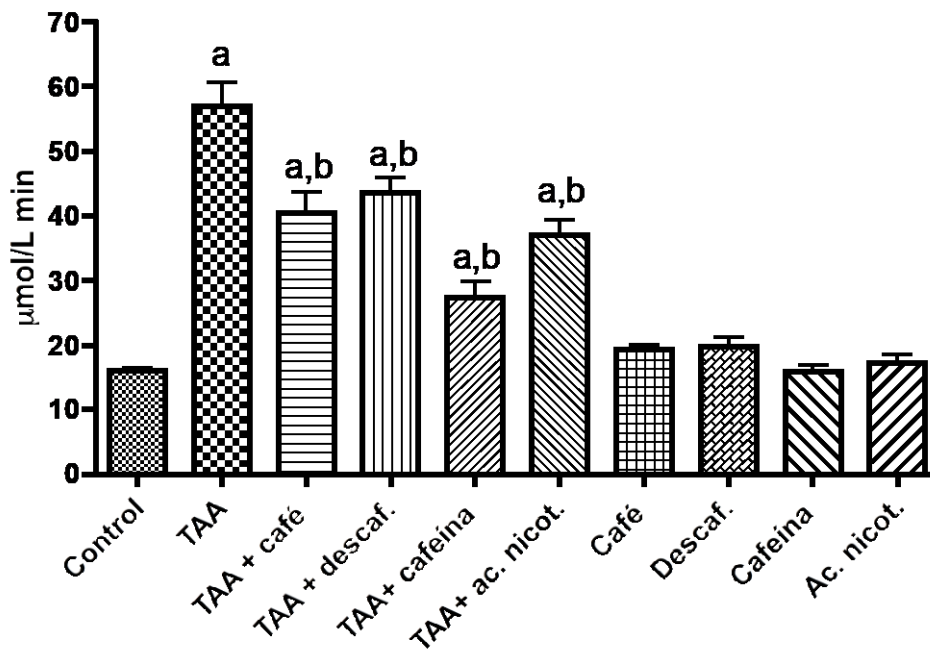


Figura 13. Actividad enzimática de la alanino aminotransferasa, ALT. La actividad de la enzima fueron determinadas en plasma. Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar. a, diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$. b, diferencia significativa con respecto al grupo de TAA $p < 0.05$.

11.2 Actividad enzimática de la FA y γ -GTP.

La figura 14 muestra la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina y de la γ -glutamil transpeptidasa, los cuales son marcadores de daño por colestasis. Para ambas enzimas se encuentran incrementada en su actividad por el tratamiento con TAA durante 8 semanas con respecto al grupo control. Se puede observar la capacidad tanto, del café y café descafeinado, así como de la cafeína y ácido nicotínico de prevenir de manera total la actividad de la γ -GTP. Sin embargo este efecto fue parcial pero de manera significativa para FA.

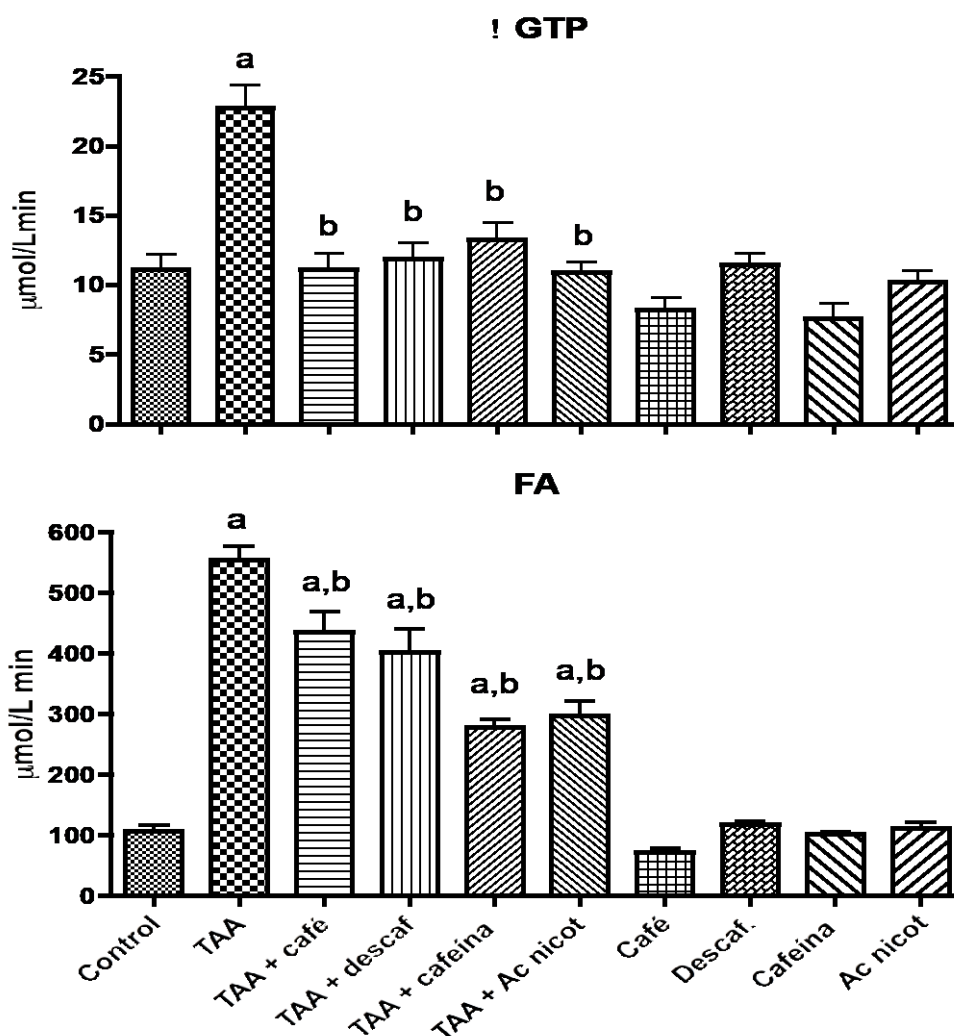


Figura 14. Actividad enzimática de la fosfatasa alcalina, FA y γ -glutamil transpeptidasa, γ -GTP. Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar. a, diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$. b, diferencia significativa con respecto al grupo de TAA $p < 0.05$.

11.3 Contenido de glucógeno hepático.

En la figura 15 se observa como en el grupo de daño por TAA el nivel de glucógeno disminuyó drásticamente al compararse con el grupo control, sin embargo solo se puede apreciar un efecto protector por parte de la cafeína y ácido nicotínico los cuales previnieron la disminución del contenido de glucógeno.

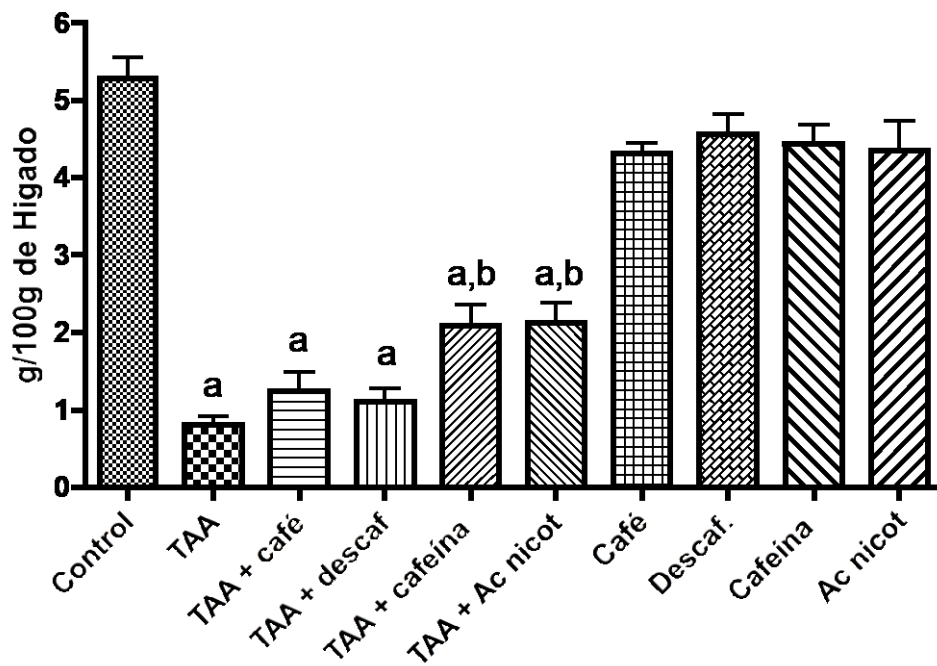


Figura 15. Determinación del contenido de glucógeno.

Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar.

a, diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$.

b, diferencia significativa con respecto al grupo de TAA $p < 0.05$.

11.4 Peroxidación lipídica.

La peroxidación lipídica (figura 16) es un marcador de estrés oxidativo a nivel membranal, el cual se incrementó de manera importante y significativa en el grupo tratado con TAA comparado con el grupo control. Los 2 compuestos y los 2 fármacos fueron capaces de prevenir el incremento de manera total en la producción de MDA, producto de la peroxidación lipídica. Los grupos controles por si solos no muestran ningún efecto.

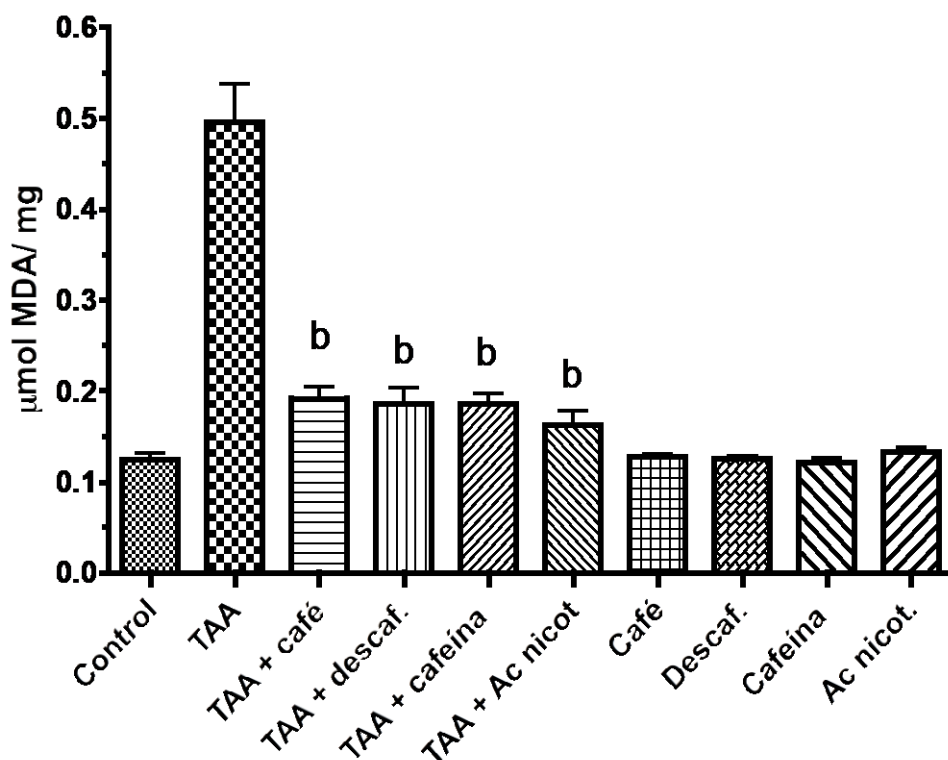


Figura 16. Determinación del grado de peroxidación lipídica.

Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar.

a, diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$.

b, diferencia significativa con respecto al grupo de TAA $p < 0.05$.

11.5 Actividad enzimática de la glutatión peroxidasa (GPx).

La GPx es la enzima responsable de catalizar la reducción del peróxido de hidrogeno, los hidroperóxidos orgánicos y los peróxidos lipídicos utilizando glutatión reducido, protegiendo a las células contra el daño oxidativo. La figura 17 muestra como el grupo de daño disminuye la actividad de esta enzima en comparación con el grupo control. Además observa que tanto el café, café descafeinado, cafeína y ácido nicotínico respectivamente, lograron prevenir parcialmente la disminución de la actividad de la GPx .

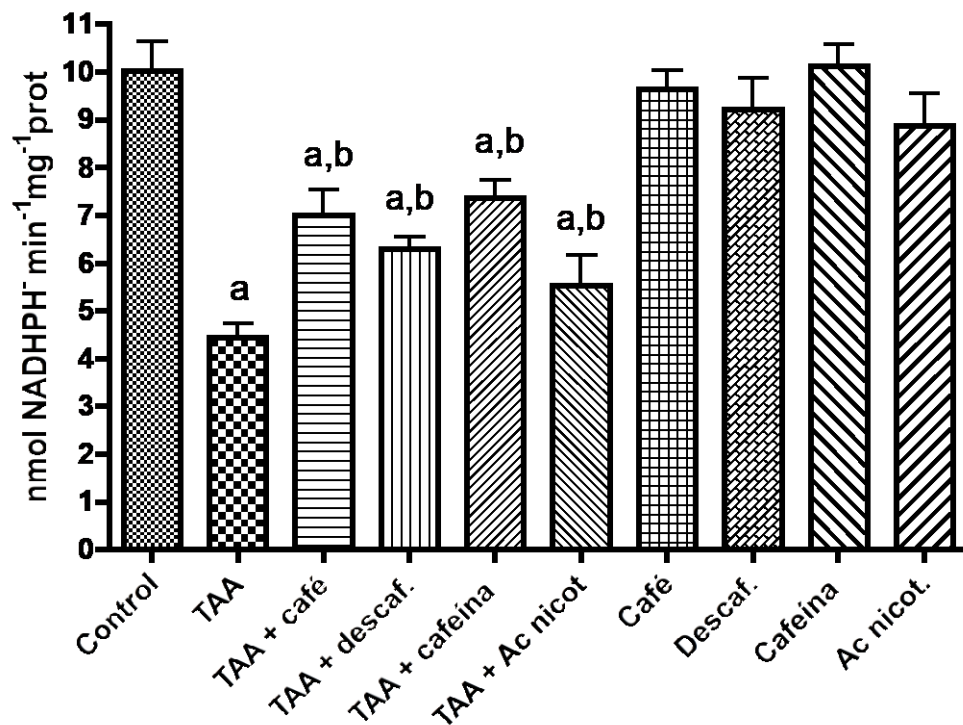


Figura 17. Actividad enzimática de la glutatión peroxidasa.

Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar.

a, diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$.

b, diferencia significativa con respecto al grupo de TAA $p < 0.05$.

11.6 Contenido de colágena.

Uno de los mejores indicadores de daño crónico al hígado es el incremento de la síntesis de colágena, marcador de fibrosis. La figura 18 podemos apreciar que al finalizar el tratamiento de TAA por 8 semanas, se acumula aproximadamente 4 veces la cantidad normal de esta proteína. Para los 4 grupos experimentales encontramos de forma similar que disminuye importantemente la deposición de colágena de manera significativa. La administración de cada uno de los compuestos (café y café descafeinado) y fármacos (cafeína y ácido nicotínico) no tuvieron efecto alguno en este parámetro por si solos.

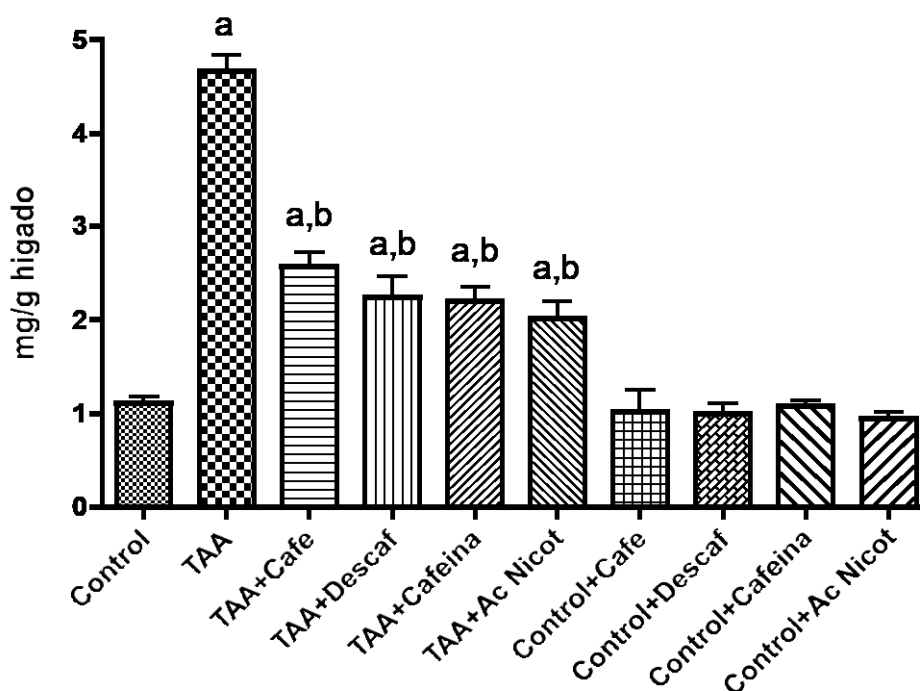


Figura 18. Determinación de los niveles de colágena.

Cada barra representa el promedio de cada grupo \pm el error estándar.

a, diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$.

b, diferencia significativa con respecto al grupo de TAA $p < 0.05$.

Para corroborar los resultados de las pruebas bioquímicas, realizamos 2 tinciones: de eosina y hematoxilina y Tricrómica de Masson en cortes histológicos de hígado de rata de cada uno de los grupos.

En la figura 19 en el panel A y E corresponde a cortes de hígado de grupo control, observamos la arquitectura normal del hígado y la carencia de fibras de colágeno. Por el contrario en los paneles B y F, se muestra claramente la distorsión importante de la arquitectura del parénquima, la presencia de zonas necróticas y finalmente, en color azul podemos apreciar las fibras de colágeno que son características de la fibrosis hepática, esto por el tratamiento crónico de TAA. Los paneles C y G muestran las histologías de los grupos que recibieron tratamiento farmacológico con café, los paneles D y H TAA con café descafeinado. En ellas podemos confirmar los resultados que obtuvimos en la determinación bioquímica del contenido de colágena e incluso de la indicada por la ALT con respecto a la necrosis.

11.7 Histologías de H&E y Tricrómica.

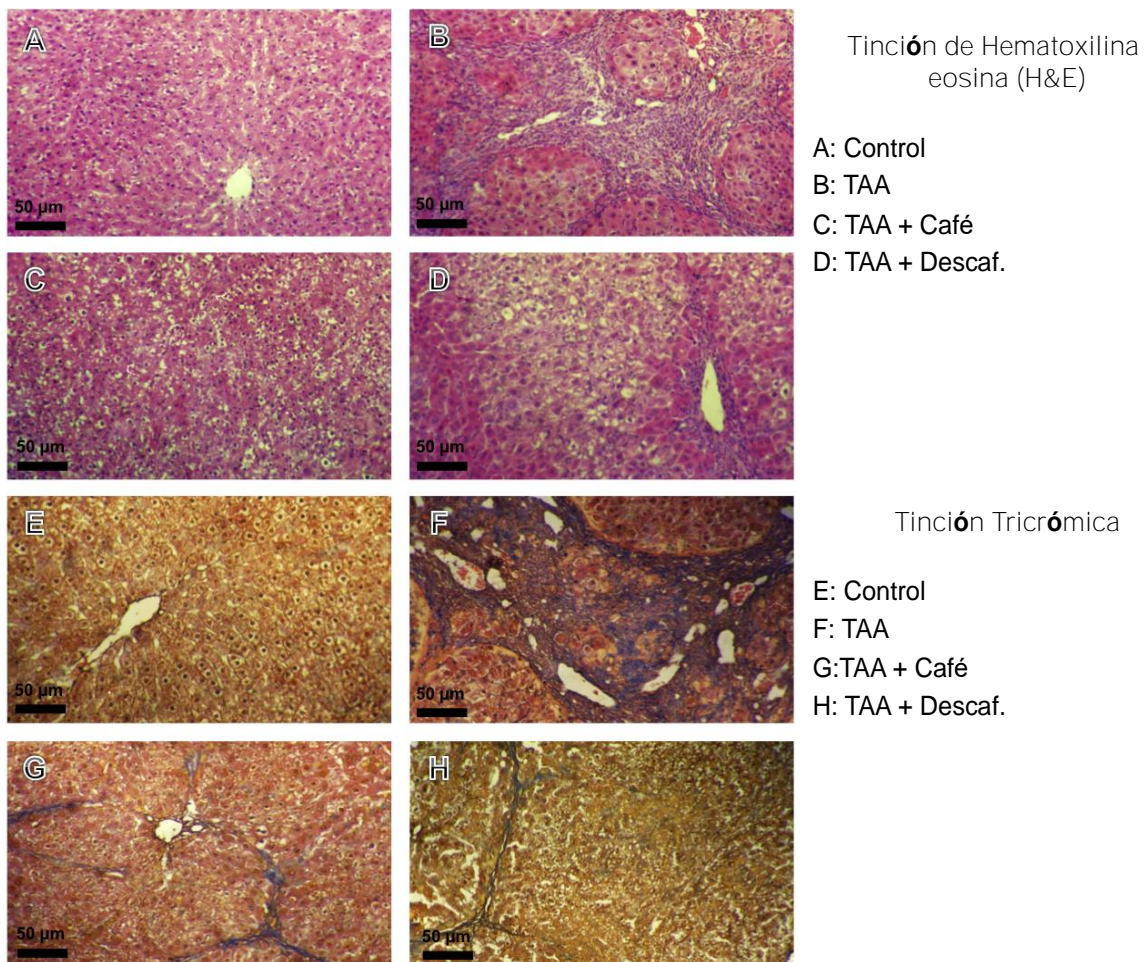
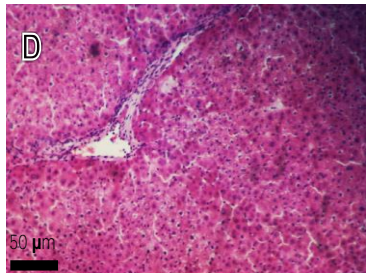
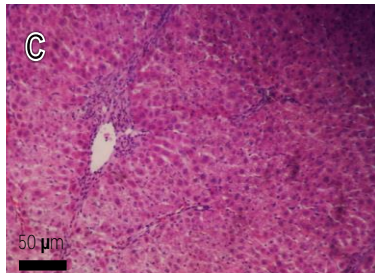
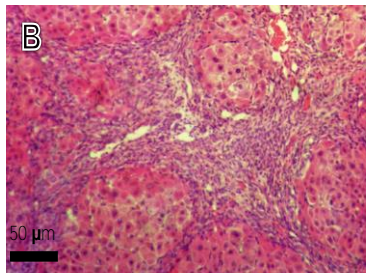
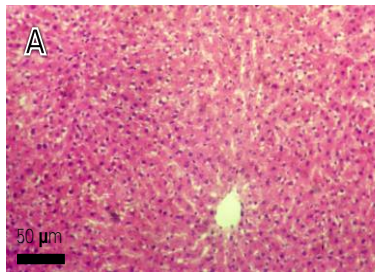


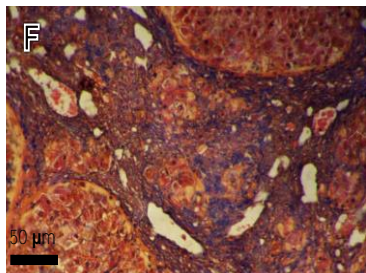
Figura 19. Tinción de H&E (panel A-D) y tricrómica (panel E-H) en cortes histológicos de hígado.

En la figura 20 en los paneles C y G muestran cortes histológicos de hígados tratados con cafeína más TAA y en los paneles D y H ácido nicotínico más TAA respectivamente donde se puede apreciar una disminución de la deposición de matriz extracelular inducida por TAA (panel B y F).



Tinción de Hematoxilina eosina (H&E)

- A: Control
- B: TAA
- C: TAA + Cafeína
- D: TAA + Ac nicotínico



Tinción Tricrómica

- E: Control
- F: TAA
- G: TAA + Cafeína
- H: TAA + Ac nicotínico

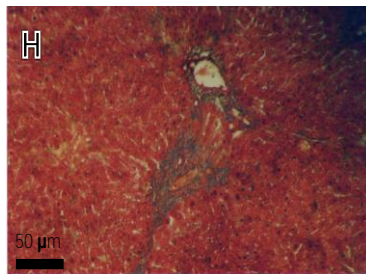
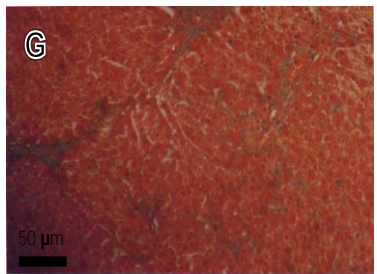


Figura 20. Tinción de H&E y tricrómica en cortes histológicos de hígado.

11.8 Western blot de la citocina TGF- β .

La administración crónica de TAA por 8 semanas logró incrementar significativamente la expresión del TGF- β con respecto al grupo control, sin embargo cuando se administró café (TAA+CC) y café descafeinado (TAA+DC) lograron disminuir el incremento de la expresión de TGF- β (figura 21).

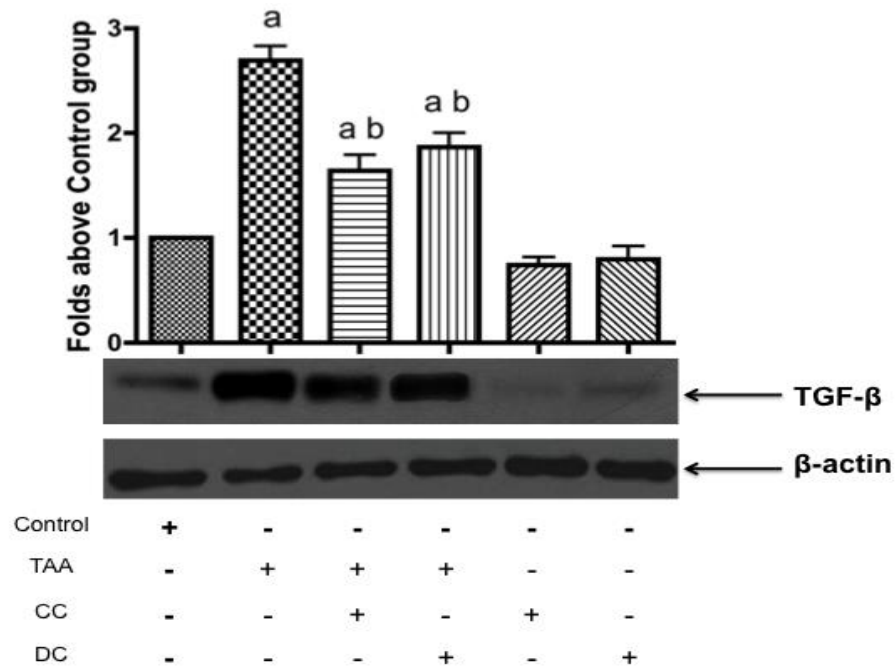


Figura 21. Western blot de la citocina TGF- β .

Los valores son expresados como el incremento de la relación D.O. normalizada con el valor del grupo control (control = 1). Adicionalmente se muestra el control de carga β -actina. Las barras representan el promedio de tres ratas \pm el error estándar.

a, diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$

b, diferencia significativa con respecto al grupo de TAA $p < 0.05$

Por otro lado, de manera interesante el tratamiento farmacológico con ácido nicotínico logro prevenir la sobre expresión del TGF- β de manera significativa, sin embargo el tratamiento con cafeína pudo prevenir de manera total la expresión de la citocina. Se puede apreciar que la cafeína y el ácido nicotínico no tiene efecto por si solo sobre el TGF- β (figura 22).

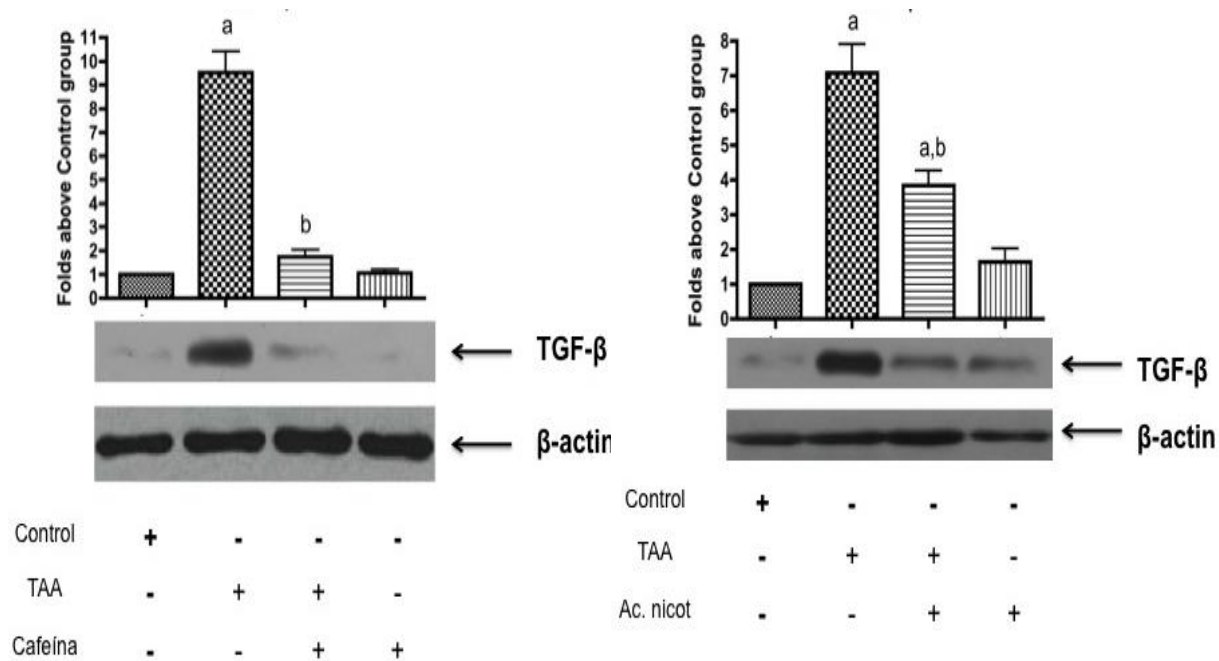


Figura 22. Western blot de la citocina TGF- β , tratamiento con cafeína y ácido nicotínico respectivamente.

Los valores son expresados como el incremento de la relación D.O. normalizada con el valor del grupo control (control = 1). Adicionalmente se muestra el control de carga β -actina. Las barras representan el promedio de tres ratas \pm el error estándar.

a, diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$

b, diferencia significativa con respecto al grupo de TAA $p < 0.05$

11.9 Western blot de la citocina CTGF.

En el grupo de daño se observa aumento de la expresión del CTGF, el cual se ve reflejado a causa del incremento del TGF- β . Se muestra en los grupos experimentales tratados con café (TAA+CC) y café descafeinado (TAA+DC), fueron capaces de prevenir el aumento del CTGF de manera significativa (figura 23).

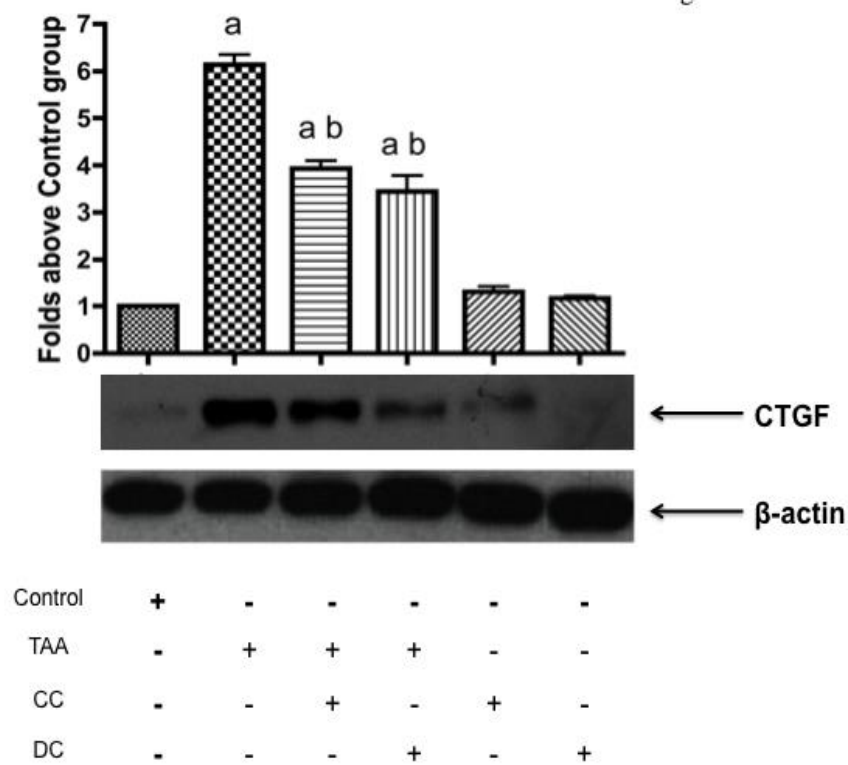


Figura 23. Western blot de CTGF.

Los valores son expresados como el incremento de la relación D.O. normalizada con el valor del grupo control (control = 1). Adicionalmente se muestra el control de carga β -actina. Las barras representan el promedio de tres ratas \pm el error estándar.

a, diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$

b, diferencia significativa con respecto al grupo de TAA $p < 0.05$

De manera interesante el tratamiento con ácido nicotínico logro disminuir la expresión del CTGF de manera significativa, en cambio el tratamiento con cafeína logra prevenir de manera total la expresión del CTGF (figura 24).

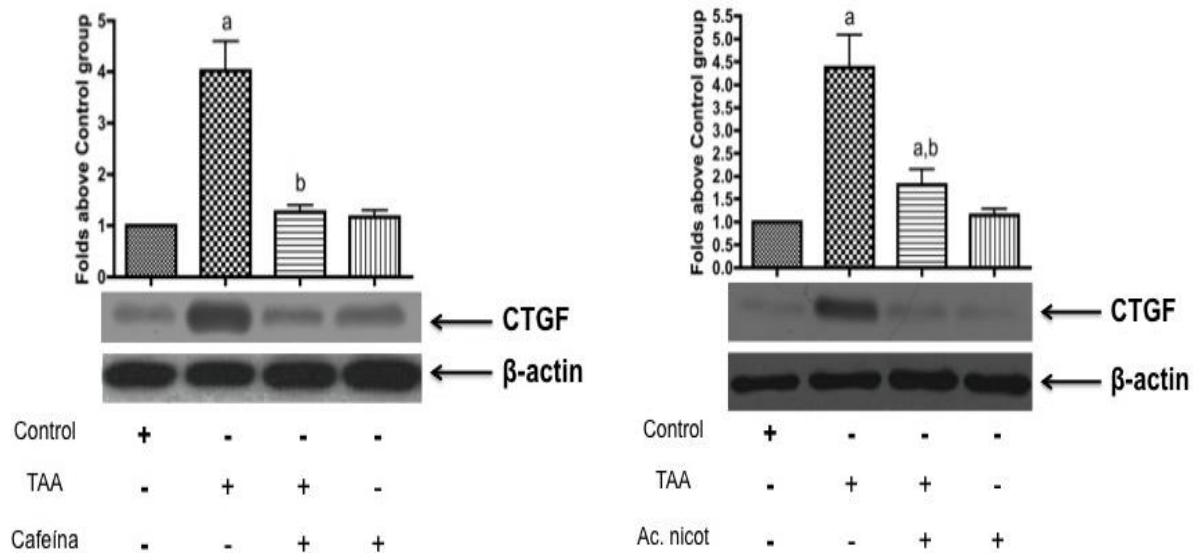


Figura 24. Western blot de la citocina de CTGF, en el tratamiento con cafeína y ácido nicotínico.

Los valores son expresados como el incremento de la relación D.O. normalizada con el valor del grupo control (control = 1). Adicionalmente se muestra el control de carga β-actina. Las barras representan el promedio de tres ratas ± el error estándar.

a, diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$

b, diferencia significativa con respecto al grupo de TAA $p < 0.05$

11.10 Western blot de la citocina α -SMA.

Para la alfa actina del músculo liso (α -SMA), que es una proteína que se expresa primordialmente las CEH cuando se encuentran diferenciadas hacia el fenotipo miofibroblasto. Se muestra que esta proteína se encuentra incrementada de manera significativa en el grupo de daño con respecto al grupo control. Además el tratamiento con café (TAA+CC) y café descafeinado (TAA+DC) fueron capaces de prevenir de manera parcial pero significativa el aumento de la α -SMA (figura 25).

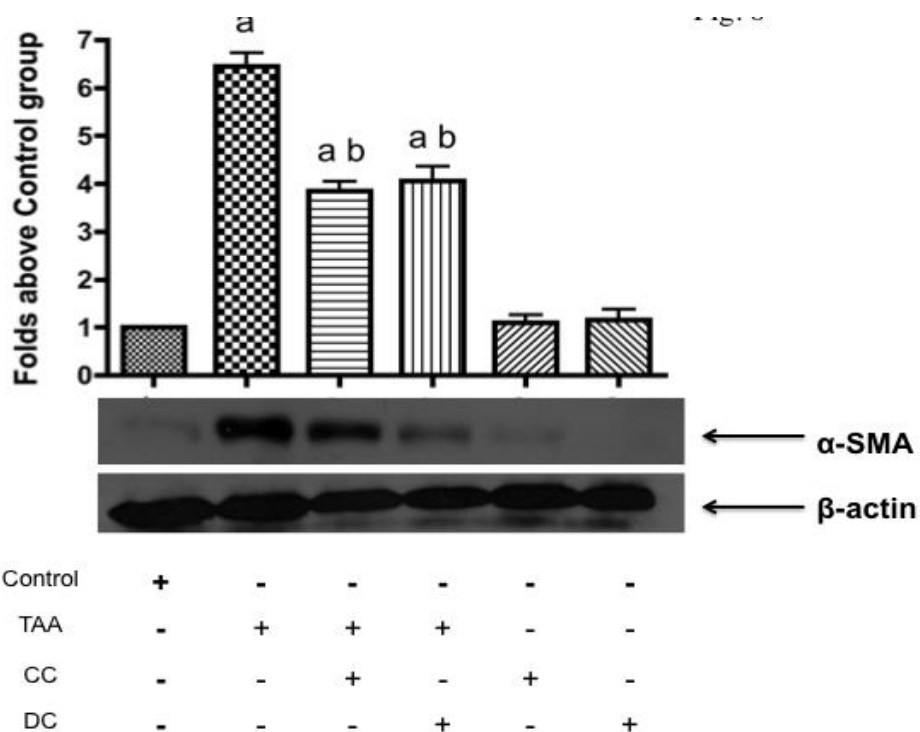


Figura 25. Western blot de la α -SMA.

Los valores son expresados como el incremento de la relación D.O. normalizada con el valor del grupo control (control = 1). Adicionalmente se muestra el control de carga β -actina. Las barras representan el promedio de tres ratas \pm el error estándar.

a, diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$

b, diferencia significativa con respecto al grupo de TAA $p < 0.05$

Interesantemente el tratamiento farmacológico con cafeína disminuyó de forma total la expresión de la α -SMA, de manera similar la administración de ácido nicotínico se observa un reducción de la expresión de esta proteína de manera parcial pero significativa. Se aprecia que la administración de cafeína y ácido nicotínico por si mismos no muestran ningún cambio en esta proteína (figura 26).

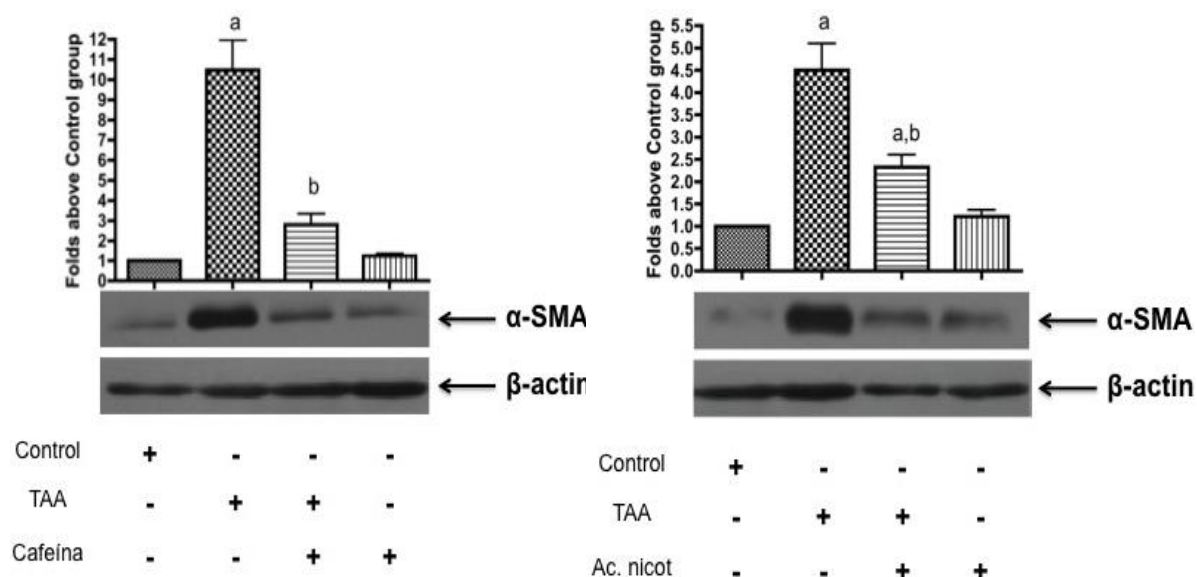


Figura 26. Western blot de la α -SMA, en el tratamiento con cafeína y ácido nicotínico.

Los valores son expresados como el incremento de la relación D.O. normalizada con el valor del grupo control (control = 1). Adicionalmente se muestra el control de carga β -actina. Las barras representan el promedio de tres ratas \pm el error estándar.

a, diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$

b, diferencia significativa con respecto al grupo de TAA $p < 0.05$

11.11 Western blot de la citocina IL-10.

La interleucina (IL-10) es una importante citocina inmunorreguladora que es capaz de inhibir la síntesis de citocinas proinflamatorias producidas por macrófagos y células T. Se puede observar en el grupo de daño un incremento significativo con respecto al control, pero al administrar tanto café como café descafeinado, logran disminuir la expresión de la IL-10 de manera parcial pero significativa (figura 27).

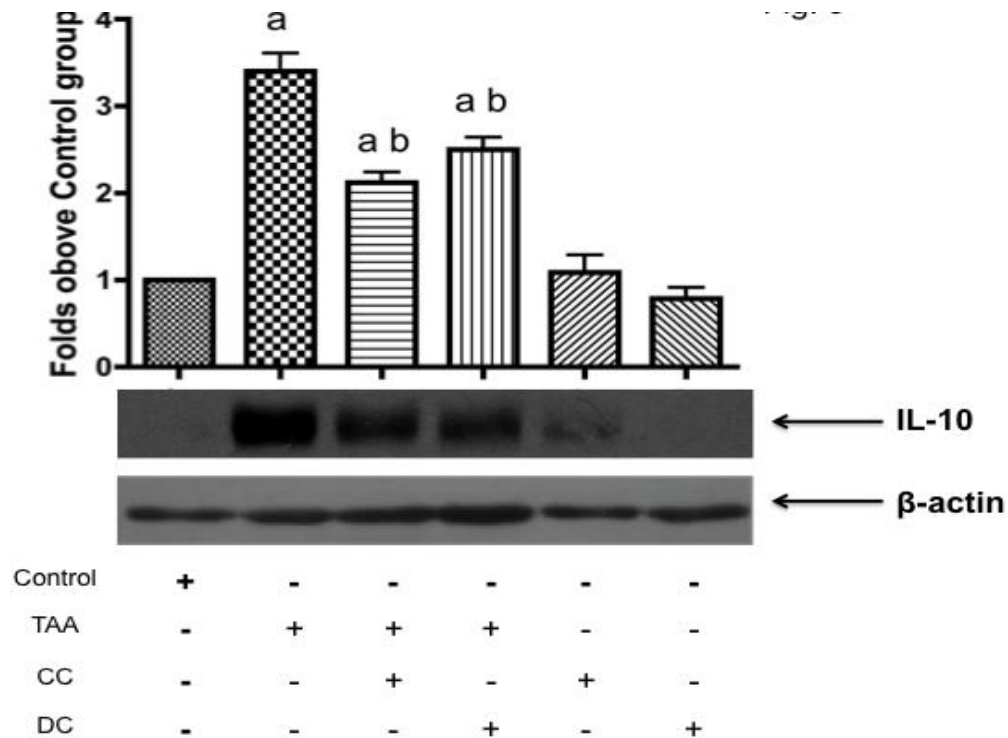


Figura 27. Western blot de la IL-10.

Los valores son expresados como el incremento de la relación D.O. normalizada con el valor del grupo control (control = 1). Adicionalmente se muestra el control de carga β -actina. Las barras representan el promedio de tres ratas \pm el error estándar.

a, diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$

b, diferencia significativa con respecto al grupo de TAA $p < 0.05$

Interesantemente la administración de cafeína logró prevenir de manera total la expresión de la IL-10 producida por TAA (TAA+cafeína). La cafeína por sí sola no muestra actividad en esta proteína (figura 28).

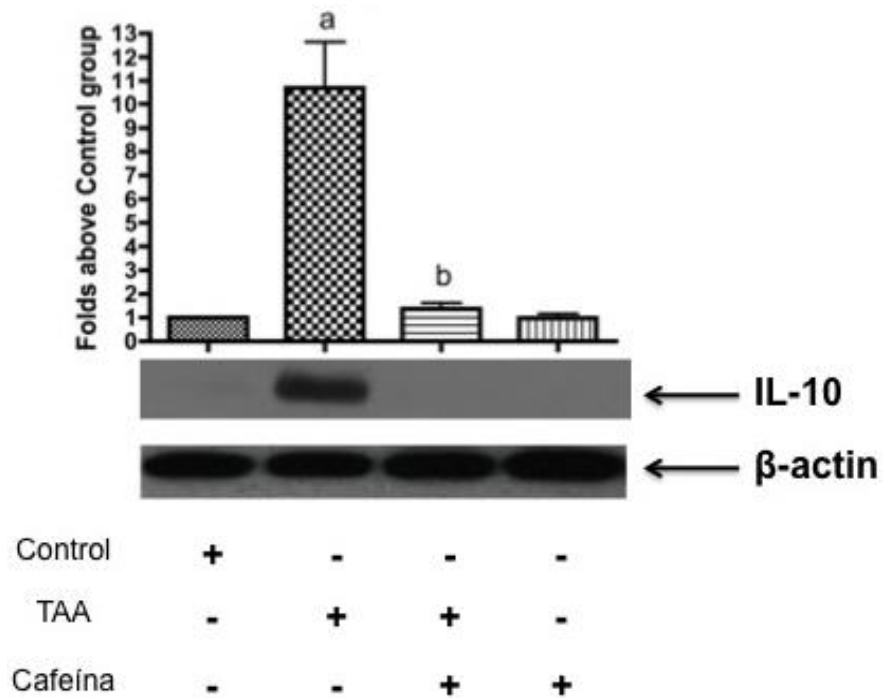


Figura 28. Western blot de la IL-10.

Los valores son expresados como el incremento de la relación D.O. normalizada con el valor del grupo control (control = 1). Adicionalmente se muestra el control de carga β -actina. Las barras representan el promedio de tres ratas \pm el error estándar.

a, diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$

b, diferencia significativa con respecto al grupo de TAA $p < 0.05$

11.12 Western blot de la citocina MMP-13.

La metaloproteinasa 13 (MMP-13) es una enzima encargada de la remodelación de la MEC, principalmente en la degradación de colágena. Se puede apreciar que el tratamiento crónico con TAA promueve la expresión de esta enzima con respecto al grupo control, debido al daño inducido por la hepatotoxina, sin embargo en los grupos donde se administró café (TAA+CC) y café descafeinado (TAA+DC) se observa que hubo una disminución de la expresión MMP-13 de manera parcial pero significativa (figura 29).

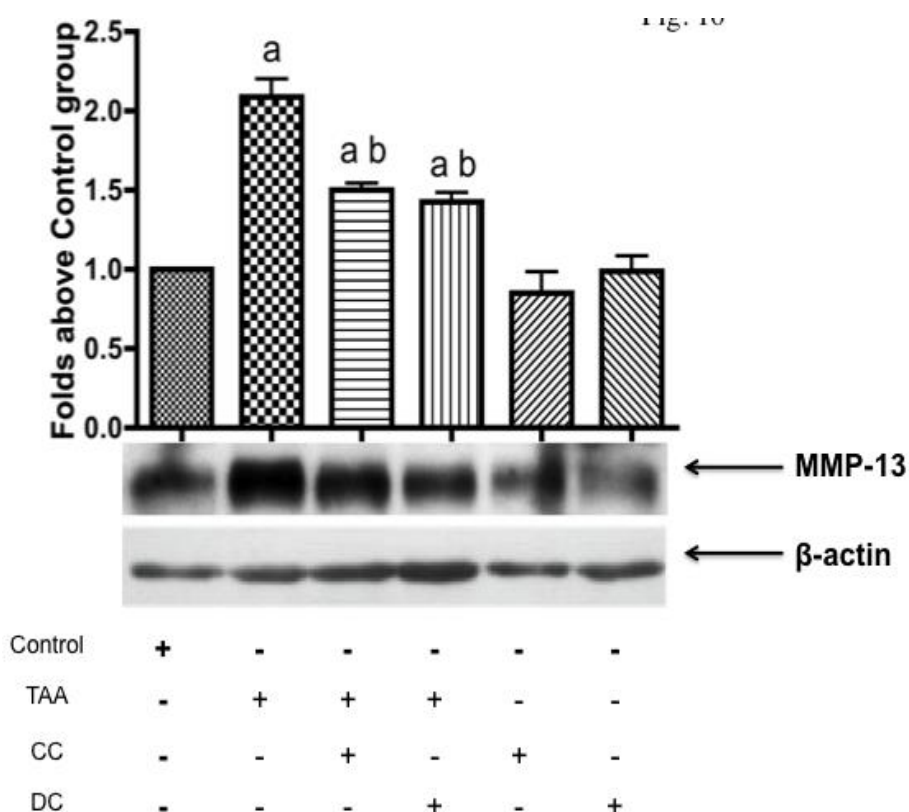


Figura 29. Western blot de la MMP-13.

Los valores son expresados como el incremento de la relación D.O. normalizada con el valor del grupo control (control = 1). Adicionalmente se muestra el control de carga β -actina. Las barras representan el promedio de tres ratas \pm el error estándar.

a, diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$

b, diferencia significativa con respecto al grupo de TAA $p < 0.05$

11.13 Actividad de las MMP-2 y 9.

La actividad gelatinolítica de la MMP-2 y MMP-9 fueron analizadas mediante zimografía (figura 30). Se observa que en grupo administrado con TAA aumenta la actividad de la MMP2 y MMP-9 en comparación al grupo control. Sin embargo, los grupos que se les administro café (TAA+CC y TAA+DC) lograron disminuir la secreción y por tanto la actividad de estas MMPs.

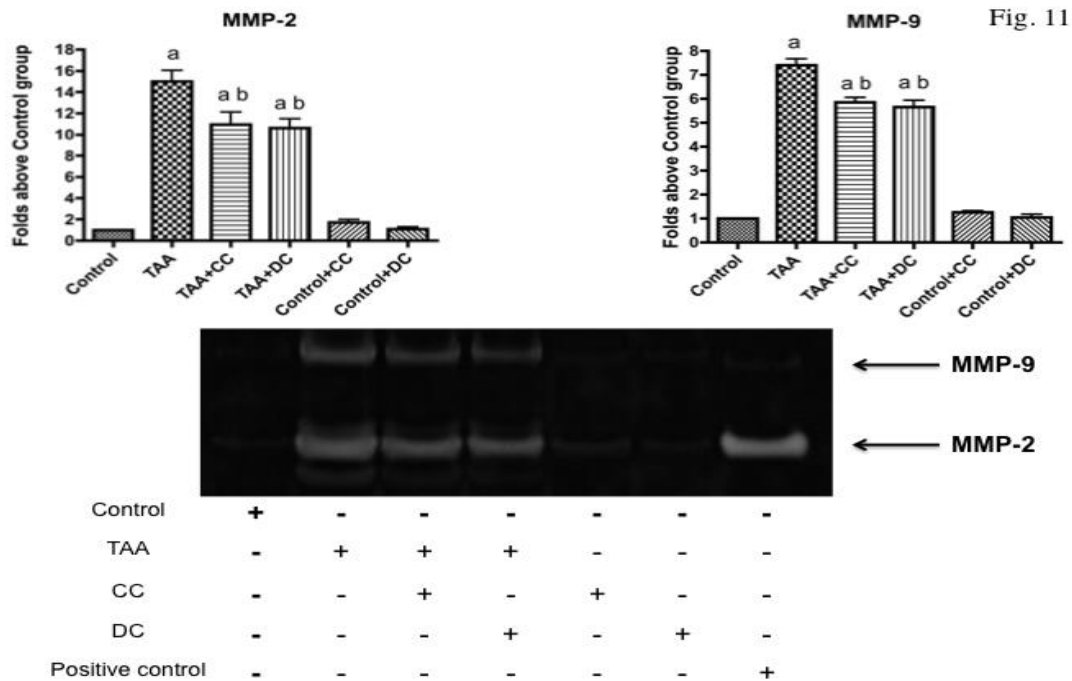


Figura 30. La actividad de las metaloproteinasas de matriz MMP-2 y MMP-9. Fueron analizadas por zimograma usando como substrato en el gel, gelatina. Muestras de hígado fueron analizadas del grupo de ratas control, grupo de ratas tratadas TAA, grupo de TAA + café (TAA+CC), grupo de TAA+café descafeinado (TAA+DC) y los grupos tratados con café (CC) o café descafeinado (DC) solos. Un control positivo para la zimograma se obtuvo a partir de cultivos confluentes de células MCF10A tratados con 400 mg dl⁻¹ de etanol durante 25 h. Los valores son expresados como el incremento de la relación D.O. normalizada con el valor del grupo control (control = 1). Las barras representan el promedio de 3 ratas ± el error estándar. a, diferencia significativa con respecto al control p<0.05, b, diferencia significativa con respecto al grupo de TAA p<0.05

En cambio con el tratamiento farmacológico con cafeína (TAA+cafeína) se observa que la actividad de la MMP-9 disminuye de manera parcial pero significativa con respecto al grupo de daño (TAA), por otra parte, la cafeína disminuye de manera importante la actividad de la MMP-12. La cafeína por sí sola no produce ningún cambio en la actividad de las MMPs (figura 31).

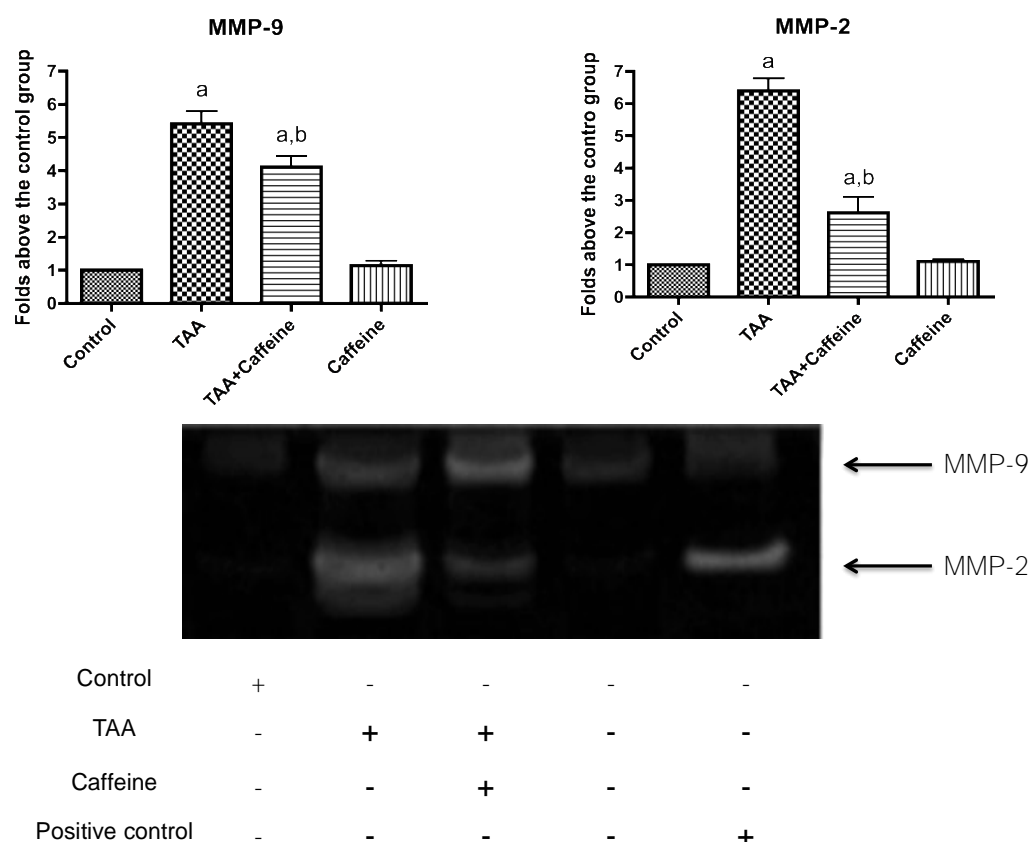


Figura 31. La actividad de las metaloproteinasas de matriz MMP-2 y MMP-9. Fueron analizadas por zimograma usando como sustrato en el gel, gelatina. Muestras de hígado fueron analizadas del grupo de ratas control, grupo de ratas tratadas con TAA, grupo de TAA + café (TAA+CC), grupo de TAA+café descafeinado (TAA+DC) y los grupos tratados con café (CC) o café descafeinado (DC) solos. Un control positivo para la zimograma se obtuvo a partir de cultivos confluentes de células MCF10A tratados con 400 mg dl⁻¹ de etanol durante 25 h. Los valores son expresados como el incremento de la relación D.O. normalizada con el valor del grupo control (control = 1). Las barras representan el promedio de 3 ratas ± el error estándar. a, diferencia significativa con respecto al control p<0.05, b, diferencia significativa con respecto al grupo de TAA p<0.05

11.14 Ensayo de RT-PCR para TGF- β , CTGF, α -SMA, Col α 1 y TIMP-1.

El tratamiento crónico de TAA durante 8 semanas aumento los niveles de RNA mensajero (RNAm) de TGF- β , CTGF, α -SMA, Col α 1 y TIMP-1. Al administrar cafeína (T+C) se observa que disminuyen los niveles de RNAm de TGF- β , CTGF, α -SMA y Col α 1, sin embargo no hubo ningún efecto en el TIMP-1 (figura 32).

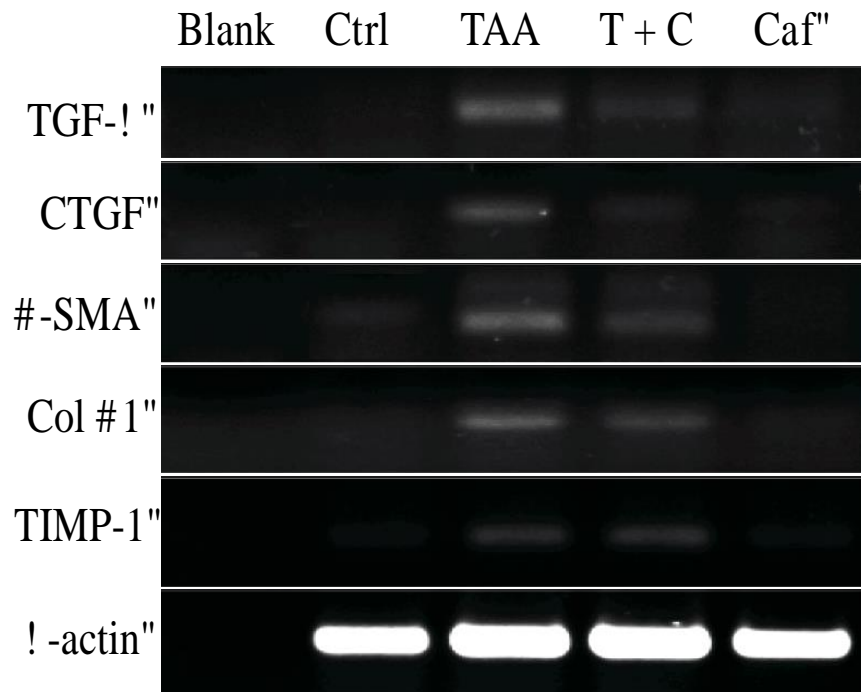


Figura 32. Ensayo de RT-PCR para TGF- β , CTGF, α -SMA, Col α 1 y TIMP-1.

13. DISCUSIÓN.

La mayoría de los estudios sobre los efectos del consumo del café en la salud de los seres humanos han sido de tipo observacional. Las preocupaciones sobre los posibles riesgos para la salud ocasionados por el consumo del café y la cafeína que plantean diversas investigaciones epidemiológicas en el pasado, probablemente fueron exacerbados por las asociaciones entre el consumo elevado de café y conductas no saludables, tales como el tabaquismo y la inactividad física [Willet y cols, 1996].

En este trabajo nos centramos en los efectos en el consumo del café sobre las enfermedades del hígado, en el cual se muestra que el café previene la fibrosis experimental inducida por TAA, donde probablemente los compuestos como cafeína y ácido nicotínico juegan un papel muy importante. El mecanismo de acción se debe a sus propiedades antioxidantes, pero principalmente por el bloqueo de la citocina profibrogénica TGF- β y esta a su vez disminuye la expresión de su mediador río abajo el CTGF trayendo como consecuencia una atenuación del proceso inflamatorio.

Las principales causas de la fibrosis / cirrosis hepática incluyen el abuso en el consumo de alcohol, infecciones a causa de virus de hepatitis B o C, colestasis y esteatohepatitis no alcohólica. La cirrosis es la consecuencia final de la fibrosis la cual se caracteriza por la formación de nódulos de regeneración y con función hepática alterada. La fibrosis hepática resulta del daño crónico y a la capacidad del hígado para regenerarse, los hepatocitos son sustituidos por MEC. La alteración de la cantidad y composición de la MEC es una característica de la mayoría de las enfermedades hepáticas crónicas [Bataller y Brenner, 2005]. Diversos estudios demuestran que la respuesta fibrogénica en el hígado es altamente regulada por el TGF- β , ya que altera el equilibrio normal entre la síntesis y la degradación de los componentes de la MEC, el cual promueve un aumento en la síntesis aunado paralelamente con un descenso en la actividad proteolítica general de la MEC [Wells, 2000]. El TGF- β promueve la diferenciación de las HSCs a tipo miofibroblasto los cuales aumentan la síntesis de proteínas de MEC [Gressner et al., 2002].

En este estudio se muestra que el café y el café descafeinado inhibieron parcialmente, pero de manera significativa, el aumento de la expresión de TGF- β producida por la administración crónica de TAA y como consecuencia previnieron la fibrosis hepática. Sin embargo el café es una mezcla de miles de compuestos, donde cualquiera de ellos son responsables de tener actividad farmacológica. Desde el punto de vista de concentración del café y sus metabolitos activos se ha reportado que la cafeína, los diterpenos (cafestol y kahweol), ácido nicotínico y otros polifenoles presentan efectos fisiológicos [McCusker et al., 2003]. Por otro lado, al administrar ácido nicotínico y cafeína se observa una disminución significativa de la expresión del TGF- β , sin embargo, este efecto se mostró más acentuado con la cafeína ya que esta disminuyó los niveles de RNAm para esta proteína.

Recientemente se ha reportado que los hepatocitos son células que participan activamente en el proceso fibrogénico, además de las HSC. Se mostró que los hepatocitos son la fuente principal de síntesis de factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), estos experimentos se realizaron en cultivo como daño hepático, además se encontró que el CTGF es sobre regulado por el TGF- β 1, y estos hepatocitos son la principal fuente de CTGF [Weng y cols, 2007; Gressner y cols, 2008]. El CTGF se propuso entonces como un importante modulador río abajo del TGF- β , lo que amplifica la acción profibrogénica de esta citocina en el hígado y en otros tejidos. El papel crucial del CTGF en la fibrogenesis se muestra por una importante sobre regulación de ECM en hígados fibróticos [Leask y Abraham 2006].

Al administrar TAA se observa un incremento significativo de la expresión del CTGF de manera significativa respecto al grupo control, por otra parte, cuando se administró el café y café descafeinado estos disminuyen la expresión de esta proteína. De manera similar el tratamiento farmacológico con ácido nicotínico y cafeína bloquea la expresión del CTGF, donde los efectos positivos más marcados se muestran con la cafeína al reducir los niveles de RNAm del CTGF.

Interesantemente el mono fosfato de adenosina cíclico (AMPc) se identificó como un inhibidor del CTGF debido a la inducción del TGF- β , y la cafeína y otras metilxantinas son bien conocidos por elevar los niveles de AMPc intracelular mediante la inhibición de la actividad de fosfodiesterasa [Duncan y cols, 1999].

En conjunto, esta información proporciona evidencia molecular que indica que el café, en este caso cafeína, puede constituir una molécula útil para la lucha contra la fibrosis y la cirrosis. Gressner y cols, (2008a) investigaron el efecto de la cafeína sobre el CTGF como un modulador profibrogénico de las acciones inducidas por el TGF- β . Estos investigadores encontraron que la cafeína inhibe la expresión del CTGF en las células hepáticas debido a la inducción de la degradación proteasomal de Smad 2 y por la inhibición de la fosforilación de Smad 3 y 1, además por la sobre regulación de la expresión del receptor de peroxisoma-proliferador- activado gamma (PPAR γ) [Gressner et al., 2008a, 2008b].

En un hígado normal, las HSCs tienen tres funciones fisiológicas principales: almacenamiento de vitamina A, producción de MEC en el espacio de Disse y también posee un papel en la regulación del flujo de la microcirculación sinusoidal. Por otra parte, en respuesta al daño hepático las HSCs se someten a un proceso de "activación" el cual se caracteriza por la proliferación y la transformación a miofibroblastos principalmente inducida por el TGF- β . En respuesta a su activación, las HSCs muestran un aumento de la expresión de la α -SMA en el citoplasmática [Geerts, 2001; Safadi y Friedman, 2002].

La α -SMA es una isoforma de actina y un marcador específico de la diferenciación celular del músculo liso. Por lo tanto, la expresión de la α -SMA ha sido utilizada para identificar las HSCs activadas que muestran un fenotipo miofibroblástico [Carpino y cols, 2005;. Schmitt y cols, 1991]. Nuestros resultados muestran un aumento en la expresión de α -SMA en el grupo tratado con TAA indicándonos así que la administración TAA promueve la activación de las CEH. En cambio los grupos que fueron tratados con café y café descafeinado, disminuyeron la expresión de la α -SMA de manera parcial pero significativa.

Sin embargo, el ácido nicotínico y la cafeína fueron capaces de prevenir el aumento de la expresión de la α -SMA. Interesantemente la cafeína reduce los niveles de RNAm de la α -SMA. Los resultados muestran que el café y particularmente la cafeína y el ácido nicotínico previenen la transformación de las CEH.

Las HSC juegan un papel crucial en la fibrosis hepática, porque en respuesta al daño hepático pierden su capacidad de almacén de vitamina A la cual se somete a cambios funcionales y morfológicos la cual es un proceso complejo llamado "activación". Este proceso es caracterizado por una alta proliferación celular y transformación a miofibroblastos. Una vez activadas las HSC aumentan la síntesis de colágeno fibrilar (colágeno tipo I y tipo III) y son el principal tipo de células que produce MEC en el tejido del hígado dañado [Consolo y cols, 2009]. Una de las características de la fibrosis hepática es un aumento de la MEC. En este trabajo se muestra que al administrar TAA por 8 semanas aumenta la deposición de colágena con respecto al grupo control, pero al administrar café disminuyen los niveles de colágena estos efectos pueden ser atribuidos a la cafeína, la cual también previene el aumento de colágena. De manera similar el café descafeinado disminuye la síntesis de colágena inducida por TAA, sugiriendo esto que otros compuestos además de la cafeína juegan un papel muy importante en la disminución de la fibrogenesis. Por otra parte, interesantemente el ácido nicotínico tiene la capacidad de prevenir el aumento de la síntesis de colágena.

El incremento de la síntesis de MEC por parte de las HSC una vez que son activadas se debe a un incremento en la expresión de metaloproteinasas de matriz (MMPs) y sus inhibidores (TIMPs). Las MMPs son una familia multi-dominio de endopeptidasas dependientes de zinc las cuales degradan diferentes componentes estructurales de la MEC y muchas moléculas bioactivas (Butler y cols, 1998). La adecuada regulación de la degradación y la síntesis de la MEC es esencial para el mantenimiento de la homeostasis en respuesta al daño del tejido, y un desequilibrio en la expresión de los TIMPs y las MMPs que están presentes en el daño hepático y la fibrosis inducida por compuestos hepatotóxicos [Consolo y cols, 2009].

La administración de TAA promueve la síntesis de matriz extracelular, la cual fue prevenida por la administración de café y de algunos de sus componentes (ácido nicotínico, y cafeína). La cafeína disminuyó los niveles de RNAm de colágena tipo 1. Estos datos fueron corroborados por los estudios histopatológicos, ya que al realizar las tinciones (H y E y Tricrómica) de los cortes histológicos del grupo tratado con TAA nos muestra una deposición excesiva de matriz extracelular, la cual fue disminuida por el café y café descafeinado, así también por la cafeína y el ácido nicotínico.

El ensayo por zimografía muestra un incremento en la actividad enzimática de la MMP-2 y de la MMP-9 en el grupo tratado con TAA respecto al grupo control, sin embargo, los grupos que tratados con café y café descafeinado respectivamente muestran una disminución en la actividad enzimática tanto de MMP-2 y de la MMP-9. Este mismo efecto mostraron los grupos tratados con ácido nicotínico y cafeína los cuales disminuyeron la actividad de éstas MMPs inducidas por la administración de TAA, donde de manera notable disminuyó la actividad enzimática de la MMP-2 para ambos casos. De manera similar este efecto se observó en el ensayo de Western blot para la MMP-13.

El aumento de los niveles de RNAm para TIMP-1 se observó en el grupo de TAA, sin embargo los componentes del café no tuvieron ningún efecto. Nuestros resultados apoyan lo mostrado por Park y cols, [2010], quienes observaron que la TAA provoca un aumento en la expresión de las MMP y los inhibidores (TIMPs). Por lo tanto, la disminución de la actividad de las MMPs puede estar vinculada a la atenuación de los procesos inflamatorios y fibróticos.

En la mayoría de los tejidos incluyendo el hígado, la producción constitutiva de citocinas se encuentra ausente o es baja. Sin embargo, estímulos fisiológicos y patológicos activan a diversas células, para producir estas moléculas efectoras que pueden viajar a su célula diana por vía autocrina, paracrina y endocrina, y a su vez, orquestan la respuesta al estímulo [Dinarello, 1996].

Las citocinas son mediadores de diversos estímulos en el hígado como la inflamación, la muerte celular, colestasis y fibrosis, pero, paradójicamente, también son mediadores en la regeneración del hígado después de una lesión [Friedman, 2000; Tilg y Diehl, 2000]. La IL-10 es producida por linfocitos del tipo Th2, así como por monocitos, macrófagos y diversos tipos celulares. Es una citocina inmunosupresora por excelencia, inhibiendo la síntesis de muchas otras citocinas, la cual regula a la baja la respuesta proinflamatoria y tiene un efecto modulador sobre la fibrogénesis hepática [Hung, 2005].

Los presentes datos muestran que la expresión de la IL-10 se redujo significativamente cuando se administró café entero y café descafeinado en comparación con el grupo de TAA. Interesantemente la cafeína bloquea la expresión de manera total de la IL-10 inducida por TAA. Esto sugiere que el café previene el proceso de inflamación hepática.

En este estudio, se utilizó el modelo de daño hepático inducido por la administración crónica de TAA. Este modelo induce la fibrosis/cirrosis asociada con la muerte de hepatocitos y la activación de las células de Kupffer (KC) y HSCs. Además, se caracteriza por la elevación de las enzimas hepáticas tales como ALT, FA y γ -GTP [Hung, 2005; Natarajan y cols, 2006; Park y cols, 2010]. Varios estudios muestran un posible efecto favorable entre el consumo del café en la función hepática y las enfermedades del hígado, los cuales se han acumulado en las últimas dos décadas.

Estos estudios abarcan; desde una reducción en los niveles de las enzimas hepáticas, disminución en la probabilidad de desarrollar cirrosis y hepatocarcinoma, y por lo tanto constituyen una muestra de datos epidemiológicos, así como evidencias biológicas y clínicas [La Vecchia, 2005]. Interesantemente, la administración de café y café descafeinado previene significativamente la muerte de los hepatocitos, como puede verse por la reducción de la actividad de ALT. Además previene el daño colestásico como puede verse por la disminución de los niveles de FA y γ -GTP. De manera similar el ácido nicotínico y la cafeína muestran estos mismo efectos.

Investigaciones recientes han demostrado que el café es una fuente de antioxidantes en la dieta. Los antioxidantes pueden mejorar la calidad de vida, ayudando a prevenir o retrasar la aparición de enfermedades degenerativas. Los antioxidantes previenen el daño a los tejidos mediante la reducción o eliminación de especies reactivas de oxígeno. El café es rico en compuestos fenólicos (por ejemplo, ácido clorogénico, ácido cafeico), cafestol, kahweol, ácido nicotínico y cafeína, los efectos que se han mostrado in vitro son propiedades antioxidantes y anti-mutagénicas [Sanchez y cols, 2005].

Las especies reactivas de oxígeno (como H_2O_2 , OH^\bullet , O_2^\bullet , conocidos colectivamente como ROS) desempeñan importantes funciones fisiológicas y también puede causar grandes daños celulares. El estrés oxidativo es el resultado de un desequilibrio entre la generación de las ROS y las defensas antioxidantes de la célula, afecta a los principales componentes celulares, incluyendo a los lípidos, proteínas y ADN. Este fenómeno está estrechamente asociado con muchas enfermedades degenerativas, incluyendo las patologías del hígado [Cesaratto y cols, 2004]. La fibrosis hepática está asociada con el consumo crónico del alcohol, así como con la infección de virus de la hepatitis B o C, ambos agentes etiológicos inducen un aumento en la producción de las ROS independiente y sinérgicamente. Además, las ROS participan en el desarrollo de la fibrosis / cirrosis hepática en estas condiciones patológicas [De Minicis y Brenner, 2008; Perlemuter y cols, 2003].

Las células han desarrollado sistemas antioxidantes eficientes para prevenir el aumento de las ROS y prevenir el estrés oxidativo.

Un ejemplo de esto es la GPx, que es un antioxidante endógeno. En este trabajo decidimos determinar la actividad de esta enzima, el grupo que fue administrado con TAA disminuyó la actividad de GPx de manera significativa respecto al grupo control. Por otra parte, cuando se utiliza café y café descafeinado se observó una prevención en la disminución de la actividad de esta enzima. El mismo efecto se mostro al administrar ácido nicotínico y cafeína.

El daño inducido por TAA causa un aumento significativo en los niveles de MDA, uno de los principales productos de la peroxidación lipídica provocado por el aumento del estrés oxidativo. Del mismo modo el café y sus compuestos (ácido nicotínico y cafeína) disminuyeron los niveles de MDA, mostrando de esta manera una reducción del estrés oxidativo a nivel membranal.

Los resultados presentados aquí proporcionan información básica que puede explicar los efectos benéficos observados en los ensayos clínicos que muestran correlaciones inversas entre el consumo de café y las enfermedades del hígado.

Resumen de resultados.

1. La administración de café previene la fibrosis hepática inducida por TAA. Por lo tanto se puede inferir que la cafeína juega un papel importante en la prevención de daño hepático.
2. Sin embargo otros compuestos además de la cafeína juegan un papel importante en la prevención de la fibrosis, lo cual se observó al administrar café descafeinado, donde el ácido nicotínico mostro poseer propiedades hepatoprotectoras.
3. El café posee propiedades antioxidantes las cuales juegan un papel importante en la prevención del daño hepático, estas propiedades pueden ser atribuidas principalmente a la acción de la cafeína y al ácido nicotínico, los cuales mostraron capacidades antioxidantes.
4. El bloqueo de la expresión de la citocina profibrogénica TGF- β por parte del café, resulta en una atenuación de los procesos de inflamación y fibrogenesis. En el cual la cafeína y ácido nicotínico bloquearon la expresión de esta citocina. Este bloqueo del TGF- β trae como consecuencia la reducción de la expresión del CTGF, el cual es un mediador río abajo que en gran medida amplifica los procesos inflamatorios y fibrogénicos inducidos por el TGF- β . Esto a su vez reduce la activación y proliferación de las HSC y como consecuencia disminuye la expresión de citocinas inflamatorias. Por lo tanto, esta reducción en los niveles de TGF- β puede estar vinculada a la atenuación de los procesos inflamatorios y fibróticos.

13. CONCLUSIONES.

Los presentes resultados muestran claramente que el café tiene un papel hepatoprotector en el modelo de la fibrosis hepática inducida por TAA. Además, se proporcionan pruebas sobre su mecanismo de acción, mediante la reducción de la citocina profibrogénica TGF- β , esto da como resultado una disminución en la expresión del CTGF, y a su vez una reducción en la proliferación y activación de las HSCs y una disminución de la expresión de citocinas proinflamatorias. Por lo tanto, la reducción en los niveles de TGF- β puede estar vinculada a la atenuación de los procesos inflamatorios y fibróticos.

Por otra parte la cafeína desempeña un papel muy importante en la prevención del daño inducido por TAA. Sin embargo, otros compuestos contenidos en el café pueden tener propiedades benéficas en el hígado, tales como el cafestol, kahweol etc. En este trabajo se observó que el ácido nicotínico también muestra efectos hepatoprotectores, esto se observó cuando se utilizó el café descafeinado.

Sin embargo, es difícil proporcionar una orientación clara en cuanto a la "dosis de café" necesario para obtener estos efectos benéficos ya que el método de preparación del café, por ejemplo, si es filtrada o hervida, y el tipo de granos de café puede cambiar considerablemente con el tiempo y variar geográficamente.

14. BIBLIOGRAFIA

- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J. Clin. Invest.* 2005; 115: 209–218.
- Bacon D y Di Bisceglie M. *Liver Disease. Diagnosis and Management.* Churchill Livingstone, New York, 2000.
- Benoit S, Christophe C, Angelika T, Anne C. Health effects and safety considerations. In *Coffee Recent Developments, Agricultural Series*, Clarke RJ, Vitzthum OG (eds) 2001. Pag:165–183.
- Carmona-Cuenca I, Roncero C, Sancho P, y cols. Upregulation of the NADPH oxidase NOX4 by TGF-beta in hepatocytes is required for its pro-apoptotic activity. *J. Hepatol.* 2008;49: 965–976.
- Cesaratto L, Vascotto C, Calligaris S, Tell G. The importance of redox state in liver damage. *Ann Hepatol.* 2004;3: 86-92.
- Consolo M, Amoroso A, Spandidos DA, Mazzarino MC.. Matrix metalloproteinases and their inhibitors as markers of inflammation and fibrosis in chronic liver disease (Review). *Int J Mol Med* 2009;24:143–152.
- Corrao G, Zambon A, Bagnardi V, y cols. Collaborative SIDECIR Group. Coffee, caffeine, and the risk of liver cirrhosis. *Ann Epidemiol* 2001;11:458–465.
- Carpino G, Morini S, Ginanni Corradini S, y cols. Alpha-SMA expression in hepatic stellate cells and quantitative analysis of hepatic fibrosis in cirrhosis and in recurrent chronic hepatitis after liver transplantation. *Dig. Liver Dis* 2005;37:349–356.
- Castro JA, D'acosta N, De Ferrreira EC, y cols. Studies on thioacetamide induced liver necrosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 1974;30:79-86.
- Daglia M, Papetti A, Gregotti C, y cols. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. *J. Agric. Food Chem.* 2000;48:1449-1454.
- Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87:2095-2147.
- De Leve L, Kaplowitz N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* 1991;52:287-305.

- De Minicis S, Brenner D. Oxidative stress in alcoholic liver disease: role of NADPH oxidase complex. *J. Gastroenterol Hepatol* 2008;23:98–103.
- Desmet V. Organizacional Principles, in *The Liver: Biology and Pathobiology*, de Arias, I., Fausto, N., Boyer, J., Chisari, F., Shafritz, D. Tercera ed., Ed Raven Press Ltd., Nueva York, 1994.
- Duncan MR, Frazier KS, Abramson S, y cols. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down regulation by cAMP. *FASEB J* 1999;13:1774–1786.
- Evans P, Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Brit J Nutr* 2001;85:67-74.
- Evans TRJ, Kayle SB. Retinoids: present role and future potential. *British J Cancer* 1999;80:1-8.
- Fitzhugh OG y Nelson AA. Liver tumors in Rats Fed thiourea or thioacetamide. *Science* 1948;108:626-628.
- Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000;275:2247–2250.
- Friedman S. Liver fibrosis-from bench to bedside. *J of Hepatol* 2003;38:38-53.
- Gonzales RC, Hevia VA, Davidson HG. Capitulo 2: Anatomía microscópica del hígado, en *Tratado de Hepatología de Herrerias, G., Díaz, A., Jimenez, M.* Tomo1, Ed. Universidad de Sevilla, Sevilla, 1996.
- Geerts PD. History, heterogeneity, developmental, biology, and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001;21: 311–335.
- Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:793–807.
- Gressner OA, Lahme B, Siluschek M, y cols. Activation of TGF-beta within cultured hepatocytes and in liver injury leads to intracrine signaling with expression of connective tissue growth factor. *J Cell Mol Med* 2008a;12:2717–2730.
- Gressner OA, Lahme B, Rehbein K, y cols. Pharmacological application of caffeine inhibits TGF-b- stimulated connective tissue growth factor expression in hepatocytes via PPARg and SMAD2/3-dependent pathways. *J. Hepatol.* 2008b;49:758–767.

- Guyton A, Hall J. Tratado de Fisiología Medica, 10^a edición. Mc Graw-Hill Interamericana México D.F.
- Heffner, JE y Repine JE. Pulmonary strategies of antioxidant defense. Am Rev Respir Dis 1989;140: 531-54.
- Highleyman L, Franciscus A. Introducción sobre el hígado. Hepatitis c support project [on line]. 2003, versión 1.0. Disponible en www.hcvadvocate.org.
- Hung KS, Lee TH, Chou WY, y cols. Interleukin-10 gene therapy reverses thioacetamide-induced liver fibrosis in mice. Biochem Biophys Res Commun 2005;14: 324–331.
- Hunter AJ, Holscher MA, Neal RA. Thioacetamide-induced hepatic necrosis I. Involvement of the mixed-function oxidase enzyme system. J Pharmacol Exp Ther 1977;200:439-448.
- Jec SH, He J, Appel LJ, y cols. Coffee consumption and serum lipids; a metaanalysis of randomized controlled clinical trials. Am J Epidemiol 2001;153: 353–362.
- Kawachi I, Colditz GA, Stone CB. Does coffee drinking increase the risk of coronary heart disease? Results from a meta-analysis. Br Heart J 1994;72:269–275.
- Klatsky AL, Armstrong MA, Friedman GD. Coffee, tea, and mortality. Ann. Epidemiol 1993;3:375–381.
- La Vecchia CL. Coffee, liver enzymes, cirrhosis and liver cancer. J Hepatol 2005;42: 444–446.
- Leask A, Abraham DJ. All in the CCN family: essentialmatrixcellular signaling modulators emerge from the bunker. J Cell Sci 2006;119: 4803–4810.
- Lockhart, R., Hamilton, G., Fyfe, F. Anatomía humana. Nueva editorial Americana, S.A de C.V. México, D.F. 529-532, 1998.
- McCusker RR, Goldberger BA, Cone EJ. Caffeine content of specialty coffees. J Anal Toxicol 2003;27: 520–522.
- Méndez N, Uribe M. Conceptos actuales en hepatología. Masson Doyma México, S.A.2003.

- Meredith MJ, Reed DJ. Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte. *J Biol Chem* 1982; 257: 3747-53.
- Michalopoulos GK. Liver Regeneration. Mini review. *J Celll Physiol* 2007;213:286-300.
- Muriel P. Some experimental models of liver damage. In Sahu S (ed). *Hepatotoxicity: from genomics to in vitro an in vivo models*. John Wiley and Sons LTD, West Sussex, UK, 2007(a) 119-137.
- Muriel P, Arauz J. Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention. “Capitulo 7: Coffee and liver health” John Wiley & Sons 2012 pag:123-153.
- Myers MG, Basinski A. Coffee and coronary heart disease. *Arch Intern Med* 1992;152:1767–1772.
- Natarajan SK, Thomas S, Ramamoorthy P, y cols. Oxidative stress in the development of liver cirrhosis: a comparison of two different experimental models. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21: 947–957.
- Netter F. Colección Ciba de Ilustraciones Medicas, Sistema Digestivo: Hígado, vías biliares y páncreas, tomo 3.3, secciones XV,XVI y XVII; Ed. Científicas y Técnicas (Masson-Salvat de Medicina), Barcelona, 1983.
- Nohl H, Hegner D. Evidence for the existence of catalase in the matrix space of rat heart mitochondria. *FEBS Lett* 1978;253:5051-63.
- Nurminen ML, Niittynen L, Korpela R, Vapaatalo H. Coffee, caffeine and blood pressure: a critical review. *Eur J Clin Nutr* 1999;53:831–839.
- Olaso E, Fridman S. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. *J of Hepatol* 1998;29:836-847.
- Park SY, Shin HW, Lee KB, Lee MJ, Jang JJ. Differential expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in thioacetamide-induced chronic liver injury. *J Korean Med Sci* 2010;25: 576-576.
- Perlemuter G, Letteron P, Carnot F, Zavala F, Pessayre D, Nalpas B, Brechot C. Alcohol and hepatitis C virus core protein additively increase lipid peroxidation and synergistically trigger hepatic cytokine expression in a transgenic mouse model. *J Hepatol* 2003;39:1020–1027.

- Ruhl CE, Jeverhart JE. Coffee and caffeine consumption reduce the risk of elevated serum alanine aminotransferase activity in the United States. *Gastroenterology* 2005;128: 24–32.
- Safadi R, Friedman SL. Hepatic fibrosis – role of hepatic stellate cell activation. *Med Gen Med* 2002;15:4–27.
- Sanchez GI, Jimenez EF, Saura CF. In vitro antioxidant activity of coffees brewed using different procedures (Italian, espresso and filter). *Food Chem* 2005;90:133–139.
- Sies H, Stahl W. Vitamine E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidant. *Am J Clin* 1995;62:1315-1321.
- Schmitt Graff A, Kruger S, Bochard F, Gabbiani G, Denk H. Modulation of alpha smooth muscle actin and desmin expression in perisinusoidal cells of normal and diseased human livers. *Am J Pathol* 1991;138:1233–1242.
- Spiller MA. The chemical components of coffee. In: Spiller GA, editor. *Caffeine*. Boca Raton: CRC Press; 1998. p. 97–161.
- Stocker R, Bowry VW, Frei B. Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88:1646-50.
- Tanaka K, Tokunaga S, Kono S, y cols. Coffee consumption and decreased serum gamma-glutamyltransferase and aminotransferase activities among male alcohol drinkers. *Int J Epidemiol* 1998;27:438–443.
- Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2000;343:1467–1476.
- Weiss SJ. Oxygen, ischemia, inflammation. *Acta Physiol. Scand* 1986;548:9-37.
- Wells RG. Fibrogenesis. V. TGF-beta signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:845-850.
- Weng HL. L., Ciucian, Y. Liu, y cols. Profibrogenic transforming growth 548 factor-beta/activin receptor-like kinase 5 signaling via connective tissue growth factor expression in hepatocytes. *Hepatology* 2007;46:549:1257–270.
- Willett WC, Stampfer MJ, Manson JE, y cols. Coffee consumption and coronary heart disease in women. A ten year follow up. *JAMA* 1996;275:458–462.

Zimmermann T, Müller A, Machnik G, y cols. Biochemical and morphological studies on production and regression of experimental liver cirrhosis induced by thioacetamide in wistar rats. Z Versuchstierkd 1987;30:165-180.