



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

Efecto hepatoprotector del glucósido diterpenoide esteviósido en la cirrosis hepática experimental en ratas

Tesis que presenta:

M. en C. Sael Casas Grajales

Para obtener el Grado de:

Doctor en Ciencias

En la especialidad de:

Farmacología

Director de Tesis:

Dr. Pablo Muriel de la Torre

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Farmacología, del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la tutoría del Doctor Pablo Muriel de la Torre y en el Laboratorio a cargo del Doctor Raj M. Lakshman en el Hospital de Veteranos (Veterans Affairs) de la ciudad Washintong, D.C. U.S.A. bajo la tutoría de la Doctora Karina Reyes Gordillo.

Se contó además con una beca y un donativo proporcionados por el CONACYT para estudios de posgrado con clave **355795** y con No. **253037**, respectivamente. Por otro lado, también se recibió apoyo por parte del donativo del NIAAA/NIH No. **K01AA025140-02**.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Pablo Muriel de la Torre, quién, en primera instancia aceptó que realizara en su laboratorio tanto mi proyecto de maestría así como el actual proyecto de doctorado, además por brindarme apoyo, comprensión, consejo, enseñanzas, y guía cuando era necesario, a usted Doctor mi estima, agradecimiento y admiración por su obra en el Departamento de Farmacología.

A la Doctora Karina Reyes Gordillo y su familia, por el apoyo y comprensión que recibí durante mi estancia en Washington por parte de ella y de su familia, que sin conocerme me brindaron todas las atenciones posibles, además de ser una guía en la vida laboral y personal.

Al Doctor Javier Camacho Arroyo, por la asesoría y apoyo que recibí de su parte durante la realización de mi proyecto.

Al Doctor Saúl Villa Treviño, quien, a pesar de no tener responsabilidad directa en este proyecto, siempre mostró interés y apoyo en la realización del mismo, le agradezco por su tiempo y consejos

Al Doctor Raj M. Lakshman por aceptarme en su laboratorio y brindarme asesoría, apoyo y amistad.

A la Lic. en Enf. Rosa Elena Flores Beltrán, a la C. P. Elvia Leyva Sánchez y la Lic. en Enf. Laura Dayana Buendía Montaño quienes siempre me han dado apoyo tanto personal como laboral y cuidarme en todo momento.

Al señor, Benjamín Salinas Hernández por ser un buen amigo y brindarme excelentes momentos durante mi estancia, sin su ayuda y apoyo este proyecto no hubiese podido salir adelante.

A la Q.F. B. Silvia Galindo Gómez, la Dra. Karla M. Gil Becerril y la Q.F.B. Verónica Reyes Olivares, por su invaluable consejo, apoyo técnico recibido en sus respectivos laboratorios y amistad durante la realización del presente proyecto.

A mis compañeros los M. en C. Daniel Cuervo Zanatta, Luis Francisco Vázquez Flores, Dunia Margarita Medina Buelvas, Edna Milagros Silva García, Esmeralda Chávez Estrada, Gustavo Gutiérrez Cano, a la Dra. Erika Hernández Aquino y a la L.A.Q.B. María del Consuelo Acero Hernández por su amistad, gratos momentos juntos y por soportar todas mis travesuras para con ustedes, sin su ayuda mi estancia en este lugar no hubiese sido buena.

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

DEDICATORIAS

El presente trabajo lo dedico con todo mi cariño y respeto:

A Dios:

Gracias por brindarme la templanza necesaria durante los momentos de soledad, angustia, duda y sobre todo por cuidar siempre de lo más importante...mi familia.

A mis padres:

Por estar siempre conmigo cuando más los necesité, enseñarme que con el trabajo duro y dedicación todo es posible, a superarme siempre y no ser conformista con los proyectos que realice a lo largo de mi vida, a tener valores los cuales rigen mi forma de ser y de ver el mundo, pero sobre todo mostrarme mi filosofía de vida: “Retroceder nunca...rendirse jamás”.

A mi hermano:

Por ser mi primer amigo y confidente, darme su apoyo y comprensión desde pequeños, cuidarme como el hermano mayor que eres y por quererme desde que supiste de mi existencia.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. ANTECEDENTES	6
2.1 Aspectos generales del hígado	6
2.2 Funciones del hígado	7
2.3 El lobulillo hepático	8
2.4 Acino hepático	9
2.5 Lobulillo portal	10
2.6 Sinusoides hepáticos	10
2.7 Sistema biliar	11
2.8 Tipos celulares presentes en el lobulillo hepático	11
2.8.1 Hepatocitos	11
2.8.2 Células de Kupffer (KC).....	12
2.8.3 Células estelares hepáticas (HSC)	12
2.8.4 Células endoteliales sinusoidales (LSEC)	13
2.9 Daño al hígado	14
2.9.1 Fibrosis y cirrosis hepática	15
2.9.1.1 Origen y diagnóstico	15
2.9.1.2 Patogénesis de la fibrosis hepática	17
2.9.1.3 Terapias antifibrogénicas	19
2.9.1.4 Modelos experimentales de daño hepático.....	19
2.10 Esteviósido	21
3. HIPÓTESIS	23
4. JUSTIFICACIÓN	24
5. OBJETIVOS	25
5.1 Objetivo general	25
5.2 Objetivos particulares	25
6. MATERIALES Y MÉTODOS	26
6.1 Materiales	26
6.2 Diseño experimental con el uso de animales (<i>in vivo</i>)	26

6.3	Diseño experimental con el uso de co-cultivos de células hHSC/VL-17A (<i>in vitro</i>).	27
6.4	Determinaciones de diversos marcadores en plasma e hígado.	28
6.5	Técnicas	30
6.5.1	Determinación de la actividad de la enzima FA	30
6.5.2	Determinación de la actividad de la enzima γ -GTP	31
6.5.3	Determinación de la actividad de la enzima ALT	32
6.5.4	Determinación de la cantidad de proteínas hepáticas por el método de Bradford	33
6.5.5	Determinación del grado de peroxidación lipídica	34
6.5.6	Determinación de los niveles de GSH	35
6.5.7	Determinación del glucógeno hepático	36
6.5.8	Determinación del contenido de colágena	37
6.5.9	Histología	39
6.5.10	Inmunohistoquímica	42
6.5.11	Ensayo de inhibición del radical DPPH	44
6.5.12	Extracción de RNA y ensayos de PCR cuantitativos	45
6.5.13	Ensayo de zimografía	47
6.5.14	Ensayo de síntesis de DNA	48
6.5.15	Ensayo de docking o acoplamiento molecular	49
6.5.16	Análisis estadístico	50
7.	RESULTADOS	51
7.1	La administración concomitante del esteviósido previene los cambios en la arquitectura hepática y las alteraciones bioquímicas producidos por la administración crónica de TAA.	51
7.2	El esteviósido previene el daño al hígado al bloquear la activación del NF-κB y citocinas pro-inflamatorias.	52
7.3	El esteviósido preserva el sistema antioxidante al mantener los niveles del factor maestro Nrf2 y no como un neutralizador directo de radicales libres	54
7.4	El esteviósido previene la fibrogénesis a través de un mecanismo a múltiples blancos	55
7.4.1	El esteviósido bloquea la activación de las HSC	56
7.4.2	El esteviósido previene la activación de las HSC al regular a la baja al TGF- β 1	57
7.4.3	El esteviósido inhibe a las metaloproteinasas (MMPs)	58
7.4.4	Las vías canónica y no canónica de las Smads es prevenida por el esteviósido	58

7.5	El estevósido previene la sobrerregulación de genes pro-inflamatorios y pro-fibrogénicos inducida por la exposición a LPS y EtOH en co-cultivos	59
7.6	El estevósido muestra un efecto anti-proliferativo dependiente de la concentración	61
7.7	Estudio de acoplamiento molecular (docking) mostrando un posible mecanismo del estevósido como inmunoregulador.	62
8.	<i>DISCUSIÓN</i>	65
9.	<i>CONCLUSIÓN</i>	70
8.1	Conclusiones particulares	70
8.2	Conclusión general	70
10.	<i>PERSPECTIVAS</i>	71
11.	<i>REFERENCIAS</i>	72
12.	<i>APÉNDICES</i>	77
12.1	Curva de calibración de la FA.....	77
12.2	Curva de calibración de γ -GTP.....	78
12.3	Curva de calibración de ALT	79
12.4	Proteínas.....	80
12.5	GSH.....	81
12.6	Colágena (HP).....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía hepática. Se muestran el ligamento falciforme, la vesícula biliar, el lóbulo derecho, izquierdo y caudado.....	7
Figura 2. Estructura de un lobulillo hepático, se muestran las placas celulares, la vena central, los sinusoides y el espacio portal.....	9
Figura 3. Diferentes zonas de los hepatocitos dentro del lobulillo dependiendo del flujo sanguíneo	10
Figura 4. Localización de los tipos celulares presentes en el hígado. Se muestran los hepatocitos, HSC, KC y LSEC.	14
Figura 5. Esquema de los tipos de daño que se presentan en el hígado ante algún agente etiológico y tiempo de exposición.	15
Figura 6. Iniciación y perpetuación de las HSC. Características fenotípicas que adquieren después de una lesión.	18
Figura 7. Formación de metabolitos de la TAA. 1. TAA. 2. TASO. 3 y 4. TASO ₂ (proceso de tautomerización). 5. Ácido acetil sulfínico.....	20
Figura 8. Estructura química del esteviósido (STV).....	22
Figura 9. Esquema representativo del protocolo a seguir	29
Figura 10. La administración de esteviósido previno el daño producido por la administración crónica de TAA.	52
Figura 11. Efecto inmunoregulador del STV en hígados dañados con TAA.	53
Figura 12. El STV previene el incremento citocinas en hígados cirróticos.	54
Figura 13. Efecto del STV sobre el sistema antioxidante.....	55
Figura 14. Efecto del STV sobre la deposición de colágena en el parénquima hepático.	56
Figura 15. Efecto del STV sobre la activación de las HSC.	57

Figura 16. El eSTV regula a la baja la actividad de las MMPs.	58
Figura 17. El STV previene la vía no canónica de las Smad y preserva a la Smad7.	59
Figura 18. Efecto inmunomodulador del STV en co-cultivo de células hHSC/VL-17A.	60
Figura 19. Efecto anti-fibrogénico del STV en co-cultivo de células hHSC/VL-17A.	61
Figura 20. Efecto anti-proliferativo del STV en co-cultivo de células hHSC/VL-17A.	62
Figura 21. STV acoplado al receptor TNFR1.	63
Figura 22. STV acoplado al receptor TLR4-MD-2.	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores genéticos y ambientales asociados con la progresión de la fibrosis en diversos tipos de enfermedades crónicas hepáticas.....	16
Tabla 2. Aleatorización de ratas Wistar macho en los grupos experimentales	27
Tabla 3. Curva de calibración de la FA.....	77
Tabla 4. Curva de calibración de γ -GTP.....	78
Tabla 5. Curva de calibración de ALT.....	79
Tabla 6. Curva de calibración de proteínas.....	80
Tabla 7. Curva de calibración de GSH.....	81
Tabla 8. Curva de calibración de HP.	82
Tabla 9. Lista completa de los anticuerpos utilizados para los ensayos de Western blot e inmunohistoquímica.....	84
Tabla 10. Genes estudiados y las sondas utilizadas para las pruebas de qPCR <i>in vivo</i>	85
¡Error! Marcador no definido.	
Tabla 11. Genes estudiados y las sondas utilizadas para las pruebas de qPCR <i>in vitro</i>	86

ÍNDICE DE GRÁFICAS

- Gráfica 1.** Curva de calibración para la determinación de la actividad de la FA..... 77
- Gráfica 2.** Curva de calibración para la determinación de la actividad de la γ -GTP. 78
- Gráfica 3.** Curva de calibración para la determinación de la actividad de la ALT... 80
- Gráfica 4.** Curva de calibración para la determinación de la cantidad de proteínas.. 81
- Gráfica 5.** Curva de calibración para la determinación de la cantidad de GSH..... 82
- Gráfica 6.** Curva de calibración para la determinación de la cantidad HP. 83

RESUMEN

El daño crónico en el hígado por diversos agentes conduce a cambios tanto moleculares como en la arquitectura y funcionalidad del órgano. El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad del esteviósido administrado por ocho semanas a una dosis de 20 mg/kg de peso i. p. dos veces por día, para prevenir la cirrosis experimental inducida por la administración crónica del hepatotóxico tioacetamida (TAA) a dosis de 200 mg/kg de peso i. p. tres veces por semana por ocho semanas en ratas Wistar macho, los animales fueron administrados de forma concomitante con el esteviósido, con sus respectivos controles. Se evaluó la integridad del hígado mediante observaciones de su morfología macro y microscópica, además de la medición de su peso y almacenamiento de glucógeno, así como de marcadores enzimáticos de necrosis (alanina aminotransferasa) y de colestasis (γ -glutamyl transpeptidasa y fosfatasa alcalina). Para evaluar el estado del sistema antioxidante hepático se realizaron mediciones del factor nuclear de eritrocitos 2 (Nrf2), así como de marcadores de estrés oxidante en membrana (4-hidroxinonal y malondialdehído) y antioxidantes (glutatión reducido y glutatión peroxidasa). Para evaluar el proceso inflamatorio en los hígados cirróticos se midió el factor nuclear κ B (NF- κ B;p65), además de las citocinas pro-inflamatorias interleucina (IL)-17a, IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10. Además, el proceso fibrogénico fue estudiado a diferentes niveles midiendo la cantidad de colágena presente en muestras de hígado, y la activación de las células estelares hepáticas (HSC) a través de la α -actina de músculo liso y el factor transformante β 1, la remodelación de la matriz extracelular (ECM) por parte de las metaloproteinasas (MMP)-9, MMP-2 y MMP-13, y las vías canónica y no canónica de las Smads al mediante la determinación de p-JNK, p-p38, p-Smad3L y Smad7. En todos los casos anteriores, la inducción de la cirrosis por parte de la TAA modificó los parámetros anteriores alterando la arquitectura del hígado, así como su metabolismo e induciendo necrosis y colestasis, lo que a su vez propició el incremento en el estrés oxidante y el desencadenamiento de un proceso inflamatorio. Lo anterior propició la activación de las HSC, con el subsecuente incremento en la deposición de colágena y remodelación de la ECM. Sin embargo, el esteviósido fue capaz de prevenir significativamente estos cambios propiciados por la TAA. Los

resultados obtenidos en el modelo *in vivo* muestran por primera vez que el esteviósido ejerce efectos antioxidantes, anti-inflamatorios y anti-fibrogénicos en la cirrosis experimental. Para confirmar los hallazgos obtenidos en el modelo *in vivo* con la administración del hepatotóxico TAA, los efectos anti-inflamatorios y anti-fibrogénicos se caracterizaron en un co-cultivo de células humanas HSC/VL-17A utilizando lipopolisacárido y etanol como agentes hepatotóxicos. En ambos casos, los dos hepatotóxicos incrementaron el nivel de mRNA tanto de los genes pro-inflamatorios como de los pro-fibrogénicos, mientras que la incubación con esteviósido previno estos aumentos. Por otro lado, a través de un estudio *in silico* se determinó si el esteviósido es capaz de unirse a los receptores TNFR1 y TLR4-MD-2, relacionados a la vía de activación del NF- κ B mediante una prueba de docking. En ambos casos, el esteviósido mostró una energía de unión menor a cero, siendo de -0.9 kcal/mol para el TNRF1 y de -5.6 kcal/mol para el TLR4-MD-2, lo que nos sugiere una mayor afinidad por este último. Por lo anterior se concluye que el esteviósido mostró un efecto antioxidante al regular al alta al Nrf2, anti-inflamatorio al regular a la baja al NF- κ B y antifibrótico a múltiples niveles, logrando prevenir los cambios producidos por la cirrosis experimental, confirmándose estos efectos en co-cultivos de células humanas.

ABSTRACT

Chronic liver damage by several agents leads to changes at the molecular level, in the architecture, and in the functionality of the organ. The aim of the present study was to evaluate the ability of stevioside administered for eight weeks at a dose of 20 mg/kg of weight i.p. twice a day, to prevent experimental cirrhosis induced by the chronic administration of the hepatotoxic thioacetamide (TAA) at a dose of 200 mg/kg of weight i.p. three times a week for eight weeks to male Wistar rats, the animals were administered concomitantly with stevioside and their respective controls. The integrity of the liver was evaluated through observations of its macro and microscopic morphology, as well as by the measurement of its weight and glycogen storage, as well as by enzymatic markers of necrosis (alanine aminotransferase) and cholestasis (γ -glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase). To assess the status of the liver antioxidant system, measurements of the nuclear erythroid factor 2 (Nrf2), as well as markers of oxidative stress in membrane (4-hydroxynonenal and malondialdehyde) and antioxidants (reduced glutathione and glutathione peroxidase) were done. To evaluate the inflammatory process in cirrhotic livers, the nuclear factor κ B (NF- κ B; p65) was measured, in addition the pro-inflammatory cytokines interleukin (IL)-17a, IL-1 β , IL-6, tumor necrosis factor- α and IL-10 were also assessed. On other hand, the fibrogenic process was studied at different levels by measuring the amount of collagen in liver samples, and the activation of hepatic stellate cells (HSC) through α -smooth muscle actin and the transforming growth factor- β 1, remodeling of the extracellular matrix (ECM) by the metalloproteinases (MMP)-9, MMP-2 and MMP-13, and the canonical and non-canonical Smads pathway through the measurement of p-JNK, p-38, p-Smad3L and Smad7. Cirrhosis induced by TAA modified the mentioned parameters, altering the architecture of the liver parenchyma as well as its metabolism, inducing necrosis and cholestasis, which in turn led to an increase in oxidative stress, triggering the inflammatory process. This led to HSC activation, with the subsequent increase in collagen deposition and remodeling of ECM. However, stevioside was able to significantly prevent these changes produced by TAA. The results obtained in the *in vivo* model show, for the first time, that stevioside exerts antioxidant, anti-inflammatory and anti-fibrogenic effects in

experimental cirrhosis. To confirm the findings obtained in the *in vivo* model with the administration of TAA, the anti-inflammatory and anti-fibrogenic effects were characterized in a co-culture of human HSC/VL-17A cells using lipopolysaccharide and ethanol as hepatotoxic agents. In both cases, the two hepatotoxics increased mRNA of both pro-inflammatory and pro-fibrogenic genes, while the incubation with stevioside prevented these increases. On the other hand, an *in silico* study was performed to investigate whether stevioside is able to bind to the TNFR1 and TLR4-MD-2 receptors, related to the NF- κ B activation pathway through docking test. In both cases, stevioside showed a binding energy less than zero, being -0.9 kcal/mol for TNFR1 and -5.6 kcal/ mol for TLR4-MD-2, which suggest a greater affinity for the latter. Therefore, it is concluded that stevioside showed antioxidant effect by upregulating Nrf2, anti-inflammatory effect by downregulating NF- κ B, and anti-fibrotic properties, acting at various levels, thus preventing the changes produced by experimental cirrhosis; these effects were confirmed by *in vitro* experiments of co-cultures of human cells.

INTRODUCCIÓN

El daño constante en el hígado, producido por diversas etiologías tales como medicamentos, abuso en la ingestión de bebidas alcohólicas, infecciones por virus, alteraciones del conducto biliar, esteatohepatitis no alcohólica, etc. varían geográficamente y conducen a una hepatopatía llamada cirrosis [1]. Durante esta enfermedad se producen diversos cambios, que incluyen incrementos en los niveles séricos de enzimas como la alanina amino transferasa (ALT), la fosfatasa alcalina (FA) y la γ -glutamil transpeptidasa (γ -GTP), que se asocian a la pérdida en la integridad del hepatocito, además, los niveles del glutatión (GSH) y la glutatión peroxidasa (GPx) disminuyen, mientras que a la par se incrementa el malón dialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4HNE) [2–5]. Por otra parte, el daño constante al órgano produce un proceso inflamatorio, dado por el aumento de citocinas proinflamatorias y profibrogénicas tales como la interleucina-1(IL-1), IL-6, IL-17a, IL-10, el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), incremento en proteínas de matriz extracelular (ECM) como la colágena y seguido a esto un proceso de fibrosis, que se caracteriza por cicatrices en el tejido hepático [6]. Sin embargo, no existen enfoques terapéuticos exitosos para tratar las enfermedades del hígado, a pesar del alto índice de mortalidad anual debido a ellas. Por ello, se debe enfocar la investigación a diversas moléculas de origen natural o sintético que tengan la capacidad de ejercer un efecto benéfico sobre dichas patologías y que pudiesen ser futuros agentes terapéuticos.

Por lo anterior, el uso de diversos compuestos que puedan ejercer un efecto positivo sobre la cirrosis ha sido propuesto, especial énfasis se ha hecho en los productos de origen natural y sus derivados. Un ejemplo es la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni, y en especial el esteviósido, diterpenoide que se encuentra en altas concentraciones en las hojas, tallo y flores, pero no en las raíces de la planta de estevia [7]. El esteviósido aporta muchos beneficios hacia la salud tales como ejercer un efecto anti-hiperglicémico, antihipertensivo, anti-inflamatorio y anticancerígeno [8]. Sin embargo, la capacidad del esteviósido para prevenir las enfermedades hepáticas no ha sido investigada todavía. Por lo anterior, el esteviósido parece ser un posible

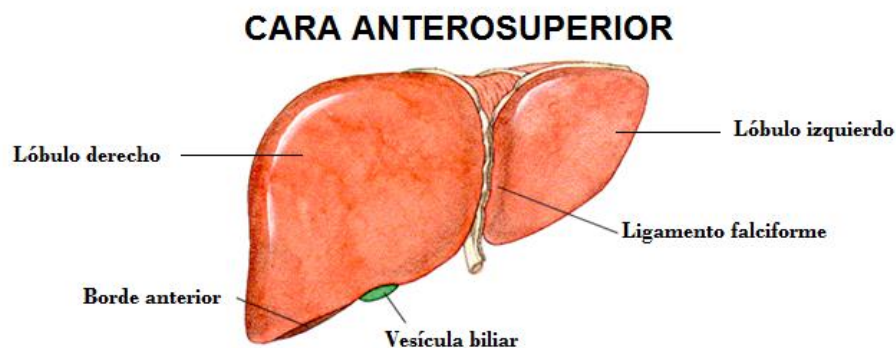
candidato como agente farmacológico en el tratamiento de las enfermedades hepáticas, especialmente aquellas en las que se cursa con un proceso inflamatorio crónico tales como la fibrosis y cirrosis hepática.

2. ANTECEDENTES

2.1 Aspectos generales del hígado

El hígado es la glándula más grande del cuerpo humano, se extiende a través de la cavidad abdominal por debajo del diafragma. En el adulto tiene un peso aproximado de 1.5 kg, sin embargo, sólo representa del 2 a 3 % de la masa corporal y consume del 25 al 30 % del oxígeno que requiere el organismo, esto depende tanto del género como del volumen del individuo, es de color rojo pardo y presenta forma semi-ovoidea [9,10]. El hígado se divide en cuatro lóbulos, por su parte, el ligamento falciforme lo divide en un lóbulo derecho y un lóbulo izquierdo, además presenta dos caras, la anterosuperior y la anteroposterior, así como un borde anterior y uno posterior (Figura 1), cada uno con dos extremidades, la derecha y la izquierda, en la cara posteroinferior presenta el lóbulo cuadrado por delante y el lóbulo caudado por detrás. Este órgano se encuentra recubierto por tejido conectivo llamado cápsula de Glisson, la cual es resistente y delgada [10].

El hígado es un órgano altamente irrigado, recibe sangre de dos fuentes principales, la oxigenada que llega a través de la arteria hepática, mientras que la rica en nutrientes (colectados desde el bazo, estómago, páncreas, vesícula biliar e intestinos) llega a través de la vena porta [10].



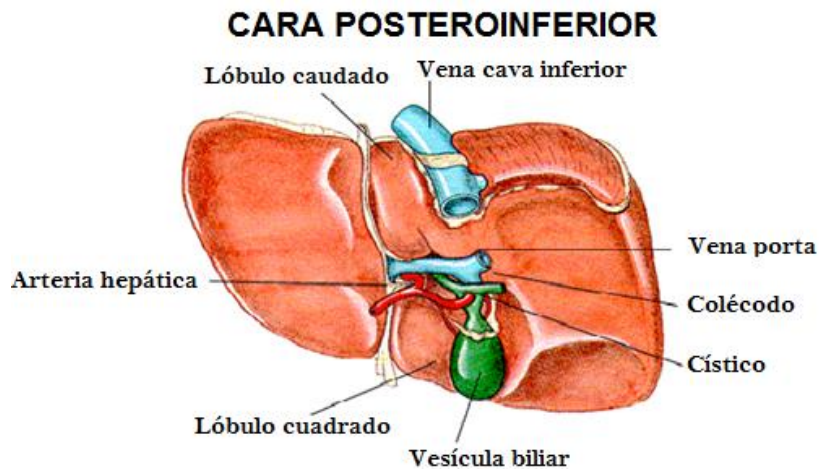


Figura 1. Anatomía hepática. Se muestran el ligamento falciforme, la vesícula biliar, el lóbulo derecho, izquierdo y caudado [11].

2.2 Funciones del hígado

El hígado cumple diversas funciones, siendo las principales la captación de los nutrientes, anabolismo, biotransformación, almacenamiento y catabolismo de moléculas esenciales para el organismo, detoxificación de agentes nocivos y excreción de sustancias a través de la bilis [11].

Metabolismo y detoxificación: El hígado es el encargado de mantener los niveles glucémicos sanguíneos adecuados, principalmente por almacenar la glucosa en forma de glucógeno a través de la gluconeogénesis y la conversión de fructosa y lactosa en glucosa. Algunas de las células del hígado son capaces de procesar lípidos para diversos procesos metabólicos, tal es caso de los hepatocitos que almacenan triglicéridos, degradan ácidos grasos para producir adenosín trifosfato (ATP) y sintetizan lipoproteínas, que serán las encargadas de transportar a los ácidos grasos, triglicéridos y colesterol hacia otras células del organismo, además, las células estelares (HSC) se encargan de almacenar vitamina A, la cual participa en diversos procesos fisiológicos [12]. Por otro lado, los hepatocitos retiran el grupo amino (NH_2) de los aminoácidos, este proceso se lleva a cabo para que puedan ser utilizados en la producción de ATP o ser convertidos a carbohidratos o grasas; el amoníaco resultante de la desaminación es convertido en otra molécula menos tóxica llamada urea, ésta es excretada subsecuentemente por la orina. Además, los hepatocitos son

los encargados de la síntesis de diversas proteínas como las plasmáticas, la albumina, alfa y beta globulinas, así como protrombina y fibrinógeno [11].

El hígado se encarga de desintoxicar la sangre de sustancias circulantes que pueden ser originadas en diversos órganos o del exterior. Gran parte de esta función es de carácter físico y es llevada a cabo por las células de Kupffer (KC), encargadas de fagocitar bacterias y partículas. Mientras que las moléculas son biotransformadas a través de reacciones de fase 1 (oxidación, hidroxilación, y otras reacciones mediadas por las enzimas del citocromo P450) y de fase 2 (conjugación de grupos propicios a partir de derivados de moléculas de fase 1 o de los xenobióticos originales). El propósito de este cambio fisicoquímico es el de obtener metabolitos inactivos o menos reactivos y más hidrosolubles o menos lipofílicos, siendo posteriormente excretados ya sea por la orina o por la bilis. Por lo anterior, el hígado también se ve involucrado en el metabolismo de las hormonas esteroideas, por lo que un daño en el hígado conlleva a una desregulación en el sistema endócrino [12].

Excreción de la bilirrubina: La bilirrubina es un pigmento biliar de color amarillo-anaranjado que deriva del grupo hemo de los eritrocitos reciclados; dicha degradación se produce en el bazo para luego ser conjugada en el hígado. Ésta es almacenada en la vesícula biliar formando parte de la bilis, siendo excretada posteriormente al duodeno y dando el color característico a las heces [11].

Almacenamiento: Además del glucógeno, en el hígado se almacenan otras biomoléculas esenciales para el organismo, tales como las vitaminas (A, B₁₂, D, E y K) y metales (hierro y cobre), que se liberan del hígado cuando son requeridos [11].

2.3 El lobulillo hepático

Comúnmente conocido por mucho tiempo como la unidad funcional del hígado, tiene la forma de un hexágono y mide aproximadamente 2 mm (Figura 2), en el centro se encuentra la vena central, y desde allí se proyectan en forma radial láminas de hepatocitos y sinusoides hepáticos. En tres ángulos de la periferia de los lobulillos, donde varios de ellos se unen, se observan las tríadas portales o espacios portales, que constan de las ramas de la vena porta, la arteria hepática y el conducto biliar. Cabe

resaltar que este modelo está basado en hígados de cerdo, ya que en el de los humanos resulta difícil elucidar esta estructura por no estar tan bien definida por capas espesas de tejido conectivo [11].

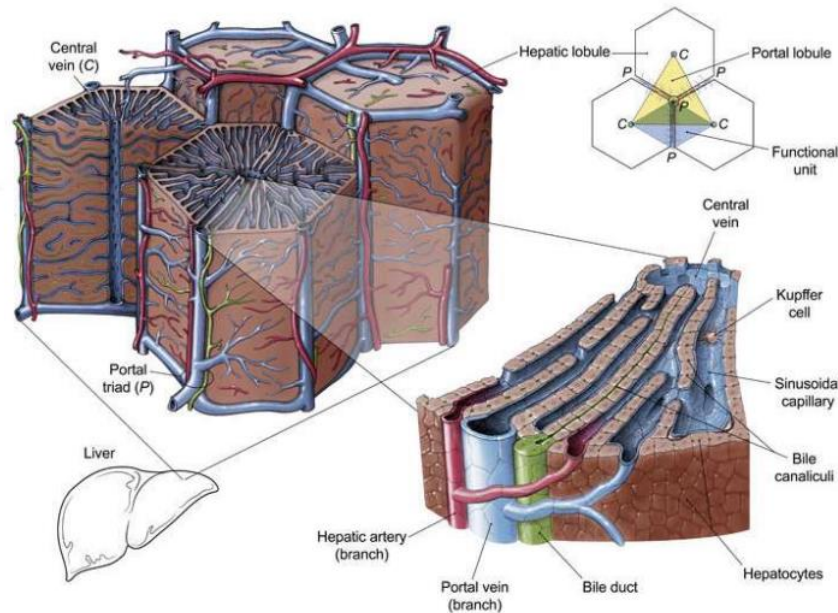


Figura 2. Estructura de un lobulillo hepático, se muestran las placas celulares, la vena central, los sinusoides y el espacio portal [13].

2.4 Acino hepático

En la actualidad es conocido como la unidad funcional y estructural del hígado, es también llamado lobulillo de Rappaport (Figura 3). Está constituido por porciones de dos lóbulos hepáticos vecinos, obteniendo entonces una forma semi-ovalada. El eje corto del acino está constituido por triadas portales, mientras que el eje largo está definido por dos líneas curvas imaginarias que conectan dos venas centrales cerca del eje corto. Se distinguen tres zonas (compuestas por láminas de hepatocitos) de diversa actividad metabólica entre el eje corto y la vena central, los hepatocitos más cercanos al eje vascular o zona 1 (cerca de la triada portal) son irrigados por sangre rica en oxígeno, nutrientes y toxinas. Los hepatocitos de esta zona son los encargados de almacenar la glucosa en forma de glucógeno y de realizar el proceso inverso en períodos de ayuno. Además, son los primeros en mostrar cambios morfológicos luego de una obstrucción en los canaliculos biliares o exposición a toxinas. Por otro lado, si se presentan alteraciones en la circulación son los últimos en morir y los primeros en

regenerarse. Los hepatocitos localizados en la zona 2 o intermedia reciben sangre de menor calidad en ambos rubros, mientras que los más alejados o de la zona 3 reciben el menor aporte de oxígeno y de nutrientes [11].

2.5 Lobulillo portal

Es la unidad funcional centrada alrededor del conducto biliar del espacio porta (Figura 3), está relacionada con la secreción exocrina del hígado, además, es una estructura triangular definida por tres líneas imaginarias que conectan tres venas centrales [11].

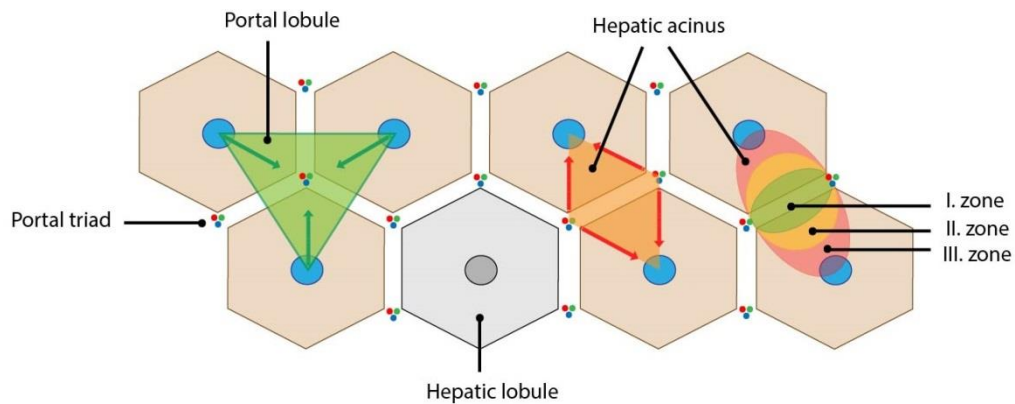


Figura 3. Diferentes zonas de los hepatocitos dentro del lobulillo dependiendo del flujo sanguíneo [14].

2.6 Sinusoides hepáticos

Son más grandes e irregulares que los capilares y poseen una pared celular muy delgada separada de las placas de células hepáticas por el espacio perisinusoidal con su red de fibras reticulares. La pared sinusoidal se compone de células endoteliales (LSEC) discontinuas mientras que en el interior de la luz sinusoidal se ubican las HSC. Por los sinusoides circulan unos 1,500 mL de sangre por minuto, que proviene de una circulación doble, por un lado, la arterial rica en oxígeno y por el otro, la portal rica en nutrientes y pobre en oxígeno, ambas se mezclan en el compartimento sinusoidal para ser drenadas posteriormente en la vena central, dónde la sangre fluye hacia las venas hepáticas y posteriormente hacia la vena cava inferior [11].

2.7 Sistema biliar

La bilis es un líquido producido por los hepatocitos que se almacena en la vesícula biliar, desempeña la función de emulsificar a los ácidos grasos para que estos puedan ser absorbidos posteriormente. Está constituida por sales biliares (ácido cólico y ácido quenodesoxicólico), proteínas, colesterol, pigmentos biliares, hormonas, varios tipos de iones, bilirrubina (también funge como su pigmento principal) y de agua.

La bilis secretada por los hepatocitos (entre 800 a 1000 mL) entra en un sistema de flujo que empieza en los canalículos biliares, que son estrechos conductos intercelulares que desembocan en los conductillos biliares, desde los cuales pasa a los conductos biliares en la periferia de los lobulillos. Los conductillos biliares depuran componentes del plasma, como glucosa y aminoácidos, por otro lado, el glutatión es hidrolizado en sus aminoácidos esenciales por la enzima γ -GTP expresada en la membrana apical de los colangiocitos. El principal pigmento de la bilis es la bilirrubina, producida como resultado de la fagocitosis de los eritrocitos, secretándose en la bilis y siendo degradada en el intestino. Por otro lado, las sales biliares de la bilis son las encargadas de emulsificar a los lípidos, para ser degradados posteriormente por la lipasa pancreática [11,15].

2.8 Tipos celulares presentes en el lobulillo hepático

En el hígado coexisten diversos tipos celulares que en conjunto promueven el correcto funcionamiento del microambiente en el órgano.

2.8.1 Hepatocitos

Los hepatocitos (Figura 4) realizan una gran cantidad de funciones metabólicas, endócrinas y secretoras en el hígado, son células epiteliales especializadas y representan cerca del 80 % de la masa hepática. Estas células tienen forma poligonal, y se acomodan en conjuntos tridimensionales llamados láminas hepáticas, además pueden entrar en contacto tanto con los sinusoides (cara sinusoidal) o los hepatocitos vecinos (cara lateral). Cabe destacar que una porción de la cara lateral de los hepatocitos es modificada para formar los canalículos biliares, mientras que las microvellosidades están presentes abundantemente en la cara sinusoidal y proyectan escasamente dentro de los canalículos biliares.

Funcionalmente, son activos en la síntesis de proteínas, lípidos, lipoproteínas, y glucógeno, es por ello que presentan gran cantidad de retículo endoplásmico rugoso [11].

2.8.2 Células de Kupffer (KC)

Fueron descritas en 1876 por Karl Wilhelm von Kupffer como parte del endotelio, pero en 1898 Tadeusz Browiec las identificó como macrófagos, se sitúan en el interior de la luz sinusoidal adheridas a las células endoteliales que componen lo que ayuda en su función al fagocitar patógenos que circulan por la sangre arterial o portal (Figura 4). Las KC junto con las células dendríticas y las células asesinas naturales representan un importante componente de la respuesta innata en el hígado, por su parte, las KC representan del 80-90% de los macrófagos en tejido sugieren la importancia del hígado en la defensa localizada y sistémica. Las KC se localizan en todo el hígado, sin embargo, esta localización no es homogénea, existe una mayor concentración en la región periportal del acino hepático, primer punto en interactuar con patógenos que circulen en la sangre, por lo anterior, las KC de esta zona presentan una mayor actividad fagocítica que aquellas de las zona media del acino y de la zona perivenosa [16,17].

2.8.3 Células estelares hepáticas (HSC)

Fueron descritas por primera vez por Karl Wilhelm von Kupffer en 1876, por otra parte, Toshio Ito en 1951, realizó la descripción de estas mismas células, se localizan en el espacio subendotelial de Disse entre las LSEC y los hepatocitos (Figura 4) y representan aproximadamente el 10% de las células residentes en el hígado. Se identifican por su capacidad de almacenar esteres de retinol en gotas de lípidos en el citoplasma. En un hígado normal, las HSC no proliferan y se mantienen en un estado quiescente, sin embargo, cuando el hígado sufre un daño, las HSC se transdiferencian a células parecidas a miofibroblastos, adquiriendo la capacidad para proliferar, ser contráctiles, inflamatorias, quimiotácticas e incrementar la producción de ECM. La activación consiste en dos fases principales: la iniciación y la perpetuación. La iniciación corresponde a cambios tempranos en la expresión de genes y del fenotipo, lo que provoca que las células reaccionen a otras citocinas y estímulos, mientras que la perpetuación resulta de los efectos de estos estímulos sobre el mantenimiento del

fenotipo y la generación de la fibrosis. La iniciación es el proceso más largo debido a la estimulación paracrina necesaria, mientras que la perpetuación involucra aspas de estimulación tanto paracrina como autocrinas, además, es dependiente de un número de cambios funcionales tales como la proliferación celular y la quimiotaxis, la fibrogénesis, el incremento en la contractilidad y la pérdida de la capacidad de almacenar la vitamina A [18].

Cabe recalcar que el TGF- β 1 es considerado como la citocina profibrogénica más potente, además de ser liberado en una forma latente por una gran cantidad de tipos celulares presentes en el hígado. Una vez que el TGF- β 1 se acopla a su receptor en las HSC, se activa la vía canónica de las Smad promoviendo la activación de las HSC. Otras proteínas que están involucradas en la iniciación y perpetuación de las HSC son el mitógeno PDGF y su receptor el PDGF β , el factor de crecimiento de endotelial vascular y el factor de crecimiento de tejido conectivo [18].

2.8.4 Células endoteliales sinusoidales (LSEC)

Las LSEC constituyen la pared sinusoidal (Figura 4), y representan aproximadamente 15-20% de las células del hígado, aunque solamente el 3% del volumen total del órgano. Las LSEC son células endoteliales altamente especializadas, ya que presentan dentro de sus características la ausencia de lámina basal y la presencia de fenestraciones, esto junto con su capacidad endocitótica las hacen diferentes y únicas de cualquier otra célula endotelial del cuerpo. El tamaño promedio de las fenestraciones varía entre 50 y 150 nm con una densidad de 3 y 23 μm^2 , estos valores también dependen de la localización en el hígado, siendo mayores y más frecuentes cuanto más próximo está el endotelio al espacio portal [19].

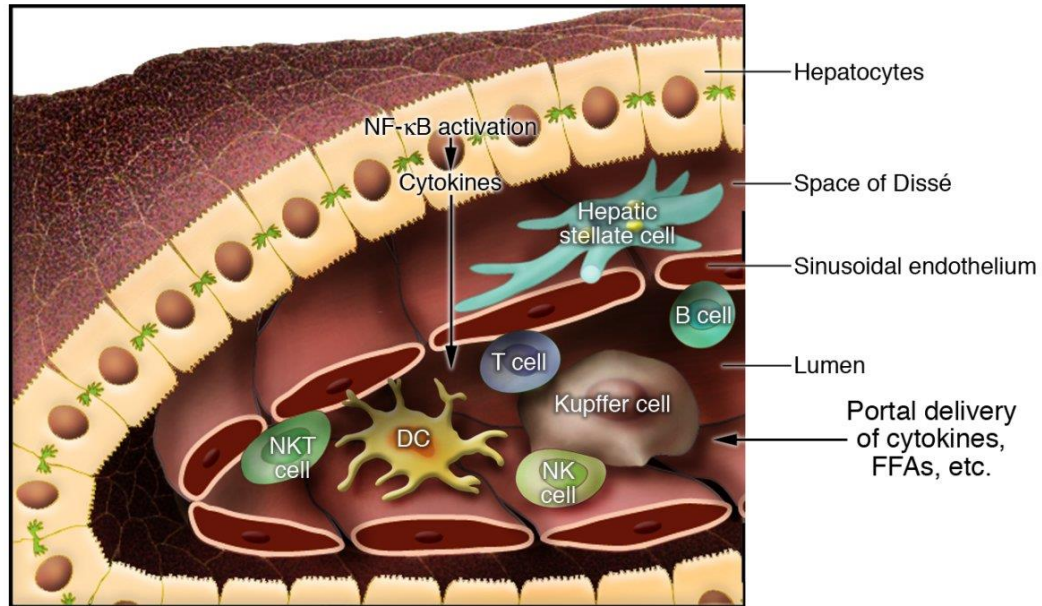


Figura 4. Localización de los tipos celulares presentes en el hígado. Se muestran los hepatocitos, HSC, KC y LSEC [20].

2.9 Daño al hígado

El hígado, al ser el principal órgano en metabolizar agentes nocivos para el organismo, se expone a agresiones de diversa etiología, culminando entonces en un daño agudo (exposición de corto tiempo) o un daño crónico (exposición de tiempo prolongada), de este modo, las funciones propias de este órgano pueden llegar a perder su equilibrio y producirse diversas enfermedades hepáticas. El daño hepático agudo o falla hepática aguda (Figura 5) ocurre cuando se produce un daño masivo en el hígado, perdiendo de forma abrupta las funciones metabólicas e inmunológicas al comprometerse al menos un 70 % de la masa hepática, lo que conduce a encefalopatías, coagulopatías, y en muchos casos, una falla progresiva en múltiples órganos. La necrosis del tejido hepático es característica de este tipo de daño, lo que se traduce en la pérdida del metabolismo de proteínas, carbohidratos y lípidos [21]. Por otro lado, el daño hepático crónico (Figura 5) se considera como aquella agresión persistente al parénquima hepático en conjunto con la acumulación de proteínas de ECM, ocasionando a su vez una distorsión del parénquima hepático por la formación de cicatrices fibróticas, y la subsecuente formación de nódulos de regeneración, clásicamente se describe la inflamación y la necrosis que persiste en el tiempo como la causa de la fibrosis [22].

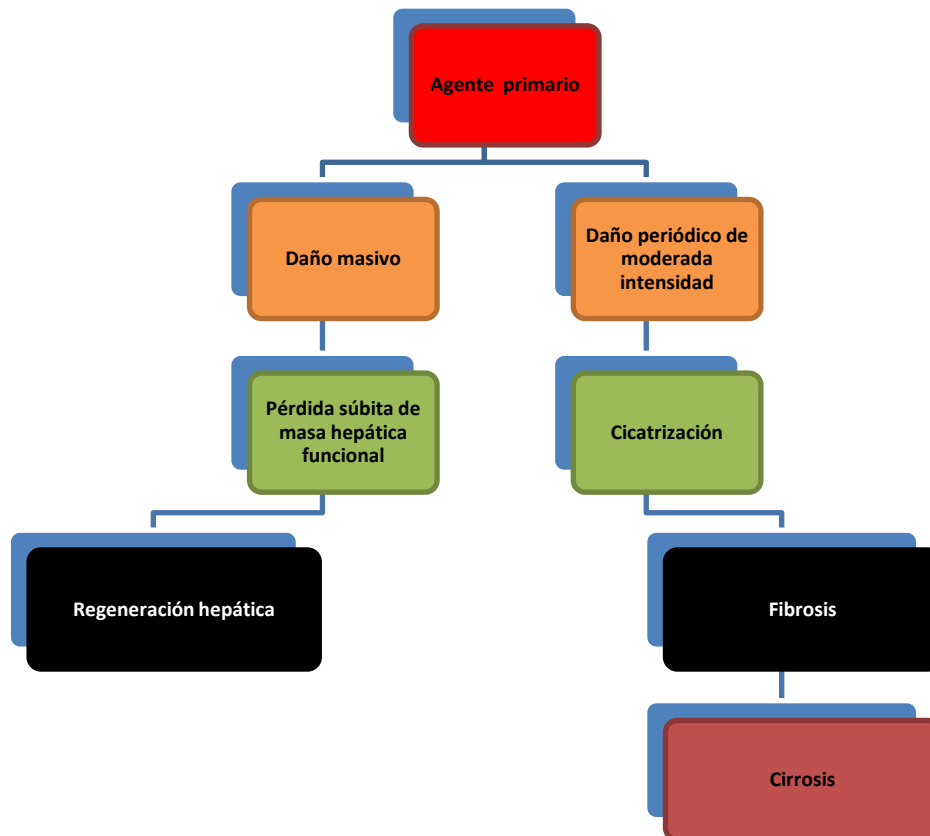


Figura 5. Esquema de los tipos de daño que se presentan en el hígado ante algún agente etiológico y tiempo de exposición.

2.9.1 Fibrosis y cirrosis hepática

La fibrosis hepática resulta del daño crónico por algún agente etiológico acompañada de la excesiva deposición de proteínas de ECM, que distorsiona la arquitectura hepática por la formación de cicatrices fibróticas y la subsecuente formación de nódulos de regeneración; ocurre en muchos tipos de enfermedades hepáticas crónicas, cabe mencionar que la fibrosis en un estadio avanzado que da lugar al desarrollo de la cirrosis [22].

2.9.1.1 Origen y diagnóstico

El inicio de la fibrosis hepática puede ser insidioso, la historia natural está influenciada tanto por factores genéticos, así como ambientales. En la mayoría de los pacientes, la progresión hacia la cirrosis ocurre entre 15-20 años, siendo la ascitis, la falla renal, encefalopatía hepática, el sangrado visceral y la hipertensión portal que resulta de un aumento en la resistencia intrahepática combinada con un aumento en el

flujo sanguíneo portal y la vena hepática resultan ser las mayores complicaciones de la cirrosis.

Los pacientes pueden permanecer libres de complicaciones severas por años, a esto se le llama cirrosis compensada, mientras que la descompensada se asocia a una corta supervivencia, siendo el trasplante de hígado el único tratamiento posible. Por otro lado, la cirrosis puede progresar hacia el cáncer hepatocelular. En la Tabla 1 se muestran los factores genéticos y ambientales asociados a la fibrogénesis.

Tabla 1. Factores genéticos y ambientales asociados con la progresión de la fibrosis en diversos tipos de enfermedades crónicas hepáticas [22].

Enfermedad hepática	Gen candidato	Ambiental
Infección crónica por HCV	<ul style="list-style-type: none"> - HFE. -Angiotensinógeno. -TGF-β. -TNF-α. - ApoE. - MEH. - MCP-1. - MCP-2. -Factor V. 	<ul style="list-style-type: none"> -Consumo de alcohol. -Coinfección con el virus de la hepatitis B (HBV) o por infección del mismo. -Edad en la que se presenta una infección aguda. -Trasplante de hígado. -Diabetes mellitus. -Falta de respuesta a la terapia antiviral
Alcoholismo	<ul style="list-style-type: none"> - IL-10. -IL-1β. - ADH. - ALDH. - CYP2E1. -TNF-α. - CTLA-4. -TAP-2. -MnSOD. 	<ul style="list-style-type: none"> -Consumo de alcohol. -Episodios de hepatitis alcohólica.
NASH	<ul style="list-style-type: none"> - HFE. -Angiotensinógeno. -TGF-β. 	<ul style="list-style-type: none"> -Edad. -Obesidad severa. -Diabetes mellitus. -Hipertrigliceridemia.
Cirrosis biliar primaria	<ul style="list-style-type: none"> -IL-1β. -TNF-α. -ApoE. 	
Hepatitis autoinmune	<ul style="list-style-type: none"> -HLA-2. 	<ul style="list-style-type: none"> -Hepatitis autoinmune tipo 2. -Falta de respuesta a la terapia.

La prueba de oro para determinar la fibrosis es hasta ahora la biopsia hepática, sin embargo, se ha propuesto el uso de ensayos de laboratorio para encontrar otros marcadores que no supongan un riesgo, ejemplo de ellos, es la medición de la actividad plasmática de enzimas como la FA, la γ -GTP, la ALT y la AST [22].

2.9.1.2 Patogénesis de la fibrosis hepática

La fibrogénesis es vista comúnmente como un proceso dinámico estrictamente relacionado a la extensión y duración del daño al parénquima, resulta de la respuesta que presenta el hígado al curar las heridas bajo lesiones realizadas de manera repetida; de modo que después de una lesión aguda las células parenquimatosas se regeneran y reemplazan a las células necróticas o apoptóticas, este proceso está asociado a una respuesta inflamatoria y una limitada deposición de ECM. No obstante, si la lesión persiste, eventualmente la regeneración hepática falla, produciéndose entonces un sustitución de hepatocitos en el parénquima acompañado de una abundante acumulación de ECM incluyendo colágena fibrilar [23].

La fibrosis hepática está asociada a un desbalance en la cantidad y composición de la EMC, presentándose en estadios avanzados hasta seis veces más ECM (incluyendo colágena I, III y IV) que en un hígado sano, como fibronectina, elastina, laminina, ácido hialurónico y proteoglicanos. Esto se debe a que disminuye la actividad de las metaloproteinasas (MMP), que son las encargadas de remover la ECM por la elevada expresión TIMPs [24].

Las HSC activadas (Figura 6) después de un daño crónico adquieren capacidad contráctil pro-inflamatoria y pro-fibrogénica, además son las principales productoras de ECM. Los marcadores que expresan las HSC en su estado quiescente son característicos de los adipocitos, mientras que al activarse expresan marcadores mitogénicos tales como la α -actina de músculo de liso (α -SMA) [22].

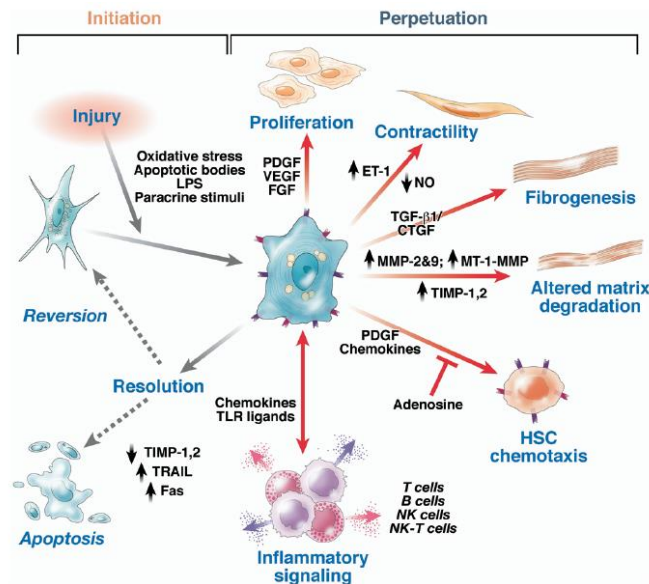


Figura 6. Iniciación y perpetuación de las HSC. Características fenotípicas que adquieren después de una lesión [25].

En el desarrollo de la fibrosis, una compleja interacción entre diferentes tipos celulares se lleva a cabo, en primer lugar los hepatocitos, por encargarse de los procesos metabólicos en el hígado, son blancos para muchos compuestos que al ser biotransformados pueden dar lugar a moléculas hepatotóxicas, también al exponerse a infecciones virales y sales biliares. Una vez que se produce el daño en los hepatocitos, estos liberan ROS o mediadores fibrogénicos e inducen el reclutamiento de leucocitos por las células inflamatorias. Las células inflamatorias más que otras son las encargadas de activar a las HSC para secretar la colágena, además, la apoptosis de los hepatocitos dañados estimula las acciones fibrogénicas de los miofibroblastos hepáticos. Las HSC activadas liberan quimosinas inflamatorias, expresan moléculas de adhesión celular y modulan la activación de linfocitos. Como consecuencia de lo anterior, se produce un círculo vicioso en el que las células inflamatorias y fibrogénicas se activan unas a otras. Por otro lado, las KC son macrófagos propios del hígado, que tienen un papel muy importante en la inflamación del hígado al liberar ROS y citocinas. Finalmente, los cambios producidos en la composición de la ECM pueden estimular directamente la fibrogénesis, por ejemplo, la colágena tipo IV y el fibrinógeno son capaces de estimular a las HSC residentes por la activación del TGF- β 1, la colágena fibrilar por su parte, se puede activar a las

HSC vía integrinas, además, la ECM alterada puede servir como reservorio para factores de crecimiento y MMPs [22].

2.9.1.3 *Terapias antifibrogénicas*

Existe amplia evidencia sobre el uso de posibles agentes terapéuticos en modelos de cirrosis experimental. En este sentido, varios compuestos de origen natural han demostrado poseer efectos positivos sobre esta hepatopatía. Muchos de los tratamientos se enfocan en el hecho de prevenir el desarrollo de la fibrogénesis, particularmente al bloquear la activación de las HSC. Algunos ejemplos de estos compuestos son la naringenina [26], la quercetina [27] y la hoja de estevia [28]; todos han demostrado ser capaces de prevenir y/o revertir la cirrosis experimental, principalmente al bloquear la activación de las HSC al intervenir dentro las vías canónica y no canónica de las Smads, además de poseer efectos antioxidantes e inmunoreguladores. Lo anterior demuestra que el uso de las terapias de origen natural puede ser una herramienta eficaz en la prevención de la fibrosis y la cirrosis en el humano.

Por otro lado, muchos blancos terapéuticos han sido propuestos para el desarrollo de fármacos antifibróticos, entre ellos se incluyen reducir el agente causal primario, reducir el daño utilizando hepatoprotectores, bloquear la activación de las HSC, promover la apoptosis o reversión de las HSC activadas y estimular la degradación de la ECM.

2.9.1.4 *Modelo de daño hepático inducido por TAA*

El uso de modelos experimentales para el estudio de la cirrosis ha ayudado de sobre manera a entender tanto los mecanismos fisiopatológicos como los moleculares en el desarrollo y progresión de esta hepatopatía. Casi todas las lesiones que se pueden presentar en el humano pueden ser inducidas experimentalmente, ya sea la necrosis, la esteatosis, las lesiones venulares hepáticas, la colestasis y la cirrosis.

En los modelos de daño hepático se pueden utilizar tanto animales completos o cultivos celulares, el uso de los animales completos es esencial para demostrar que cierto agente es capaz de causar un efecto nocivo con relevancia fisiológica. En el uso de animales, las ratas destacan debido a su fácil manipulación y bajo costo respecto

de otros modelos, además, el uso de un modelo en común permite hacer correlaciones con los hallazgos realizados por diversos grupos de trabajo.

Uno de los hepatotóxicos más ampliamente utilizados que emula la cirrosis es la TAA, anteriormente se utilizaba como solvente para la industria del papel y tratamiento del cuero, este compuesto es soluble en agua y en alcohol; además de ser hidrolizable por ácidos y bases, también puede reaccionar con sales y metales pesados. La TAA se biotransforma en tioacetamida sulfóxido (TASO) por la isoforma CYP2E1 o por la flavín monooxigenasa (FMO) (Figura 7), un radical altamente reactivo, el cual posteriormente también puede ser biotransformado por la misma enzima a tioacetamida disulfóxido (TASO₂), estos dos metabolitos son capaces de inducir daño a las membranas celulares y otros organelos produciendo peroxidación lipídica, así como especies reactivas de oxígeno (ROS) por la unión covalente a macromoléculas como proteínas en sus lisinas de las cadenas laterales, llevando a un estado de estrés oxidante y agotamiento del sistema antioxidante, todo esto, a su vez, conlleva en daño centrolobulillar y lesión en el hígado que desencadena un proceso inflamatorio, posterior fibrogénesis y desarrollo de cirrosis hepática por la activación de las HSC [29,30].

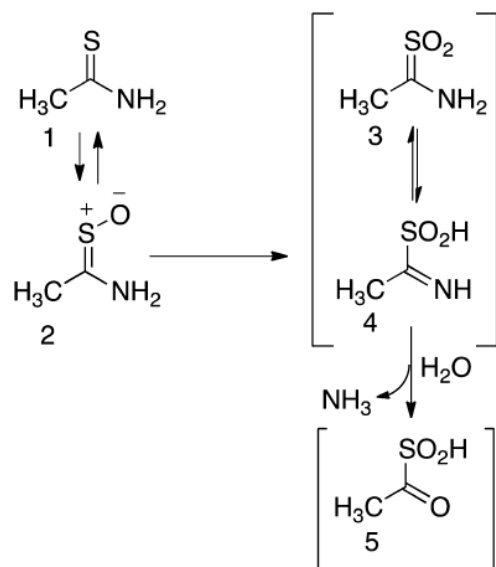


Figura 7. Formación de metabolitos de la TAA. Estructura de la TAA (1), de la TASO (2), de los tautómeros de la TASO₂ (3 y 4) y del ácido acetil sulfínico (5) [31].

2.10 Esteviósido

El esteviósido es un glucósido diterpenoide (terpenos con 20 carbonos; figura 8), que se compone de un esqueleto llamado esteviol (aglicona) unido a tres moléculas de glucosa, este diterpenoide se extrae de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni, que es originaria de las regiones de Paraguay y Brasil, de esta misma planta se extraen compuestos relacionados con el esteviósido con los que comparte como esqueleto común al esteviol, estos compuestos son los rebaudiósidos A-E y dulcósido A. Cabe mencionar que el esteviósido es el diterpenoide mayoritario con una relación de 5-10% en las hojas secas de estevia, seguido por el rebaudiósido A con un 2-4%.

El esteviósido es considerado como un sustituto de la sacarosa y endulzante natural, esto se debe a que es 300 veces más dulce que la sacarosa. Sin embargo, a pesar de su sabor dulce, el esteviósido también presenta un resabio amargo después de probarlo. El esteviósido se ha utilizado en gran variedad de productos alimenticios como mariscos deshidratados, salsa de soja, dulces, etc. En países como Brasil, Corea y Japón se ha aprobado su consumo en humanos, mientras que en E.U.A. se utiliza como suplemento alimenticio. Por su parte el Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additive (JECFA) propuso temporalmente que el consumo de esteviósido fuese de 5 mg/kg en el 2006. Una vez que ingresa por vía oral, el esteviósido es hidrolizado por bacterias de la microbiota en el tracto gastrointestinal para cortar las moléculas de glucosa del esteviol.

Dentro de los efectos terapéuticos que se le han encontrado al esteviósido están el anti-hiperglicémico, antihipertensivo, anti-cancerígeno y anti-inflamatorio [8]. En éste último apartado, se ha demostrado la capacidad del esteviósido tanto en modelos *in vivo* como en *in vitro*, al ser usado como agente anti-inflamatorio en inflamación causada en la piel por 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato[32]. En otros estudios, el esteviósido previno la liberación de las citocinas TNF- α e IL-1 β , así como de óxido nítrico en células THP1 (monocitos humanos) expuestas a LPS, al interferir con la vía de señalización del NF- κ B, importante factor de transcripción dentro de la respuesta inmunológica. Además, en el mismo estudio, el esteviósido mostró interactuar con

el toll-like receptor 4 (TLR4), receptor importante durante la inflamación inducida por bacterias gram negativas [33,34].

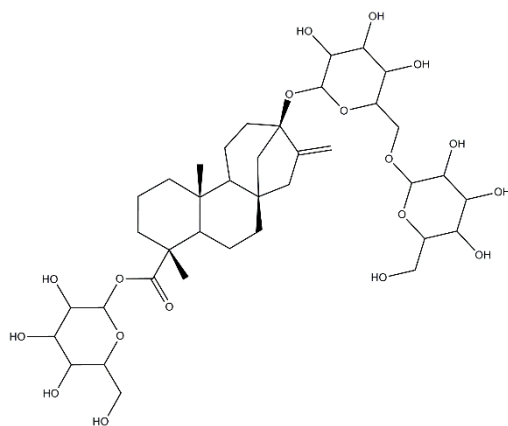


Figura 8. Estructura química del esteviósido.

2. HIPÓTESIS

Debido a las propiedades farmacológicas reportadas para el esteviósido, éste prevendrá la inflamación en producida por una lesión hepática y el subsecuente desarrollo de la cirrosis experimental en un modelo *in vivo*, así como la regulación a la alta de genes pro-inflamatorio y pro-fibrogénicos en un modelo *in vitro* que mimetiza el microambiente hepático.

3. JUSTIFICACIÓN

La cirrosis causa muchas muertes al año, sin embargo, no hay enfoques terapéuticos exitosos para su tratamiento, es por ello que se deben realizar investigaciones de moléculas, ya sea de origen natural o sintético, que tengan la capacidad de ejercer un efecto positivo sobre dicha patología, y de esta forma, ser utilizadas en un futuro como posibles agentes terapéuticos.

4. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Determinar el efecto hepatoprotector del esteviósido para prevenir la lesión hepática inducida por agentes hepatotóxicos en modelos *in vivo* e *in vitro*.

5.2 Objetivos particulares

- Determinar la capacidad del esteviósido para mantener la integridad morfológica y funcional del hígado al ser expuesto de manera crónica a la TAA.
- Comprobar su efecto antioxidante al mantener los valores basales del sistema redox después de la administración del hepatotóxico.
- Determinar la capacidad del esteviósido para evitar la colestasis y necrosis inducidas por la exposición crónica a la TAA.
- Estudiar el efecto del esteviósido para prevenir la inflamación ejercida por el daño con la TAA.
- Evaluar el efecto del esteviósido como agente antifibrogénico para prevenir la activación de las células estelares hepáticas ante la exposición a los hepatotóxicos LPS y EtOH en un modelo *in vitro* de co-cultivo con hepatocitos recombinantes.
- Evaluar el potencial del esteviósido para prevenir la deposición de colágena ejercida ante la exposición crónica a la TAA.
- Determinar si el esteviósido es capaz de acoplarse a receptores relacionados a la vía canónica de activación del NF- κ B a través de ensayos *in silico*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales.

El esteviósido, la TAA, el LPS, el DPPH, la hematoxilina, la BSA, la cloramina-T, el ácido tiobarbitúrico, la L- γ -glutamyl-*p*-nitroanilina, el *p*-dimetilaminobenzaldehído y el *p*-nitrofenilfosfato utilizados en este estudio fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). El etanol, el metanol, el tolueno, la eosina y el formaldehído fueron obtenidos de J. T. Baker (Ciudad de México, México). El resto de los reactivos utilizados en el proyecto fueron de la mejor calidad comercial posible.

Diseño experimental con el uso de animales (*in vivo*).

En todos los experimentos realizados, se utilizaron ratas Wistar macho obtenidas de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) perteneciente al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN) y manejadas de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción cuidado y uso de los animales de laboratorio. Se ocuparon ratas macho de la cepa Wistar con una *n* final de 8 y con un peso inicial aproximado de 100-120 g; la dosis de TAA fue de 200 mg/kg y se calculó de acuerdo al promedio del peso de las ratas. La administración de la TAA se realizó tres veces por semana por un período de ocho semanas por vía intraperitoneal (i.p.). La TAA se disolvió en solución salina para su administración. La dosis del esteviósido se calculó de la misma manera que para la TAA, siendo de 20 mg/kg de peso. La administración se realizó por un período de ocho semanas dos veces por día de forma intraperitoneal i.p. El esteviósido utilizó el mismo vehículo que la TAA. Las ratas se organizaron en grupos para su evaluación, quedando de la siguiente forma:

- Grupo 1: Ratatas tratadas control.
- Grupo 2: Ratatas tratadas con TAA.
- Grupo 3: Ratatas tratadas de forma simultánea con TAA y esteviósido.
- Grupo 4: Ratatas tratadas con esteviósido.

Una vez terminó el período de tratamiento, las ratas fueron sacrificadas bajo anestesia con una mezcla de ketamina/xilacina, (100 mg/8 mg/kg de peso respectivamente) por

vía intraperitoneal. La sangre se colectó por punción cardíaca y el hígado se extirpó para ser mantenido a -70 °C hasta realizar ensayos futuros.

Tabla 2. Grupos experimentales

Grupo	Duración	Dosis (admon. Ip.)
Control	8 semanas	1 mL dos veces por día
TAA	8 semanas	200 mg/kg tres veces por semana. TAA: 200 mg/kg tres veces por semana
STV+TAA	8 semanas	STV: 20 mg/kg dos veces al día
STV	8 semanas	20 mg/kg dos veces al día.

Diseño experimental con el uso de co-cultivos de células hHSC/VL-17A (*in vitro*).

Las HSC humanas (hHSC) fueron aisladas por personal del laboratorio del Dr. Raj M. Lakshman en el Hospital de Veteranos de Washington, D. C., U.S.A, a través de la digestión con pronasa y colagenasa, a partir de biopsias de hígados de pacientes con obesidad mórbida que fueron sometidos a baipás (protocolo IRB 070701), además las hHSC fueron separadas utilizando OptiPrep™ Density Gradient Medium (Sigma, St Louis, MO, USA). La autorización de los pacientes fue obtenida a través de un consentimiento informado, y el protocolo de estudio fue ajustado a las directrices éticas de la Declaración de Helsinki de 1975 tal como se refleja en la aprobación previa por el Comité de Revisión Institucional.

Por otro lado, las células VL-17A fueron amablemente obsequiadas por el Dr. Dahn L. Clemens. Estas se desarrollaron en su laboratorio a partir de células Hep G2 obtenidas del American Type Culture Collection, desarrollando a las células VA-13 (que expresan el gen murino ADH clase I). Posteriormente, transfectaron a estas células con el vector pIV-G2, que fue les fue amablemente obsequido por el Dr. Frank Gonzalez (National Cancer Institute, Bethesda, MD, USA) conteniendo la región del gen para el citocromo CYP2E1 humano con el uso de Lipo TAXI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células recombinantes fueron seleccionadas en un medio de cultivo conteniendo G418 y zeocina a 400 µL/mL cada uno.

Las células hHSC/VL-17A se cultivaron en una relación 1:10, mimetizando estrechamente las condiciones de un hígado completo *in vivo*. Los co-cultivos crecieron hasta la semi-confluencia en DMEM-f12 suplementado con SFB al 10% (v/v), penicilina/estreptomicina al 1% (v/v), 5 mg/1 mL de ITS y dexametasona al 10^{-7} M, 5 μ L/10 μ L de neomicina, 4 μ L/1 mL de zeocina y 8 μ L/1 mL de G418. Dieciocho horas antes de la incubación con LPS o EtOH, los medios de cultivo fueron reemplazados con DMEM-F12 reducido en SFB (0.1 %, v/v) para sincronizar la actividad celular. Posteriormente las células fueron tratadas como se indica a continuación:

- Grupo 1: Control.
- Grupo 2: Co-cultivos incubados con LPS o EtOH.
- Grupo 3: Co-cultivos incubados con 1mL de LPS o 100 mM de EtOH y esteviósido.
- Grupo 4: Co-cultivos incubados con esteviósido al 1, 5, 10, 20 y 100 mM.

Los diferentes grupos se mantuvieron a 37 °C y 5% de CO₂ en una incubadora por dieciocho horas.

Determinaciones de marcadores en plasma e hígado

Durante el período de tratamiento, las ratas fueron pesadas semanalmente para determinar la ganancia de peso que éstas obtenían, además, el día del sacrificio se obtuvo el peso final así como el peso del hígado. Las ratas fueron sacrificadas por exanguinación realizando una punción cardíaca (bajo anestesia con un cocktail de ketamina a una dosis de 100 mg/kg y de xilacina a una dosis de 8 mg/kg) a las ocho semanas de haber empezado el tratamiento. La sangre obtenida fue centrifugada a 3000 rpm durante 15 minutos para separar el suero de los demás componentes sanguíneos; en el suero obtenido se determinaron los siguientes parámetros: actividad enzimática de la FA, γ -GTP y ALT. Además, se extrajo el hígado, el cual se utilizó para realizar otras pruebas tales como: determinación de la cantidad de proteínas hepáticas, la peroxidación lipídica, el glucógeno, el GSH, la colágena, diversos western blots y qPCRs (ver más adelante). Por otro lado, se realizaron cortes del

lóbulo mayor del hígado, para llevar a cabo el análisis histológico, utilizando las tinciones tricrómica de Masson (TM) y de hematoxilina y eosina (H&E) para evaluar el grado de fibrosis que se generó durante el daño hepático así como el cambio en el parénquima hepático. Además, también se obtuvieron cortes para ensayos inmunohistoquímicos.

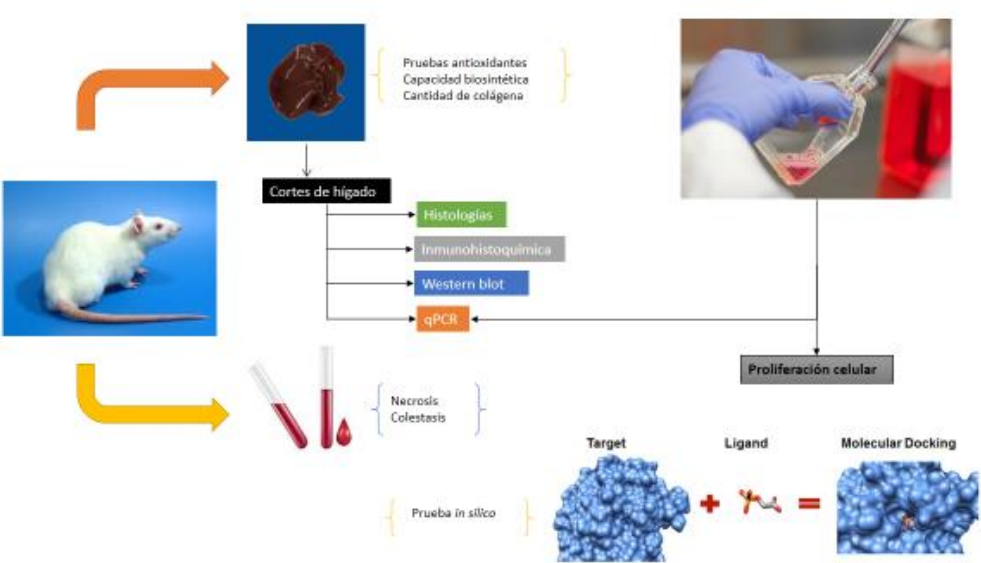


Figura 9. Esquema representativo del protocolo utilizado.

Técnicas

6.4.1 Determinación de la actividad de la enzima FA

El fundamento tras esta técnica es que la FA cataliza la hidrólisis del enlace éster fosfórico entre un grupo orgánico y un grupo fosforilo a pH alcalino, lo que libera fosfato al medio. La actividad enzimática de la FA se determina mediante un método colorimétrico desarrollado por Berger y Rudolph en 1956; éste se basa en un complejo colorido resultado del metabolismo de un éster, el *p*-nitrofenilfosfato, dando lugar a la formación de fosfato y *p*-nitrofenol, el cual se lee a una longitud de onda de 410 nm.

Se describe la técnica a continuación:

- ❖ Se colocaron dos series de ocho tubos de 15X150 mm y en cada tubo se adicionaron:
 - 250 µL de buffer de glicina 0.1 M-MgCl₂ 1 mM, pH 10.5
 - 250 µL de sustrato *p*-nitrofenilfosfato
- ❖ Previa incubación por 5 minutos a 37 °C, se inició la reacción con 50 µL de suero y se mezcla suavemente.
- ❖ Se incubó por un lapso de 30 min, y se detuvo la reacción con 5 mL de NaOH 0.02 N.
- ❖ Al término de la incubación, se realizó la lectura a una longitud de onda de 410 nm, y se cuantificó la *p*-nitroanilina producida mediante la interpolación de la absorbancia en una curva estándar.
- ❖ Se hizo un blanco sustituyendo los 50 µL de suero por agua.

6.4.2 Determinación de la actividad de la enzima γ -GTP

El fundamento que respalda esta prueba es que la γ -glutamyl-*p*-nitroanilida, en un medio alcalino (pH 8.2) y en presencia de iones Mg^{2+} transfiere grupos γ -1-glutamyl a una molécula receptora (glicil-glicina), la reacción es catalizada por la enzima γ -GTP, produciéndose la *p*-nitroanilina, metabolito que se puede cuantificar mediante una técnica colorimétrica y el uso de un espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm.

Se describe la técnica a continuación:

- ❖ Se colocaron dos series de nueve tubos de 15X150 mm y en cada tubo se adicionaron:
 - 400 μ L de Tris-HCl 200 mM a pH 8.2
 - 100 μ L de $MgCl_2$ 200 mM
 - 100 μ L de glicil-glicina 40 mM, pH de 8.2
 - 200 μ L de γ -glutamyl-*p*-nitroanilida
- ❖ Previa incubación por 10 min a 37 °C, se inició la reacción con 200 μ L de suero.
- ❖ Se incubó por un lapso de 30 min, y se detuvo la reacción con 2 mL de ácido acético 1.5 M.
- ❖ Al término de la incubación, se realizó la lectura a una longitud de onda de 410 nm, y se cuantificó la *p*-nitroanilina producida mediante la curva estándar.
- ❖ Se hizo un blanco sustituyendo los 200 μ L de suero por agua.

La reacción es lineal en el tiempo hasta la utilización de aproximadamente el 10% del sustrato (producción de aproximadamente 200 nmoles de *p*-nitroanilina en la mezcla de la reacción).

6.4.3 Determinación de la actividad de la enzima ALT

Para determinar la actividad de esta enzima en suero, se utiliza el método colorimétrico desarrollado por Reitman y Frankel en 1957; éste se basa en un complejo colorido resultado de la transferencia del grupo amino de la alanina al aceptor 2-oxoglutarato o α -cetoglutarato, resultando en la formación de piruvato que reacciona con la 2,4-dinitrofenilhidracina (2,4-DNPH) formando el derivado colorido 2,4-dinitrofenilhidrazona, el cual se lee a una longitud de onda de 515 nm.

Se describe a continuación la técnica:

- ❖ Se colocaron tres series de ocho tubos de 15 × 150 mm y en cada tubo se adicionó lo siguiente:

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

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

Esta determinación consiste en la formación de un complejo colorido azul entre los residuos de aminoácidos básicos de proteínas y el colorante azul brillante de Coomassie. Este último presenta dos coloraciones, una roja y otra azul. La forma de color rojo se convierte en azul cuando se une a las proteínas. La intensidad de la absorbancia es proporcional al contenido de aminoácidos básicos y aromáticos y se lee a 595 nm.

Se describe la técnica a continuación:

❖ Reactivo de Bradford:

- Ácido fosfórico al 85 % 100 mL
- Alcohol etílico 50 mL
- Azul brillante de Coomassie G-250 100 mg
- Se afora a un litro con agua tridestilada

- ❖ Se colocaron tres series de ocho tubos de 13 × 100 mm.
- ❖ En una serie de ocho tubos, se tomaron 100 µL de homogeneizado de hígado y se lleva a 1,000 mL con agua tridestilada.
- ❖ Se tomaron alícuotas para proteínas y se llevan a 100 µL con agua en las siguientes dos series de ocho tubos (de la dilución anterior se toman 20 µL más 80 µL de agua tridestilada).
- ❖ Se añadió 2,400 µL del reactivo de Bradford.
- ❖ Terminado el proceso anterior, se leyó la absorbancia del complejo colorimétrico a 595 nm.
- ❖ Se preparó un blanco sustituyendo el homogenizado de hígado por 100 µL de agua.

6.4.5 Determinación del grado de peroxidación lipídica

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

Se describe la técnica a continuación:

- ❖ Reactivos:
 - Tris-HCl 150 mM a pH 7.4
 - Ácido tricloroacético (TCA)
 - Ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.375% p/v en TCA al 15% (se prepara en el momento la cantidad necesaria).

- ❖ Se usaron dos series de 8 tubos de 13 × 100 mm y una serie de 8 tubos de 22 × 175 mm.
- ❖ Se pesó 0.5 g de hígado y se homogeneizó en 5 mL de agua.
- ❖ Se tomaron 300 µL del homogeneizado al 10 % y se agregaron 700 µL de Tris-HCl 150 mM, pH 7.4 para completar a 1 mL.
- ❖ Se agregaron 2 mL de TBA al 0.375% disuelto en TCA al 15%.
- ❖ Se pusieron a ebullición por 45 min.
- ❖ Se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos y se lee el sobrenadante a 532 nm.
- ❖ Se realizó un blanco con 1 mL de Tris-HCl 150 mM, pH 7.4

6.4.6 Determinación de los niveles de GSH

El fundamento de esta técnica se basa en la medición de grupos sulfhidrilo. En 1959, Ellman¹⁵ introduce el uso del ácido 5,5'-ditio-*bis*-(2-nitrobenzoico) también conocido como DTNB, un compuesto versátil soluble en agua para la cuantificación de grupos sulfhidrilo. El DTNB reacciona con grupos sulfhidrilo libres para producir una mezcla de disulfuro y ácido 2-nitro-5-tiobenzoato (TNB). El sitio diana del DTNB es la base conjugada (R-S*) de un grupo sulfhidrilo libre. Por lo tanto, la velocidad de esta reacción es dependiente de varios factores: 1) el pH de la reacción, 2) el pKa de los grupos sulfhidrilo y 3) los efectos estéricos y electrostáticos. El TNB es la especie colorida (amarillo) es esta reacción; el coeficiente de extinción del TNB se observa a 412 nm a pH de 8.

Se describe la técnica a continuación:

❖ Reactivo de Ellman:

- A) 40 mg de DTNB.
- B) 100 mL de citrato de sodio al 1%.
- Disolver A en B.

❖ Solución de fosfatos Na_2HPO_4 0.3 M (disuelto en agua; se agitó antes de usar).

❖ Solución precipitante: EDTA 5 mM en TCA 5 %. Se disolvió el EDTA en el TCA.

❖ Se homogeneizó 0.3 g de hígado en 1.2 mL de solución precipitante.

❖ Se centrifugó por 20 minutos a 12,000 rpm.

❖ Se tomó 0.1 mL de sobrenadante (por duplicado) más 1.2 mL de solución de fosfatos más 0.25 mL de reactivo de Ellman.

❖ El blanco se realizó sustituyendo el sobrenadante del homogeneizado por agua.

❖ Se agitó y se leyó a una longitud de onda de 412 nm.

6.4.7 Determinación del glucógeno hepático

La reacción de color para medir la concentración de carbohidratos presentes en el hígado por espectrofotometría se basa en el uso de la antrona, un compuesto que se disuelve en ácido sulfúrico (H_2SO_4). El medio ácido hidroliza el enlace glucosídico de los oligosacáridos, así los monosacáridos resultantes (furfural) reaccionan con la antrona, dando lugar a una coloración verde con un máximo de absorción de 612 nm.¹⁴² La determinación del glucógeno hepático se realiza mediante la técnica de la antrona de Seifter et al. 1950.

Se describe la técnica a continuación:

- ❖ Se pesó 0.5 g. de hígado en ocho tubos 15×150 mm con tapón esmerilado, se les adicionó 1.5 mL de KOH al 30%, se taparon y se hiervi6 en ba6o de agua durante 30 minutos.
- ❖ Despu6s de enfriar, se pasaron cuantitativamente a un matraz volum6trico de 25 mL y se aforaron con agua agitando muy bien.
- ❖ Del matraz anterior, se tom6 de 40 a 160 μ L con una pipeta volum6trica, se llev6 a 1 mL en tubos de 13×100 esmerilados por duplicado, se prepar6 adem6s, un tubo blanco con 1 mL de agua y se los est6ndares (2) con 20 μ L de una soluci6n de glucosa est6ndar (1 mg/mL) y llevan a 1 mL con agua.
- ❖ Se prepar6 una soluci6n de antrona 0.2% en H_2SO_4 concentrado. Se a6adi6 2 mL a cada tubo agitando suavemente (con ayuda de una bureta) y enfri6 sobre hielo.
- ❖ Se taparon los tubos fr6os y se pusieron en un ba6o de agua hirviendo por 15 min.
- ❖ Se enfriaron de inmediato con hielo y se leyeron a una longitud de onda de 620 nm.

6.4.8 Determinación del contenido de colágena

Este método se basa en la determinación de la hidroxiprolina (HP), este iminoácido no esencial es producto de la hidroxilación de la prolina y está presente en la colágena.¹⁴⁴ La HP es sometida a un proceso de oxidación dando como resultado la formación del ácido pirrol-2-carboxílico o pirrol; de esta forma, el reactivo de Ehrlich (*p*-dimetilaminobenzaldehído) al reaccionar con el pirrol forma un complejo color rojo que se lee a 560 nm.

A continuación se describe la técnica:

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

- ❖ Se extrajo la capa de tolueno y se desechó. La porción acuosa se tapó y se colocó en un baño de agua hirviendo durante 20 min.
- ❖ Los tubos se enfriaron 15 minutos en un refrigerador. Ya fríos se les adicionó 6 mL de tolueno y se agitó durante 1 minuto.
- ❖ Se prepararon 18 tubos de 15 × 150 mm y, de la fase de tolueno se tomaron alícuotas por duplicado de 1 mL y se les agregó 4 mL del reactivo de Ehrlich y se agitaron fuertemente.
- ❖ Se dejaron reposar durante 30 min para que se llevara a cabo la reacción colorida. Se leyó a una longitud de onda de 560 nm.

6.4.9 Histología

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

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

Se describe la técnica a continuación:

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

A) Tinción de hematoxilina y eosina.

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

B) Tinción tricrómica de Masson.

- ❖ Se sumergió en el fijador de Bouin 1 hora a 56 °C.
- ❖ Se enfrió y se lavó con agua corriente hasta que el color amarillo desapareció.
- ❖ Se enjuagan con agua destilada.
- ❖ Se sumergió en la solución de hematoxilina de Weigert por 10 min. Se enjuagó con agua corriente al mismo tiempo.
- ❖ Se enjuagó con agua destilada.
- ❖ Se sumergió en la solución de fucsina ácido-escarlata de Biebrich por 15 min. Se recuperó la solución.
- ❖ Se enjuagó con agua destilada.
- ❖ Se sumergió en la solución de ácido fosfomolibdico/ácido fosfotungsténico por 10-15 minutos. Se desechó la solución.
- ❖ Se sumergió en la solución de azul de anilina por 5-10 minutos. Se recuperó la solución.
- ❖ Se enjugó con agua destilada.
- ❖ Se lavó con agua acética al 1% por 3-5 min. Se desechó la solución.
- ❖ Se lavó con alcohol al 95%.

- ❖ Se lavó con alcohol absoluto (dos cambios de alcohol).
- ❖ Se lavó con xileno (dos cambios de alcohol).
- ❖ Se montó en el polímero Permound o bálsamo.

6.5.10 Inmunohistoquímica

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

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

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

6.5.11 Ensayo de inhibición del radical DPPH

Este radical libre es susceptible de reaccionar con compuestos antioxidantes aceptando un átomo de hidrógeno proporcionado por un agente antioxidante.

Se describe la técnica a continuación:

- ❖ Se disolvió en etanol absoluto tanto el agente antioxidante como el radical DPPH (0.1 mM) en soluciones independientes.
- ❖ Se adicionó 2 mL de la solución antioxidante a la solución de DPPH y se agitó vigorosamente.
- ❖ Se dejó en la oscuridad y a temperatura ambiente hasta realizar las mediciones a 517 nm a diferentes tiempos.
- ❖ El grado de pérdida de la coloración morada de la solución indicó el grado de neutralización que ejerce el compuesto antioxidante.
- ❖ El mismo procedimiento se realizó para la solución antioxidante que sirvió como control.
- ❖ El grado de neutralización (radical scavenging activity; RSA) del radical DPPH se calculó siguiendo la siguiente ecuación.

$$RSA (\%) = \left(1 - \frac{A1 - A2}{A3} \right) \times 100$$

Dónde A1 es la absorbancia del compuesto antioxidante, A2 es la absorbancia del blanco, y A3 es la absorbancia del control.

6.5.12 Extracción de RNA y ensayos de PCR cuantitativos

La PCR cuantitativa (qPCR), o en tiempo real, se realiza en un equipo que integra un termociclador convencional y un espectrofluorómetro que determina la fluorescencia que se produce durante la amplificación. La qPCR combina entonces la amplificación de DNA con la detección al mismo.

Se describe la técnica a continuación para el modelo *in vivo*:

- ❖ 0.1 g de muestra de hígado se usó para extraer el RNA total utilizando el reactivo Trizol y siguiendo las instrucciones del fabricante.
- ❖ Se determinó la integridad y concentración de RNA por espectrofotometría a 260/280 nm.
- ❖ El RNA se retrotranscribió en 19.3 μL de la mezcla de reacción que consistió de 10 μL de muestra más 2.5 μL de buffer RT, 1 U/ μL de oligo (dT), 1 μL de inhibidor de RNasas (40 U/ μL), 0.5 mM de mezcla de dNTP y 0.3 μL de la enzima transcriptasa reversa M-MuLV (200 U/ μL).
- ❖ Se ocuparon las siguientes condiciones en los ciclos: 65 °C por 5 min, 37 °C por 60 min, 70 °C por 15 min y 4 °C por 5 min.
- ❖ Se utilizó polimerasa Taq para amplificar las secuencias de DNA complementario y sondas TaqMan marcados con FAM para incrementar la especificidad del ensayo.
- ❖ La mezcla de reacción consistió en 12.5 μL conteniendo 5 μL de TaqMan, 0.5 μL de la sonda, 1 μL de la muestra (1 ng/ μL) y 3.5 μL de agua libre de nucleasas.
- ❖ Las condiciones de la qPCR fueron las siguientes: 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 15 s y 60 °C por 1 s.
- ❖ Se utilizó un gen endógeno como control así como los controles respectivos. La expresión relativa de los genes se calculó usando el método de Livak como sigue:

$$2^{-\Delta Ct} \{ [Ct (\text{gen experimental blanco}) - Ct (\text{gen edógeno experimental})] - [Ct (\text{gen control blanco}) - Ct (\text{gene endógeno control})] \}$$

Se describe la técnica a continuación para el modelo *in vitro*:

- ❖ Para el caso de los co-cultivos, 1 mL Trizol se utilizó para romper la integridad de las células, a continuación se procedió como lo indica el fabricante.
- ❖ La integridad y la concentración del RNA se determinó como se mencionó anteriormente para el modelo *in vivo*.
- ❖ El RNA se retrotranscribió en 20 μL de mezcla de reacción que consistió en 1 μL de muestra más 1 μL de Oligo dT₁₂₋₁₈ (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y 10.5 μL de agua libre de nucleasas (la mezcla se incubó por 10 min a 72°C), después se adicionó 4 μL buffer iniciador, 1 μL de inhibidor de RNasas (40 U/ μL), 1 μL dNTP 10 mM, 0.5 μL DTT 0.1 M y 1 μL de la enzima M-MLV (200 U/ μL).
- ❖ Se ocuparon las siguientes condiciones en los ciclos: 37 °C por 1 h, 94 °C por 8 min y 4 °C por 5 min.
- ❖ Se utilizó el sistema SYBR Green marcados con ROX para detectar la amplificación de las secuencias de DNA complementario.
- ❖ La mezcla de reacción consistió en 20 μL conteniendo 10 μL de SYBR Green, 1 μL de la mezcla de oligos, 2 μL de la muestra (1ng/ μL) y 7 μL de agua libre de nucleasas.
- ❖ Las condiciones de la qPCR fueron las siguientes: 95 °C por 5 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 s a diferente T_M (dependiendo del gen a probar) y 72 °C por 1 min.
- ❖ Se utilizó un gen endógeno como control así como los controles respectivos. La expresión relativa de los genes se calcula usando el método de Livak mostrado anteriormente.

6.5.13 Ensayo de zimografía

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

Se describe la técnica a continuación:

- ❖ 0.25 g de muestra de hígado se homogenizaron con 1.7 mL de PBS, en hielo con un homogenizador, después se sonicaron y se centrifugaron a 13,000 g por 10 min.
- ❖ El sobrenadante se recolectó y las proteínas se cuantificaron por el método de BCA.
- ❖ Volúmenes equivalentes a 50 µg de proteínas sin someter a ebullición se mezclaron con buffer de muestra (2.5% de SDS, 1% de sacarosa y 4 mg/mL de rojo de fenol), sin un agente reductor.
- ❖ Las muestras se sometieron a electroforesis a 72 V por 2 h, en un gel al 8% de acrilamida co-polimerizada con gelatina porcina (1 mg/mL).
- ❖ Después de la electroforesis, los geles se lavaron dos veces 2.5% Tritón X-100 para remover el SDS, posteriormente se incubó en buffer de Tris-HCl (50 mM-pH 7.4) y 5 mM de CaCl₂ a 37 °C por 48 h.
- ❖ Los geles se fijaron y tiñeron con azul brillante de Coomassie 0.25% en ácido acético y 30% de etanol.
- ❖ La actividad proteolítica se detectó como bandas claras que contrarrestan con un fondo azul de sustrato sin digerir en el gel.

6.5.14 Ensayo de síntesis de DNA

La bromodesoxiuridina (BrdU, 5-bromo-2-desoxiuridina) es un nucleótido sintético halogenado análogo de la timidina incorporando un grupo bromuro incorporado en el quinto carbono de la cadena. Debido a su alta homología con la timidina, se incorpora con una eficiencia aproximada del 99.8-100% durante la fase de síntesis en las células substituyendo al nucleótido y permitiendo entonces poder detectar la síntesis de DNA a través de anticuerpos monoclonales.

Se describe la técnica a continuación:

- ❖ La técnica de BrdU se siguió de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Abcam Cat#ab126556) utilizando un kit con todos los reactivos necesarios incorporados en el mismo.
- ❖ Las células se sembraron en placas de 96 pozos a 2×10^5 células/mL en 100 μ L de medio de cultivo.
- ❖ El reactivo a probar se adicionó a las concentraciones deseadas por el tiempo que el experimento así lo requiriera en 100 μ L de medio de cultivo celular y se incubó con las células.
- ❖ Una vez terminado el tiempo de incubación, se adicionó el BrdU y se dejó incubar junto con las células por el tiempo que el experimento lo requiriera.
- ❖ Una vez terminado el tiempo de incubación, se adicionó el anticuerpo primario (100 μ L/pozo) y se incubó por 1 h a temperatura ambiente.
- ❖ Seguido a esto, se adicionó el anticuerpo secundario (100 μ L/pozo) y se incubó por 30 min a temperatura ambiente.
- ❖ Finalmente, se adicionó el sustrato de TMB peroxidasa (100 μ L/pozo) y se dejó incubar por 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. Una solución de parada se adicionó pasado este tiempo y se realizaron lecturas a 450 y 550 nm.

6.5.15 Ensayo de docking o acoplamiento molecular

Los estudios de docking se usan principalmente como una forma predictiva de elucidar las posibles interacciones moleculares entre dos moléculas llamadas receptor y ligando en una forma estable.

Se describe la técnica a continuación:

Análisis conformacional

- ❖ El ligando se construyó en el software Avogadro respetando siempre las distancias entre los átomos.
- ❖ Una vez diseñado el ligando, se procedió a realizar una optimización de este usando las herramientas del software así como de buscar su conformero de mínima energía utilizando el campo de fuerza MMFF94 y el método de Montecarlo, con esto obteniendo el ligando más estable.
- ❖ Una vez realizado esto, se optimizó la geometría del ligando con la menor energía y la mayor población por DFT a nivel de teoría B3LYP/DGDZVP utilizando otro software especializado como Gaussian.

Estudio de docking

- ❖ Una vez el ligando fue optimizado, se preparó para el estudio *in silico* utilizando software especializado como AutoDock.
- ❖ Se asignaron valores por defecto para el árbol de torsión del ligando y para las cargas de Gasteiger-Marsili en el AutoDock.
- ❖ El estudio de docking se llevó a cabo utilizando un receptor obtenido desde RSCB Protein Data Bank (archivo cristalográfico), a la que previamente se le debió de retirar moléculas que no le pertenezcan utilizando software especializado como Pymol.
- ❖ Los resultados se visualizaron en software especializado como AutoDock Tools y Pymol.

6.5.16 Análisis estadístico

Todas las determinaciones de la presente tesis se realizaron por duplicado para una n de ocho en el caso del modelo *in vivo*, mientras que para las pruebas histológicas e inmunohistoquímicas se utilizó una n de tres. Por su parte, en el modelo *in vitro* se realizaron determinaciones por triplicado con una n de tres. Se obtuvo la media, así como el error estándar para cada uno de los diferentes indicadores medidos en los grupos de tratamiento.

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

6. RESULTADOS

7.1 La administración concomitante del esteviósido previno los cambios en la arquitectura hepática y las alteraciones bioquímicas producidas por la administración crónica de TAA.

Para determinar los efectos inducidos por la administración crónica de la TAA, se tomaron imágenes macro y microscópicas de todos los grupos de tratamiento para ser evaluados (Figura 10 1A-H). En la Figura 10 1B y F se observa que la TAA modificó la morfología del parénquima hepático al ser comparado con el grupo control (Figura 10A y E), resultó en la presencia de nódulos de regeneración rodeados por gruesas bandas de colágena [1], sin embargo, cuando se administró el esteviósido concomitantemente (Figura 10C y G), los cambios propiciados por la TAA se previnieron. El tratamiento con el esteviósido a las ratas control no produjo ningún cambio (Figura 10D y H).

Por otra parte, la ganancia de peso a lo largo del tiempo disminuyó con la administración crónica de la TAA al ser comparado con el grupo control (Figura 10 I, J y K), en este caso, el esteviósido no fue capaz de prevenir este fenómeno. El peso de los hígados en el grupo cirrótico disminuyó comparado con el grupo control (Figura 10L), al igual que con la ganancia de peso, el esteviósido no indujo un efecto significativo en la disminución de peso dado por la TAA. Por lo anterior, la relación de peso hígado/cuerpo incrementó en el grupo administrado con el hepatotóxico (Figura 10M), mientras que el esteviósido no previno este incremento. Como se muestra en la Figura 10N, el grupo tratado con TAA mostró niveles significativamente menores de glucógeno comparados con el grupo control, mientras que la coadministración con esteviósido previno parcialmente esta disminución, indicando que este compuesto preservó significativamente la funcionalidad del hígado.

A la par de lo antes mencionado, la actividad enzimática de la ALT (Figura 10O), γ -GTP (Figura 10P) y ALP (Figura 10Q) incrementó significativamente en las ratas tratadas con TAA como lo muestran reportes previos [27]. La administración del esteviósido no produjo ningún efecto en las ratas control.

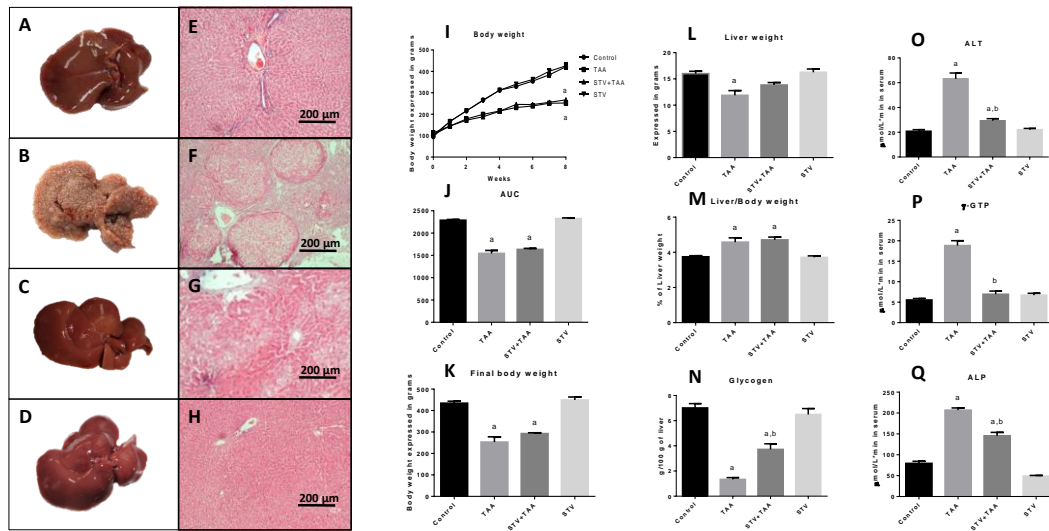


Figura 10. La administración de esteviósido (STV) previno el daño producido por la administración crónica de TAA. Efecto del STV en la estructura macroscópica y microscópica (tinción de H&E) en las ratas control (A,E), ratas tratadas con TAA (B,F), ratas tratadas con STV+TAA (C,G) y ratas tratadas con STV solo (D,H). Histogramas mostrando la ganancia de peso (I), el área bajo la curva de la ganancia de peso (J), peso corporal final (K), peso de hígado (L), relación peso corporal/hígado (M), glucógeno hepático (N), actividad de ALT (O), γ -GTP (P), y ALP (Q). Cada barra representa la media de los valores de los experimentos realizados por duplicado para cada ensayo \pm SEM (n = 8). a Diferencia significativa del control, $p < 0.05$. b Diferencia significativa del grupo de TAA, $p < 0.05$.

7.2 El esteviósido bloqueó la activación del NF- κ B y citocinas pro-inflamatorias.

Como se observa en la Figura 11, la activación del NF- κ B (p65) incrementó significativamente (Figura 11B) al compararlo con el grupo control (Figura 11A), notablemente, la coadministración del esteviósido aminoró significativamente la regulación a la alta del p65 (Figura 11C) al compararlo con el grupo tratado con la TAA. La Figura 11E muestra las zonas positivas de tres muestras. Los resultados anteriores fueron confirmados por ensayos de qPCR (Figura 11F) y Western blot (Figura 11G), en dónde se observa que la TAA incrementó los niveles de p65 tanto a nivel de mRNA como de la proteína, mientras que el tratamiento con el esteviósido previno significativamente este efecto. El tratamiento únicamente con esteviósido no produjo ningún efecto sobre el p65.

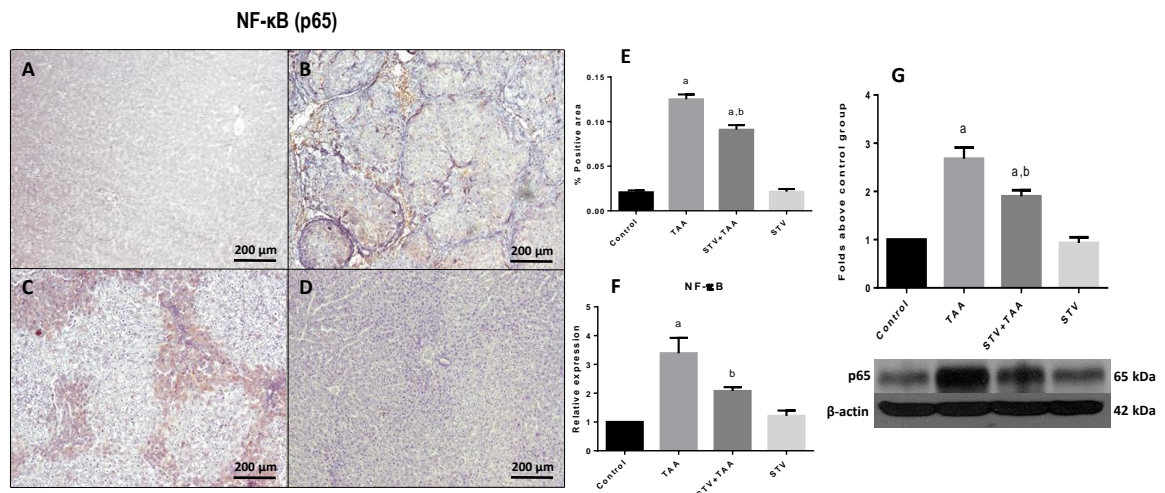


Figura 11. Efecto inmunoregulator del esteviósido (STV) en hígados de ratas intoxicadas con TAA. Inmunohistoquímica representativa para p65 de hígados de ratas control (A); ratas tratadas con TAA (B); ratas tratadas con STV+TAA (C); y ratas tratadas con STV únicamente (D). Histogramas mostrando el porcentaje de positividad de p65 obtenida de las inmunohistoquímicas (E). Se muestra el incremento en la expresión relativa de mRNA y proteína para p65 (F,G). La β -actina fue utilizada como control. Cada barra representa la media de los valores de los experimentos realizados por duplicado para cada ensayo \pm SEM (n = 8). a Diferencia significativa del control, $p < 0.05$. b Diferencia significativa del grupo de TAA, $p < 0.05$.

En la Figura 12 se muestra el incremento del nivel de mRNA y proteínas de la IL-17a (A), IL-1 β (B,C), TNF- α (D,E), IL-6 (F,G) e IL-10 (H,I) por parte de la administración crónica de la TAA. Cabe resaltar que la administración del esteviósido previno el incremento en estas citocinas. La administración única del esteviósido no ocasionó ningún efecto.

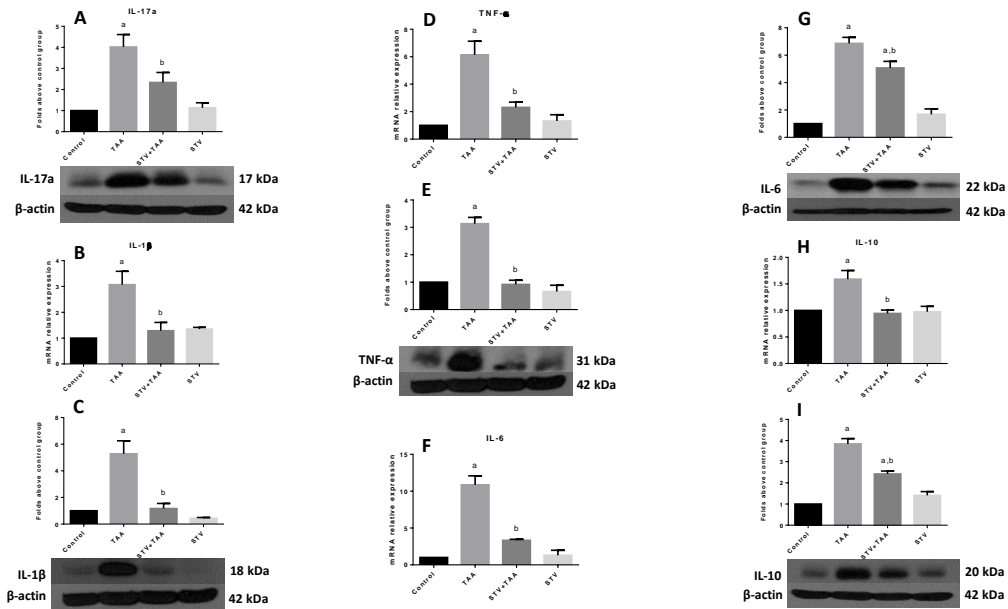


Figura 12. El esteviósido (STV) previene el incremento de citocinas en hígados cirróticos. Se muestran los niveles en la proteína de la IL-17a (A), los niveles de mRNA y proteína de IL-1β (B,C); TNF-α (D,E); IL-6 (F,G) e IL-10 (H,I). La β-actina fue utilizada como control. Los valores son expresados como el incremento en la densidad óptica normalizada al grupo control (control = 1). Cada barra representa la media de los valores de los experimentos realizados por duplicado para cada ensayo ± SEM (n = 8). a Diferencia significativa del control, p < 0.05. b Diferencia significativa del grupo de TAA, p < 0.05.

7.3 El esteviósido mantiene los niveles del factor maestro Nrf2 y no es un neutralizador directo de radicales libres

Como se muestra en la Figura 13A, el esteviósido mostró una débil actividad antioxidante dependiente de la concentración al ser comparado con la quercetina. Por su parte, en la Figura 13B, el grupo tratado con TAA mostró una disminución en los niveles de Nrf2 en el hígado comparados con el grupo control (Figura 13B). Sin embargo, el esteviósido mostró prevenir esta disminución, con lo anterior, al preservarse estos niveles la elevación de marcadores de estrés en la membrana como el 4HNE (Figura 13C) y LPO (Figura 13D) se previno significativamente. Además, la concentración del GSH (Figura 13E) así como de los niveles de mRNA de la GPx (Figura 14F) que se vieron disminuidos por la administración crónica de la TAA, se mantuvieron dentro de los valores control en los grupos tratados con el esteviósido.

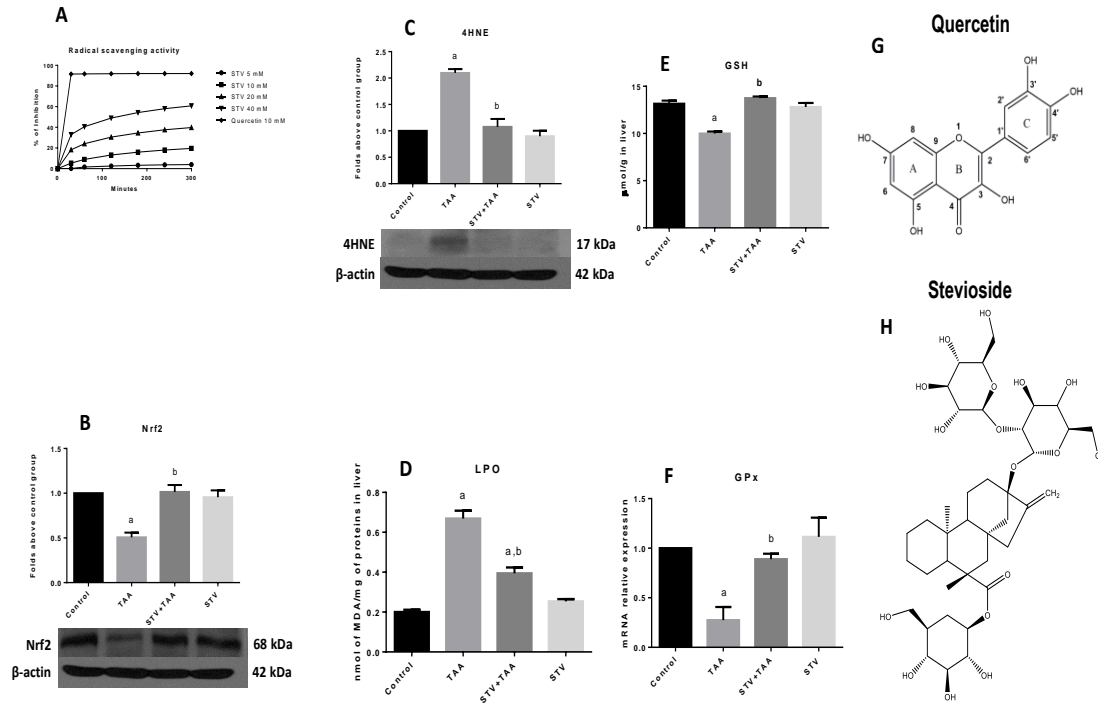


Figura 13. Efecto del estevósido (STV) sobre el sistema antioxidante. Efecto del estevósido a 5, 10, 20 y 40 mM en la actividad atrapadora de radicales (RSA) usando DPPH· como radical libre (A). WB de Nrf2 (B) y 4HNE (C) en muestras de hígados de ratas control, tratadas con TAA, tratadas con STV+TAA y tratadas con STV únicamente. La β-actina fue utilizada como control. Los valores son expresados como el incremento en la densidad óptica normalizada al grupo control (n = 3). Se muestran los valores de la peroxidación lipídica (LPO; D) y GSH (E) (n = 8). Cada barra representa la media de los valores de los experimentos realizados por duplicado para cada ensayo ± SEM (n = 8). Se muestra el incremento relativo en la expresión de mRNA de la GPx (F) (n = 3) Cada barra representa la media de los valores de los experimentos realizados por duplicado para cada ensayo ± SEM (n = 3). a Diferencia significativa del control, p < 0.05. b Diferencia significativa del grupo de TAA, p < 0.05. Representación de las estructuras químicas de la quercetina (G) y el estevósido (H).

7.4 El estevósido previene la fibrogénesis a través de un mecanismo a múltiples blancos

Como se muestra en la Figura 14, la administración crónica de la TAA incrementó significativamente la cantidad de colágena en el parénquima hepático (Figura 14B y E) comparado con el grupo control (Figura 14A y E), sin embargo, la administración concomitante del estevósido (Figura 14C y E) previno parcialmente este incremento en las fibras de colágena. Los resultados mostrados en las Figuras 14F (contenido total de colágena) y 14G (western blot de Col-1α) confirman los resultados histopatológicos. En todos los casos, la TAA elevó significativamente la colágena al compararla con el grupo control, mientras que el estevósido previno parcialmente el

proceso fibrogénico. Las ratas tratadas con esteviósido únicamente mostraron valores iguales a los controles.

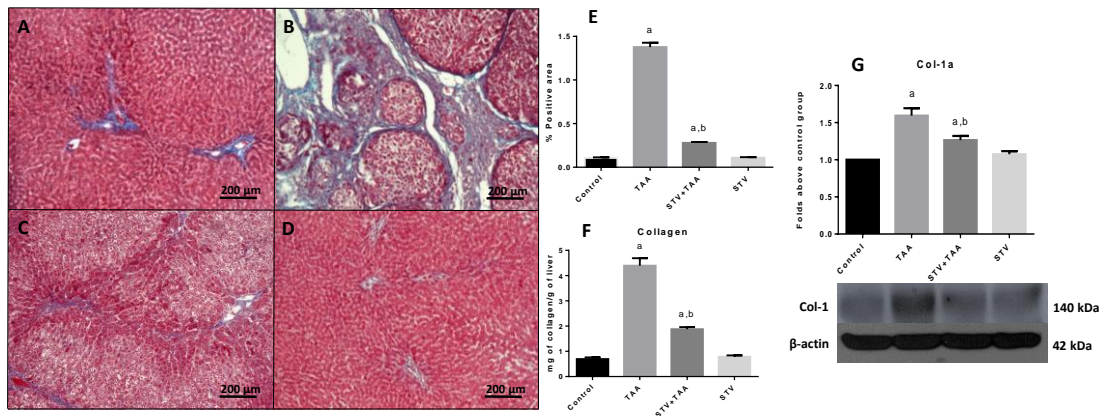


Figura 14. Efecto del esteviósido (STV) sobre la deposición de colágena en el parénquima hepático. Representación de la tinción tricrómica de Masson de hígados de ratas control (A); ratas tratadas con TAA (B); ratas tratadas con STV+TAA (C) y ratas tratadas con STV únicamente (D). Se muestra el histograma del porcentaje del área positiva a colágena obtenida de las tinciones tricrómicas de Masson (E) ($n = 3$). Se muestra el contenido de hidroxiprolina de muestras de hígado ($n = 8$). Se muestran los niveles proteicos de Col-1 α medidos por WB a partir de muestras de hígados de ratas (G) ($n = 3$). La β -actina fue utilizada como control. Los valores son expresados como el incremento en la densidad óptica normalizada al grupo control ($n = 1$). Cada barra representa la media de los valores de los experimentos realizados por duplicado para cada ensayo \pm SEM. a Diferencia significativa del control, $p < 0.05$. b Diferencia significativa del grupo de TAA, $p < 0.05$. Representación de las estructuras químicas de la quercetina (G) y el esteviósido (H).

7.4.1 El esteviósido bloquea la activación de las HSC.

Como se muestra en la Figura 15A-D, la inmunohistoquímica para el α -SMA indica que la expresión de esta proteína es significativamente mayor en el grupo tratado crónicamente con la TAA (Figura 15B) cuando se compara con el grupo control (Figura 15A). Sin embargo, el tratamiento con el esteviósido previno parcialmente este incremento (Figura 15C) al compararlo con el grupo cirrótico. La Figura 15E muestra el área positiva a α -SMA obtenida de tres muestras de hígados. Los resultados anteriores fueron corroborados a través de qPCR (Figura 15F) y por Western blot (Figura 15G), en todos los casos, la TAA incrementó los niveles de α -SMA al compararlos con el grupo control, mientras que la administración paralela del esteviósido previno parcialmente este incremento. La administración del esteviósido a las ratas control no propició ningún cambio en los niveles de α -SMA.

7.4.2 El esteviósido previene la activación de las HSC y regula a la baja al TGF- β 1

La Figura 15I y L, muestra que la administración crónica con la TAA incrementó el área positiva TGF- β 1 comparada con el grupo control (Figura 15H y L). Mientras que la administración con esteviósido previno este aumento en la expresión de la proteína (15J y L). Además, las Figuras 15M y N muestran que la TAA incrementó los niveles de mRNA y proteína del TGF- β 1 respecto al grupo control, mientras que el esteviósido previno significativamente este incremento. En todos los casos anteriores, la administración únicamente del esteviósido no produjo ningún efecto. Con lo anterior se sugiere que el esteviósido es capaz de evitar la activación de las HSC en parte por la regulación a la baja del TGF- β 1.

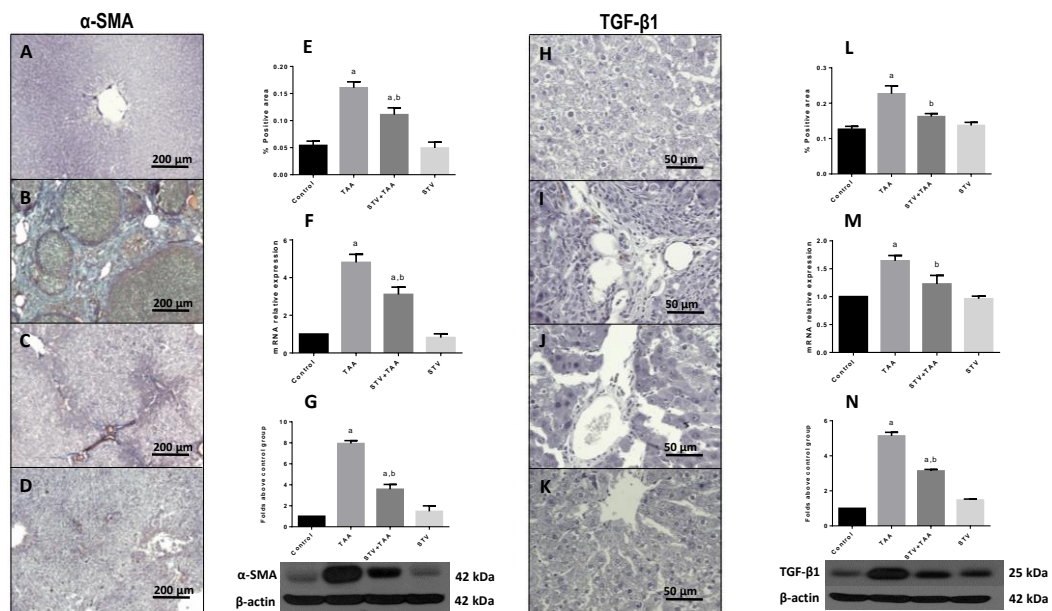


Figura 15. Efecto del esteviósido (STV) sobre la activación de las HSC. Inmunohistoquímica representativa para α -SMA y TGF- β 1 obtenidas de hígados de ratas control (A,H); ratas tratadas con TAA (B,I); ratas tratadas con STV+TAA (C,J); y ratas administradas con STV únicamente (D,K), respectivamente. Histogramas mostrando el porcentaje de área positiva para α -SMA y TGF- β 1 obtenidas de las inmunohistoquímicas (E,L), respectivamente. Se muestra el incremento relativo de mRNA de α -SMA y TGF- β 1 (F,M) respectivamente. Los niveles proteicos de α -SMA y TGF- β 1 se midieron por WB en muestras de hígado (G,N) respectivamente. La β -actina fue utilizada como control. Los valores son expresados como el incremento en la densidad óptica normalizada al grupo control (n = 1). Cada barra representa la media de los valores de los experimentos realizados por duplicado para cada ensayo \pm SEM (n = 3). a Diferencia significativa del control, p < 0.05. b Diferencia significativa del grupo de TAA, p < 0.05.

7.4.3 El esteviósido inhibe a las metaloproteinasas (MMPs)

En la Figura 16A-C se muestra que la administración crónica con TAA incrementó la actividad de las MMP-9 y MMP-2 comparado al grupo control, mientras que la administración paralela del esteviósido previno totalmente el aumento de esta actividad, por otro lado, la MMP-13 mostró resultados similares cuando se midió la cantidad de proteína a través de una inmunohistoquímica y por western blot (Figura 16D-I). El tratamiento con esteviósido solo no ocasionó ningún efecto.

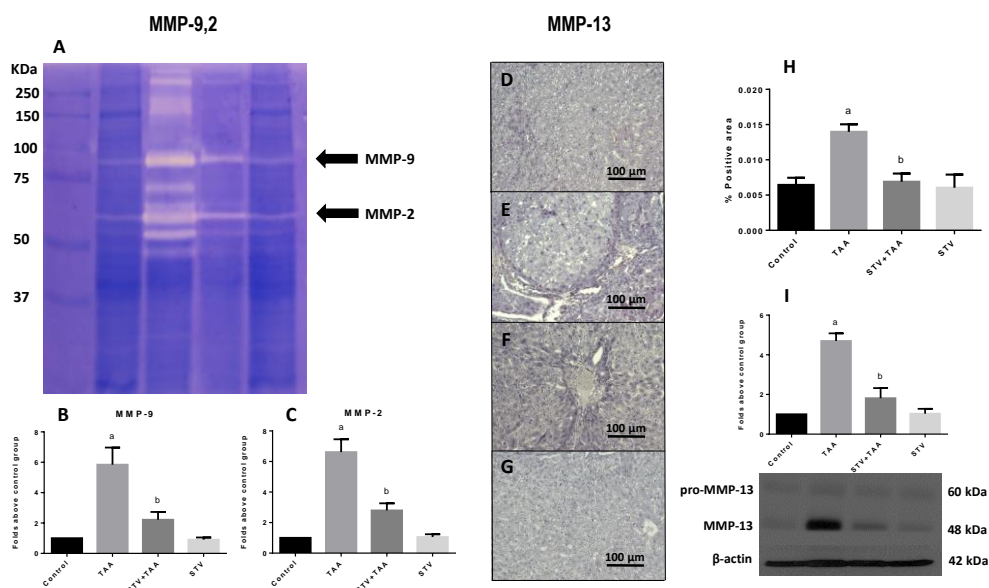


Figura 16. El esteviósido (STV) regula a la baja la actividad de las MMPs. La actividad de las MMP-9 y MMP-2 se midió a través de zimografía usando geles con gelatina como sustrato para el control, TAA, STV+TAA y STV solo (A). Se muestran los histogramas mostrando la intensidad de señal por análisis densitométrico para la MMP-9 (B) y MMP-2 (C). Inmunohistoquímica representativa para MMP-13 obtenida de hígados de ratas control (D); ratas tratadas con TAA (E); ratas tratadas con STV+TAA (F); y ratas administradas con STV únicamente (G). Histograma mostrando el porcentaje de área positiva para MMP-13 obtenida de las inmunohistoquímicas (H). Los niveles proteicos de MMP-13 se midieron por WB en muestras de hígado (I). La β -actina fue utilizada como control. Los valores son expresados como el incremento en la densidad óptica normalizada al grupo control ($n = 1$). Cada barra representa la media de los valores de los experimentos realizados por duplicado para cada ensayo \pm SEM ($n = 3$). A Diferencia significativa del control, $p < 0.05$. b Diferencia significativa del grupo de TAA, $p < 0.05$.

7.4.4 Las vías canónica y no canónica de las Smads es prevenida por el esteviósido

La figura 17A muestra que la administración crónica del hepatotóxico TAA incrementa los niveles de p-JNK que es la forma activa de la cinasa, de igual forma

para el p-p38 (Figura 17B), otra cinasa que también es capaz de fosforilar a la Smad3 en la región linker, en ambos casos, la administración del esteviósido previno completamente este efecto. Como resultado, la p-Smad3L (Figura 17C) incrementó en el grupo al que se le administró la TAA, mientras que el esteviósido previno este incremento. Por otro lado, la Smad7 que es esencial en la vía canónica mostró estar disminuida en los hígados cirróticos al compararlos con el grupo control, mientras que la administración del esteviósido previno significativamente esta disminución. En todos los casos el esteviósido por sí mismo no tuvo ningún efecto.

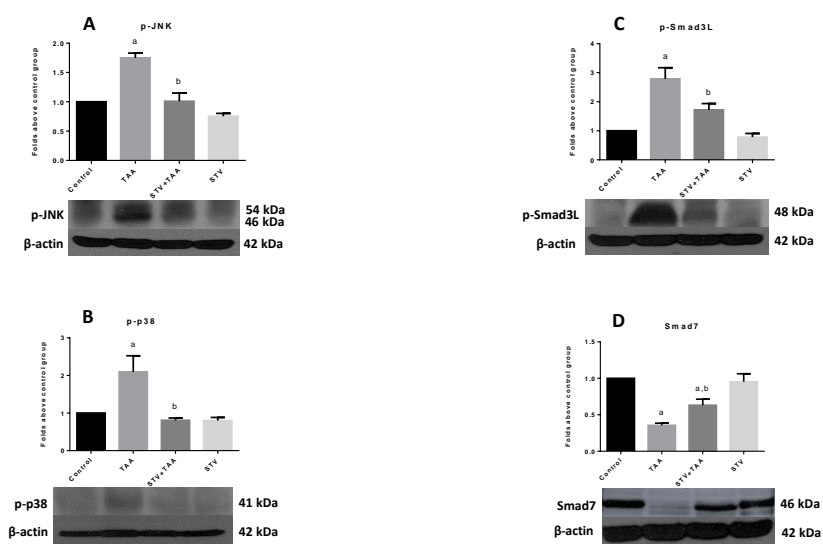


Figura 17. El esteviósido (STV) previene la vía no canónica de las Smad y preserva a la Smad7. Se muestran los WB para p-JNK (A), p-p38 (B), p-Smad3L (C) y Smad7 (D) en muestras de hígado de control, tratados con TAA, tratados con STV+TAA y STV sólo. La β -actina fue utilizada como control. Los valores son expresados como el incremento en la densidad óptica normalizada al grupo control ($n = 1$). Cada barra representa la media de los valores de los experimentos realizados por duplicado para cada ensayo \pm SEM ($n = 3$). a Diferencia significativa del control, $p < 0.05$. b Diferencia significativa del grupo de TAA, $p < 0.05$.

7.5 El esteviósido previene la sobreexpresión de genes pro-inflamatorios y pro-fibrogénicos inducida por la exposición a LPS y EtOH en co-cultivos

Los resultados obtenidos a partir del modelo *in vivo*, sugieren por primera vez los efectos del esteviósido como antioxidante al regular al factor maestro Nrf2, como anti-inflamatorio al regular al factor maestro NF- κ B y anti-fibrótico al participar en varias vías del proceso fibrogénico. Para confirmar los hallazgos anteriores, se

caracterizaron las propiedades anti-inflamatoria del esteviósido en co-cultivos de células hHSC/VL-17A. En la Figura 18A y B se muestra que la exposición de estas células al LPS (molécula relacionada a la respuesta inmunológica) o EtOH (conocido agente etiológico) incrementaron los niveles de mRNA de NF- κ B comparados con el grupo control, mientras que el esteviósido previno significativamente este incremento. Además, citocinas reguladas por este factor maestro como el TNF- α (Figura 18C y D) e IL-6 (Figura 18E y F) también incrementaron como era de esperarse, sin embargo, el esteviósido previno parcial o completamente este incremento. En todos los casos, el esteviósido por sí mismo no causó ningún efecto.

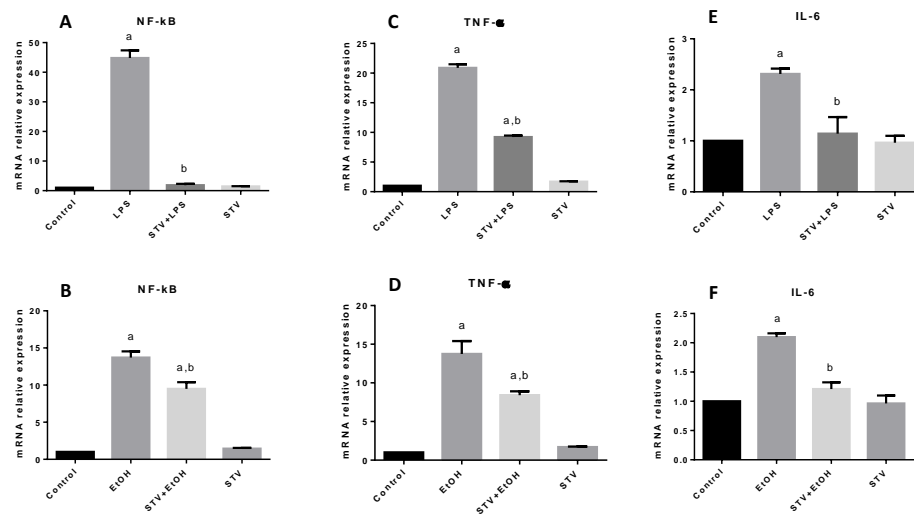


Figura 18. Efecto inmunomodulador del esteviósido (STV) en co-cultivo de células hHSC/VL-17A. Se muestran el incremento relativo del mRNA de NF- κ B (A,B); TNF- α (C,D); e IL-6 (E,F) en muestras de células hHSC/VL-17A en co-cultivos de control, tratados con LPS y EtOH, tratados con STV+LPS o EtOH respectivamente, y tratados con STV únicamente. La β -actina fue utilizada como control. Cada barra representa la media de los valores de los experimentos realizados por duplicado para cada ensayo \pm SEM (n = 3). a Diferencia significativa del control, p < 0.05. b Diferencia significativa del grupo de TAA, p < 0.05.

Por otro lado, el efecto anti-fibrótico también fue caracterizado tanto con el EtOH así como con el LPS en el modelo *in vitro* de co-cultivos. Como se observa en la Figura 19, el mRNA de α -SMA, TGF- β 1, Smad3, PDGFR y c-Myc se elevaron significativamente ya sea por el EtOH o el LPS, mientras que al ser incubados con el esteviósido, este incremento se previno efectivamente, por su parte el esteviósido solo no produjo ningún efecto.

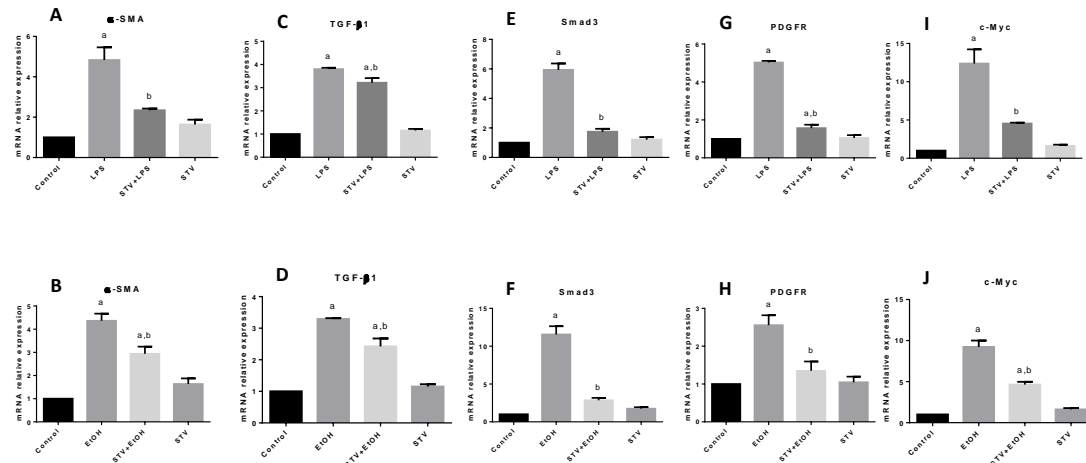


Figura 19. Efecto anti-fibrogénico del esteviósido (STV) en co-cultivo de células hHSC/VL-17A. Se muestran el incremento relativo del mRNA de α -SMA (A,B); TGF- β (C,D); Smad3 (E,F); PDGFR (G,H) y c-Myc (I,J) en muestras de células hHSC/VL-17A en co-cultivos de control, tratados con LPS y EtOH, tratados con STV+LPS o EtOH respectivamente, y tratados con STV únicamente.. La β -actina fue utilizada como control. Cada barra representa la media de los valores de los experimentos realizados por duplicado para cada ensayo \pm SEM (n = 3). a Diferencia significativa del control, p < 0.05. b Diferencia significativa del grupo de TAA, p < 0.05.

7.6 El esteviósido muestra un efecto anti-proliferativo dependiente de la concentración

Para poder identificar si el efecto anti-fibrogénico ejercido por el esteviósido era en parte debido a un efecto anti-proliferativo se realizó un ensayo de BrdU. Como se muestra en la Figura 20, el esteviósido muestra un efecto anti-proliferativo dependiente de la concentración en los co-cultivos celulares. En donde la concentración de 100 mM produjo el mejor efecto, lo que refuerza los resultados obtenidos con c-Myc (Figura 19I y J). Así, se sugiere que otro efecto anti-fibrótico del esteviósido puede ser mediado al inhibir la proliferación de las HSC.

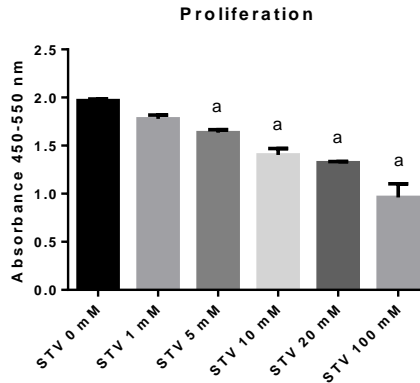


Figura 20. Efecto anti-proliferativo del esteviósido (STV) en co-cultivo de células hHSC/VL-17A. Histograma mostrando la respuesta dependiente de la concentración en co-cultivos de células hHSC/VL-17A. Cada barra representa la media de los valores de los experimentos realizados por duplicado para cada ensayo \pm SEM ($n = 3$). a Diferencia significativa del control, $p < 0.05$.

7.7 Estudio de acoplamiento molecular (docking) mostrando un posible mecanismo del esteviósido como inmunoregulador.

En la Figura 21A se muestra que el esteviósido presenta una energía de unión de -0.9 kcal/mol hacia el TNFR1, lo que indica que existe un ligero impedimento del esteviósido para poder unirse al receptor; sin embargo, en las Figuras 21B y C se muestra que el esteviósido se une a los aminoácidos PHE60, THR61, ALA62, LEU67 y LEU71, los cuales están implicados en la inhibición del TNFR1. Además, en la Figura 21D-F, las moléculas del esteviósido y el IV703 que es un inhibidor del TNFR1 se superpusieron en el sitio de unión del receptor en dónde ambas moléculas convergieron.

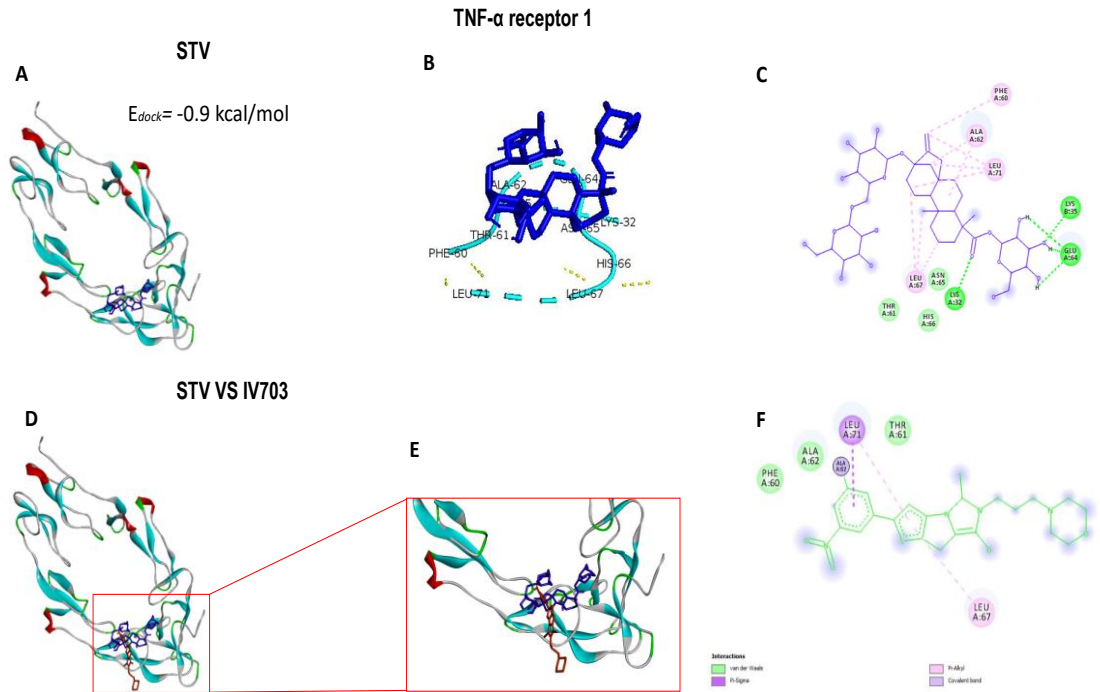


Figura 21. Estevisido (STV) acoplado al receptor TNFR1. Se muestra la energía de unión del estevisido acoplado al TNFR1 (A). Se muestra las interacciones del estevisido con los aminoácidos del sitio activo del TNFR1 (B). Vista en 2D del estevisido interaccionando con los aminoácidos (C). Superposición del estevisido y el IV703 en el sitio activo del TNFR1 (D). Amplificación de la superposición del estevisido-IV703 (E). Vista en 2D de la interacción del IV703 con los aminoácidos del sitio de activo del TNFR1 (F).

En la Figura 22A se muestra la energía de unión del estevisido acoplado al complejo TLR4-MD-2, siendo esta energía de -5.6 kcal/mol, elicitando una mejor energía que la encontrada para el TNFR1, como se muestra en la Figura 22B y C los aminoácidos a los que se une el estevisido son la ILE63, PHE76, TYR102, ILE117, PHE119, SER120, PHE121, LYS122 Y PHE151, que son blancos para la inhibición de la vía del LPS. En la Figura 22D-F se muestra la superposición del estevisido con el inhibidor llamado Eritoran, ambas moléculas se localizan en el mismo sitio que corresponde al MD-2.

7. DISCUSIÓN

El estudio de las enfermedades hepáticas ha sido posible en gran medida gracias al desarrollo de modelos experimentales que mimetizan eficazmente esta patología. Dentro de estos modelos, el de daño crónico inducido por la TAA está bien establecido, siendo los principales causantes sus metabolitos TASO y TASO₂, los cuales producen necrosis en los hepatocitos lo que, a largo plazo, conlleva al desarrollo de una fibrosis hepática similar a la observada en el humano [35]. Esto se observa claramente al comparar la morfología así como las histologías y marcadores de daño hepático obtenidos de hígados de ratas tratadas crónicamente con TAA y compararlos con ratas aparentemente sanas. Por otro lado, una de las principales funciones del hígado es la de almacenar energía en forma de glucógeno, sin embargo, esta función fue disminuida significativamente en los hígados de las ratas con cirrosis [1]. No obstante de lo anterior, el esteviósido previno parcial o completamente la elevación de marcadores de necrosis, colestasis y de funcionalidad (almacenamiento de glucógeno), proporcionando evidencia importante de sus efectos benéficos en la cirrosis hepática. Además, cuando el hígado es lesionado, las KC y los monocitos se reclutan para desencadenar un proceso inflamatorio. Las KC muestran una alta activación del NF- κ B, regulador maestro de la inflamación, muerte celular, y cicatrización en respuesta a las lesiones, desencadenando la producción y liberación de citocinas pro-inflamatorias que eventualmente conducen a la fibrosis. Además, la activación del NF- κ B se observa también en los hepatocitos y las HSC [36,37]. Por lo anterior, se sugiere que el NF- κ B desempeña una función principal durante la respuesta cicatrizal al regular el daño a los hepatocitos, ya que son los primeros en desencadenar la respuesta fibrogénica [37]. Lo anterior concuerda con reportes previos en los que el esteviósido ha mostrado regular a la baja al NF- κ B y las citocinas reguladas por este factor maestro [33,34,38–40], lo que sugiere que el esteviósido puede ejercer un efecto inmunomodulador sobre la cirrosis hepática. Por otro lado, el estrés oxidante participa activamente en los procesos inflamatorio, fibrogénico y cirrótico, principalmente por el daño que causa a los hepatocitos al oxidar los lípidos en la membrana de los mismos y promoviendo un proceso necrótico que desencadena el reclutamiento de las KC y monocitos, estos a su vez

liberan citocinas pro-inflamatorias que son capaces de activar a las HSC, conllevando a la producción de proteínas de la ECM con la consecuente producción de fibrosis [41,42]. Además, la medición de los niveles del Nrf2 es otra forma de saber si se puede presentar un efecto antioxidante. Los resultados obtenidos muestran que el esteviósido es capaz de mantener los niveles del factor maestro Nrf2 en lugar de actuar como un neutralizador de radicales libres. Esto se sustenta al comparar las estructuras químicas del esteviósido (Figura 13G) y de la quercetina (Figura 13H). Moléculas con una alta capacidad antioxidante como la quercetina poseen en su estructura anillos fenólicos, grupos hidroxilos (3' y 4') presentes en el anillo B, dobles enlaces (2,3) en el anillo C junto con los hidroxilos en 3 y 5 en los anillos C y A respectivamente, además de poder deslocalizar electrones por efecto de resonancia a través del grupo 4-oxo confiriendo estabilidad a la molécula [43].

En condiciones basales, las HSC permanecen en un estado quiescente o de inactividad pro-fibrogénica almacenando vitamina A en el espacio de Disse [44]. Sin embargo, cuando el hígado es lesionado, las HSC cambian su fenotipo al de células parecidas a miofibroblastos. Estas HSC activadas expresan una proteína del citoesqueleto llamada α -SMA [22,45]. Por lo anterior, las HSC parecen ser un buen blanco farmacológico para prevenir y/o revertir la fibrosis. El TGF- β 1 es la citocina pro-fibrogénica por excelencia para activar a las HSC [46]. Por ello, se sugiere que la prevención en la activación de las HSC dada por el esteviósido se debe por la regulación a la baja de la vía del TGF- β 1. Por otro lado, la ECM es un componente esencial para el microambiente y funcionamiento y del hígado, ya que provee de una superficie para la adhesión celular, como reserva para moléculas de señalización y ofrece el espacio para el crecimiento y migración de las células. Un aspecto importante es la dinámica de la ECM, dónde la degradación de sus componentes es una característica importante para la reparación y remodelación de la misma. Sin embargo, en los hígados cirróticos, esta dinámica se ve afectada incrementado la producción de proteínas que constituyen a la ECM, de este modo, la arquitectura del parénquima hepático se pierde gracias a la generación de bandas fibróticas que delimitan nódulos hepatocelulares. Un componente importante en esta remodelación son las MMPs, ya que se encargan de degradar los componentes de la ECM así como

de regular la respuesta inmunológica al liberar y activar citocinas pro-inflamatorias, pro-fibrogénicas y mitogénicas [47,48]. Las HSC activadas y las KC son fuentes importantes de MMP-9 y MMP-2, además la MMP-9 se ha reportado estar en áreas de fibrogénesis activa, ya que se encarga de escindir al pro-TGF- β 1 de la ECM así como promover la activación, migración y proliferación de las HSC. Además, se ha observado una elevación de las MMP-13 y MMP-9 durante el proceso inicial en la inflamación con una notoria expresión del TNF- α , por otro lado, se ha reportado que la MMP-13 medía el inicio de la inflamación y contribuye a la progresión de la fibrogénesis [48–50]. Los resultados obtenidos a través del ensayo de zimografía así como inmunohistoquímica y por western blot de las MMP-2,-9 y -13 respectivamente, muestran que el esteviósido es capaz de regular la respuesta inmunitaria y fibrogénica a través de la regulación a la baja de las MMPs, por lo tanto previenen la activación de las HSC y los eventos consecuentes, como la síntesis abundante de MEC.

Un componente importante en toda patología, es el que se lleva a cabo a nivel molecular, por ello, conocer las vías involucradas es de vital importancia para encontrar nuevos blancos terapéuticos y desarrollar futuros tratamientos. En el caso de la activación de las HSC, una de estas vías es la llevada a cabo por las Smads. La vía de señalización de las Smads puede darse a través de dos rutas alternas, llamadas canónica y no canónica. La primera comienza cuando el TGF- β 1 se une al receptor T β RII, receptor que pertenece a la familia de los serina/treonina y presenta actividad de cinasa, forma un homodímero estable para poder acoplarse a otro receptor serina/treonina llamado T β RI, formando entonces un complejo entre receptores-ligando. Una vez que el complejo es formado, el T β RII se autofosforila y promueve la fosforilación del T β RI, activando entonces su actividad de cinasa. En esta vía, las Smads 2/3 sirven como factores transcripcionales que están presentes en el citoplasma y viajan al núcleo una vez que se acoplan a la Smad4 y son fosforiladas en su C-terminal por el T β RI. Sin embargo, cuando esta vía se sobre estimula, la Smad7 actúa como un regulador negativo, antagonizando la cascada de señalización del TGF- β 1 [26,51,52]. Por otro lado, en la vía no canónica, el PDGF activa al JNK, mientras que p38 es activado por diversas respuestas al estrés y a citocinas

inflamatorias, estas su vez fosforilan a la Smad3 en el dominio linker para generar a la p-Smad3L, que se traslada al núcleo donde estimula la proliferación de las HSC, así como la inducción y deposición de proteínas de la ECM [53,54]. Los resultados obtenidos al estudiar las vías de las Smads, nos sugieren que el esteviósido previene la fibrogénesis al menos en parte por la modulación de la vía no canónica al regular a la baja la fosforilación de p-JNK y p-p38, que a su vez fosforilan a la Smad3 en la región del linker y, por preservar el regulador negativo a través de la Smad7 en la vía canónica.

El uso de diversas herramientas que ayudan a elucidar los posibles mecanismos de acción mostrados por diversos agentes es de vital importancia en la investigación de futuros fármacos. Por ello, el uso de un modelo *in vitro* utilizando dos tipos celulares que mimeticen el microambiente hepático nos proporciona datos importantes para afinar el mecanismo molecular por el cual actúa el esteviósido en la cirrosis hepática. Los resultados de estos experimentos concuerdan con los obtenidos de ratas tratadas crónicamente con TAA, sugiriendo fuertemente un importante mecanismo inmunomodulador por parte del esteviósido que explica, en parte, los efectos protectivos elicitados ante un daño al hígado. Además, la Smad3 juega un papel fundamental en el desarrollo del proceso fibrogénico. Por otro lado, proteínas relacionadas en la proliferación de las HSC y la activación de la vía no canónica de las Smad como el PDGFR incrementan la respuesta inflamatoria y fibrótica a través de las vías de las MAPK, NF- κ B y c-Myc, potente mitógeno que puede ser inducido por el PDGF y citocinas pro-inflamatorias vía p-Smad3L [53]. Un importante resultado obtenido de las pruebas *in vivo* e *in vitro*, es que el NF- κ B puede representar un blanco terapéutico para la prevención de la fibrosis hepática, esto se debe a que este factor maestro muestra tener una comunicación cruzada con la vía de señalización del JNK [37]. Interesantemente, el esteviósido bloquea la activación del NF- κ B y la producción subsecuente de las citocinas pro-inflamatorias, por lo tanto, es razonable pensar que este efecto puede llevar a regular a la baja mediadores pro-fibrogénicos.

Por otro lado, otra herramienta ampliamente utilizada es el acoplamiento molecular o docking molecular. Éste es usado principalmente como una herramienta predictiva para anticipar las posibles interacciones moleculares entre proteínas y ligandos a un nivel atómico, lo que permite caracterizar el comportamiento del ligando en el sitio de unión de las proteínas blanco así como conocer los procesos bioquímicos fundamentales [55]. Por ello, y con el fin de elucidar el posible mecanismo por el cual el esteviósido ejerce su efecto inmunomodulador, se estudiaron receptores que están altamente relacionados con la vía de activación del NF- κ B. Para lo cual, se eligió al TNF- α , citocina maestra que activa al NF- κ B a través de sus receptores TNFR1 y TNFR2 [56]. Así, bloquear la activación del NF- κ B y la respuesta inflamatoria a través de los receptores al TNF- α surge como un blanco farmacológico idóneo. Por otro lado, los toll-like receptors (TLRs) participan activamente en los procesos que desencadenan la respuesta inflamatoria al reconocer patrones moleculares asociados a daño tisular. Resultados recientes enfatizan la contribución de los TLRs en el daño hacia el hígado a través de vías complejas que median la activación de las HSC y la consecuente generación de la fibrosis. Notablemente, los TLRs participan en la respuesta de las células a las lesiones por moléculas como la TAA [57,58]. Por lo anterior y considerando los resultados obtenidos con el modelo *in vitro* al incubar a las células con LPS, se utilizó una imagen cristalográfica del TLR4-MD-2 como otro receptor plausible para ser estudiado. Así, los resultados encontrados a través de los ensayos de docking refuerzan los resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro*, sugiriendo un efecto inmunoregulador por parte del esteviósido debido a la afinidad que éste presenta por receptores relacionados a moléculas que pueden activar al NF- κ B, y de esta manera regular a la baja la expresión de citocinas pro-inflamatorias.

8. CONCLUSIONES

8.1 Conclusiones particulares

- a) El esteviósido es capaz de prevenir significativamente el daño inducido tanto en el modelo *in vivo* como en el *in vitro* por los hepatotóxicos.
- b) El efecto antioxidante del esteviósido se debe probablemente a que preserva los niveles del factor maestro Nrf2.
- c) El efecto inmunoregulador del esteviósido se debe en parte a que previene la activación del factor maestro NF- κ B y regula a la baja la expresión de citocinas pro-inflamatorias inducidas por el mismo.
- d) El esteviósido puede ser capaz de interactuar con los receptores TNFR1 y TLR4-MD-2 a nivel molecular en un modelo *in silico*, reforzando así la propuesta de su participación dentro de las vía pro-inflamatorias
- e) El efecto anti-fibrogénico observado por parte del esteviósido se debe en parte a que puede interactuar a múltiples niveles dentro del desarrollo de la fibrosis.
- f) El esteviósido mostró no ejercer ningún efecto nocivo en los modelos *in vivo* en *in vitro*.

8.2 Conclusión general

El esteviósido ejerció un efecto antioxidante, inmunomodulador y anti-fibrótico a diferentes niveles dentro del desarrollo de la cirrosis hepática. Además, el esteviósido exhibe un perfil de seguridad razonable, sugiriendo que podría ser utilizado en un futuro en investigaciones clínicas. Sin embargo, se requieren de más estudios en modelos animales para proveer evidencia razonable de las consecuencias de su uso en períodos de exposición a corto y largo plazo en pacientes cirróticos.

9. PERSPECTIVAS

- ❖ Para determinar de forma más precisa la capacidad antioxidante del esteviósido, es conveniente la medición de enzimas antioxidantes tales como la SOD, CAT y GPx.
- ❖ Probar el efecto inmunoregulador en co-cultivos de células en las que se incluyan HSC, hepatocitos de cultivos primarios y KC.
- ❖ Determinar los efectos del esteviósido en otros modelos de lesión hepática como el de NASH.
- ❖ Ya que la dosis utilizada en este proyecto no causó efectos nocivos hacia el hígado, el aumento de la dosis y la prolongación del curso temporal de tratamiento podrían ser viables para poder obtener mejores resultados.

10.REFERENCIAS

- [1] Kershenovich D, Gutiérrez-Reyes DG. Is human cirrhosis a reversible disease? In: Muriel P, editor. *Liver Pathophysiol. Ther. Antioxidants*, Waltham, MA, USA: Elsevier Inc; 2017, p. 259–65. doi:10.1016/B978-0-12-804274-8.00019-9.
- [2] Lum G, Gambino SR. Serum gamma-glutamyl transpeptidase activity as an indicator of disease of liver, pancreas, or bone. *Clin Chem* 1972;18:358–62.
- [3] Tsukamoto H, Horne W, Kamimura S, Niemelä O, Parkkila S, Ylä-herttua S, et al. Experimental liver cirrhosis induced by alcohol and iron. *J Clin Invest* 1995;96:620–30. doi:10.1172/JCI118077.hepatic.
- [4] Rouach H, Fataccioli V, Gentil M, French SW, Morimoto M, Nordmann R. Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology. *Hepatology* 1997;25:351–5. doi:10.1002/hep.510250216.
- [5] Thuy le TT, Thuy TTV, Hai H, Kawada N. Role of Oxidative and Nitrosative Stress in Hepatic Fibrosis. *Liver Pathophysiol. Ther. Antioxidants*, Elsevier Inc.; 2017, p. 213–24. doi:10.1016/B978-0-12-804274-8.00016-3.
- [6] Zhou WC, Zhang QB, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2014;20:7312–24. doi:10.3748/wjg.v20.i23.7312.
- [7] De S, Mondal S, Banerjee S. Introduction to stevioside. In: De S, Mondal S, Banerjee S, editors. *Stevioside Technol. Appl. Heal.*, West Sussex: Wiley-Blackwell; 2013, p. 1–18.
- [8] Chatsudthipong V, Muanprasat C. Stevioside and related compounds: Therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacol Ther* 2009;121:41–54. doi:10.1016/j.pharmthera.2008.09.007.
- [9] Koolman J, Röhm K-H. Tejidos y órganos. In: Koolman J, Röhm K-H, editors. *Bioquímica Humana*. 4th ed., Madrid, España: Editorial Médica Panamericana; 2012, p. 530.
- [10] Muriel P. The Liver: General aspects and epidemiology. In: Muriel P, editor. *Liver Pathophysiol. Ther. Antioxidants*, Waltham, MA, USA: Elsevier Inc; 2017, p. 3–22. doi:10.1016/B978-0-12-804274-8.00001-1.
- [11] Tortora GJ, Derrickson B. Hígado y vesícula biliar. *Principios Anatomía y Fisiol.* 13a ed., Ciudad de México, México: Médica Panamericana; 2013, p. 990–5.
- [12] Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL. Funciones transportadora y metabólica del hígado. In: Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL, editors. *Fisiol. Médica*. 23rd ed., Ciudad de México, México: McGraw-Hill Interamericana Editores; 2006, p. 479–87.

- [13] MRI Anatomy and Positioning Series 1995. MRI Anatomy and Positioning Series (accessed February 1, 2019).
- [14] Fontana J, Šajdíková M, Maďa P. Liver and Biotransformation of Xenobiotics 2019. <http://fb.lt.cz/en/skripta/ix-travici-soustava/5-jatra-a-biotransformace-xenobiotik/>.
- [15] Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigó R, Gingeras TR, Margulies EH, et al. *Fisiología médica*. vol. 447. 2006. doi:10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2009.07.010.
- [16] Dixon LJ, Barnes M, Tang H, Pritchard MT, Nagy LE. Kupffer cells in the liver. *Compr Physiol* 2013;3:785–97. doi:10.1002/cphy.c120026.
- [17] Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int* 2006;26:1175–86. doi:10.1111/j.1478-3231.2006.01342.x.
- [18] Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;14:397–411. doi:10.1038/nrgastro.2017.38.
- [19] Poisson J, Lemoine S, Boulanger C, Durand F, Moreau R, Valla D, et al. Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *J Hepatol* 2017;66:212–27. doi:10.1016/j.jhep.2016.07.009.
- [20] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;115:209–18. doi:10.1172/JCI200524282.The.
- [21] Bernal W, Auzinger G, Dhawan A, Wendon J. Acute liver failure. *Lancet* 2010;376:190–201. doi:10.1016/S0140-6736(10)60274-7.
- [22] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clinical Investig* 2005;115:209–18. doi:10.1172/JCI200524282.The.
- [23] Pinzani M. Liver fibrosis. *Springer Semin Immunopathol* 2000;21:475–90.
- [24] Arthur MJP. Fibrogenesis II. Metalloproteases and their Inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:G245–9.
- [25] Friedman SL. Mechanis of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology* 2008;134:1655–69. doi:10.1053/j.gastro.2008.03.003.
- [26] Hernández-Aquino E, Zarco N, Casas-Grajales S, Ramos-Tovar E, Flores-Beltrán RE, Arauz J, et al. Naringenin prevents experimental liver fibrosis by blocking TGF- β -Smad3 and JNK-Smad3 pathways. *World J Gastroenterol* 2017;23:4354–68. doi:10.20959/wjpr2016-6447.
- [27] Casas-Grajales S, Vázquez-Flores LF, Ramos-Tovar E, Hernández-Aquino E, Flores-Beltrán RE, Cerda-García-Rojas CM, et al. Quercetin reverses experimental cirrhosis by immunomodulation of the proinflammatory and profibrotic processes. *Fundam Clin Pharmacol* 2017;31:610–24.

doi:10.1111/fcp.12315.

- [28] Ramos-Tovar E, Hernández-Aquino E, Casas-Grajales S, Buendía-Montaño LD, Galindo-Gómez S, Camacho J, et al. Stevia prevents acute and chronic liver injury induced by carbon tetrachloride by blocking oxidative stress through Nrf2 upregulation. *Oxid Med Cell Longev* 2018;2018:1–12. doi:10.1155/2018/3823426.
- [29] Porter WR, Neal RA. Metabolism of thioacetamide and thioacetamide S-oxide by rat liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 1978;6:379–88.
- [30] Wang T, Shankar K, Ronis MJJ, Mehendale HM. Potentiation of thioacetamide liver injury in diabetic rats is due to induced CYP2E. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;294:473–9.
- [31] Hajovsky H, Hu G, Koen Y, Sarma D, Cui W, Moore DS, et al. Metabolism and toxicity of thioacetamide and thioacetamide S-Oxide in rat hepatocytes. *Chem Res Toxicol* 2012;25:1955–63. doi:10.1021/tx3002719.
- [32] Yasukawa K, Kitanaka S, Seo S. Inhibitory effect of stevioside on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Biol Pharm Bull* 2002;25:1488–90. doi:10.1248/bpb.25.1488.
- [33] Boonkaewwan C, Burodom A. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of stevioside and steviol on colonic epithelial cells. *J Sci Food Agric* 2013;93:3820–5. doi:10.1002/jsfa.6287.
- [34] Boonkaewwan C, Toskulkao C, Vongsakul M. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of stevioside and its metabolite steviol on THP-1 cells. *J Agric Food Chem* 2006;54:785–9. doi:10.1021/jf0523465.
- [35] Muriel P, Ramos-Tovar E, Montes-Páez G, Buendía-Montaño LD. Experimental models of liver damage mediated by oxidative stress. In: Muriel P, editor. *Liver Pathophysiol. Ther. Antioxidants*, Waltham, MA, USA: Elsevier Inc; 2017, p. 529–46. doi:10.1016/B978-0-12-804274-8.00040-0.
- [36] Elsharkawy AM, Mann DA. Nuclear factor- κ B and the hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis. *Hepatology* 2007;46:590–7. doi:10.1002/hep.21802.
- [37] Luedde T, Schwabe RF. NF- κ B in the liver-linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011;8:108–18. doi:10.1038/nrgastro.2010.213.
- [38] S L, Chaudhary S, R.S R. Hydroalcoholic extract of Stevia rebaudiana bert. leaves and stevioside ameliorates lipopolysaccharide induced acute liver injury in rats. *Biomed Pharmacother* 2017;95:1040–50. doi:10.1016/j.biopha.2017.08.082.
- [39] Wang Z, Xue L, Guo C, Han B, Pan C, Zhao S, et al. Stevioside ameliorates

- high-fat diet-induced insulin resistance and adipose tissue inflammation by downregulating the NF- κ B pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;417:1280–5. doi:10.1016/j.bbrc.2011.12.130.
- [40] Wang T, Guo M, Song X, Zhang Z, Jiang H, Wang W, et al. Stevioside plays an anti-inflammatory role by regulating the NF- κ B and MAPK pathways in *S. aureus*-infected mouse mammary glands. *Inflammation* 2014;37:1837–46. doi:10.1007/s10753-014-9915-0.
- [41] Casas-Grajales S, Muriel P. The liver, oxidative stress, and antioxidants. In: Muriel P, editor. *Liver Pathophysiol. Ther. Antioxidants*, Waltham, MA, USA: Elsevier Inc; 2017, p. 583–604. doi:10.1016/B978-0-12-804274-8.00043-6.
- [42] Casas-Grajales S, Muriel P. Antioxidants in liver health. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2015;6:59–72. doi:10.4292/wjgpt.v6.i3.59.
- [43] Vázquez-Flores LF, Casas-Grajales S, Hernández-Aquino E, Vargas-Pozada EE, Muriel P. Antioxidant, antiinflammatory, and antifibrotic properties of quercetin in the liver. In: Muriel P, editor. *Liver Pathophysiol. Ther. Antioxidants*, Waltham, MA, USA: Elsevier Inc; 2017, p. 653–74. doi:10.1016/B978-0-12-804274-8.00047-3.
- [44] Wake K. Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. *Int Rev Cytol* 1980;66:303–53. doi:10.1016/S0074-7696(08)61977-4.
- [45] Koyama Y, Brenner DA. Liver inflammation and fibrosis. *J Clinical Investig* 2017;127:55–64. doi:10.1172/JCI88881.orders.
- [46] Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet* 2008;371:838–51. doi:10.1016/S0140-6736(08)60383-9.
- [47] Baiocchi A, Montaldo C, Conigliaro A, Grimaldi A, Correani V, Mura F, et al. Extracellular matrix molecular remodeling in human liver fibrosis evolution. *PLoS One* 2016;11:1–14. doi:10.1371/journal.pone.0151736.
- [48] Duarte S, Baber J, Fujii T, Coito AJ. Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix Biol* 2015;44–46:147–56. doi:10.1016/j.matbio.2015.01.004.
- [49] Hernández-Aquino E, Zarco N, Casas-Grajales S, Ramos-Tovar E, Flores-Beltrán RE, Arauz J, et al. Naringenin prevents experimental liver fibrosis by blocking TGF β -Smad3 and JNK-Smad3 pathways. *World J Gastroenterol* 2017;23:4354–68. doi:10.3748/wjg.v23.i24.4354.
- [50] Han Y-P. Matrix metalloproteinases, the pros and cons, in liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:88–91. doi:10.1111/j.1440-1746.2006.04586.x.
- [51] Lee YA, Wallace MC, Friedman SL. Pathobiology of liver fibrosis: A

- translational success story. *Gut* 2015;64:830–41. doi:10.1136/gutjnl-2014-306842.
- [52] Zi Z, Chapnick DA, Liu X. Dynamics of TGF- β /Smad signaling. *FEBS Lett* 2012;586:1921–8. doi:10.1016/j.febslet.2012.03.063.
- [53] Matsuzaki K. Smad phosphoisoform signals in acute and chronic liver injury: similarities and differences between epithelial and mesenchymal cells. *Cell Tissue Res* 2012;347:225–43. doi:10.1007/s00441-011-1178-6.
- [54] Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2007;1773:1358–75. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.03.010.
- [55] Meng X-Y, Zhang H-X, Mezei M, Cui M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Curr Comput Aided Drug Des* 2011;7:146–57. doi:10.2174/157340911795677602.
- [56] Ting AT, Bertrand MJM. More to life than NF- κ B in TNFR1 signaling. *Trends Immunol* 2016;37:535–45. doi:10.1016/j.it.2016.06.002.
- [57] Kiziltas S. Toll-like receptors in pathophysiology of liver diseases. *World J Hepatol* 2016;8:1354–69. doi:10.4254/wjh.v8.i32.1354.
- [58] Kuramochi M, Izawa T, Pervin M, Bondoc A, Kuwamura M, Yamate J. The kinetics of damage-associated molecular patterns (DAMPs) and toll-like receptors during thioacetamide-induced acute liver injury in rats. *Exp Toxicol Pathol* 2016;68:471–7. doi:10.1016/j.etp.2016.06.005.

11. APÉNDICES

12.1 Curva de calibración de la FA

Para realizar la curva estándar de calibración se prepararon las siguientes disoluciones:

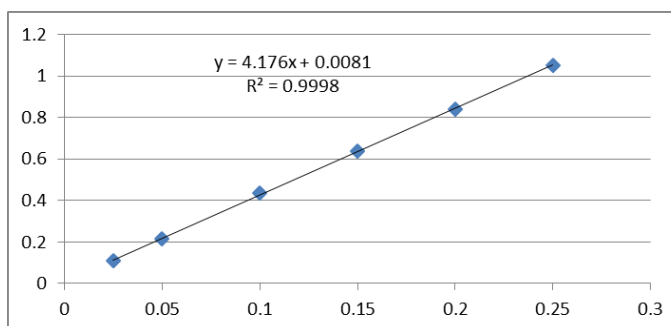
- ❖ **Disolución estándar de *p*-nitrofenol (10 μmoles/ml).** Se pesaron 34.78 mg de *p*-nitrofenol y se aforaron con agua destilada en un matraz volumétrico de 25 mL.
- ❖ **Disolución 2.** Se tomaron 0.5 mL de la disolución anterior y se aforaron a 100 ml con NaOH 0.02 N.
- ❖ **Disolución de hidróxido de sodio 0.02 N,** en adelante referida como disolución 3 (Tabla 5).

La Tabla 5 muestra las cantidades añadidas de cada una de las disoluciones a fin de obtener distintas concentraciones del producto de la reacción (*p*-nitrofenol).

Tubo	Disolución 2 (mL)	Disolución 3 (mL)	Sustrato hidrolizado (μmoles)
1	0.0	5.5	0.0
2	0.5	5.0	0.025
3	1.0	4.5	0.050
4	2.0	3.5	0.100
5	3.0	2.5	0.150
6	4.0	1.5	0.200
7	5.0	0.5	0.250

Después de adicionar las disoluciones, los tubos se agitaron por inversión y las absorbancias se leyeron a 410 nm en el espectrofotómetro Shimadzu UV-1201.

A cada valor de concentración correspondió un valor de absorbancia con lo cual se construyó una ecuación de la forma $y = mx + b$, en donde y corresponde a cada uno de los valores de absorbancia obtenidos en la lectura de las muestras de plasma sanguíneo, m y b a la pendiente de la recta y ordenada al origen respectivamente, y x corresponde al valor de concentración desconocido.



Gráfica 1. Curva de calibración para la determinación de la actividad de la FA.

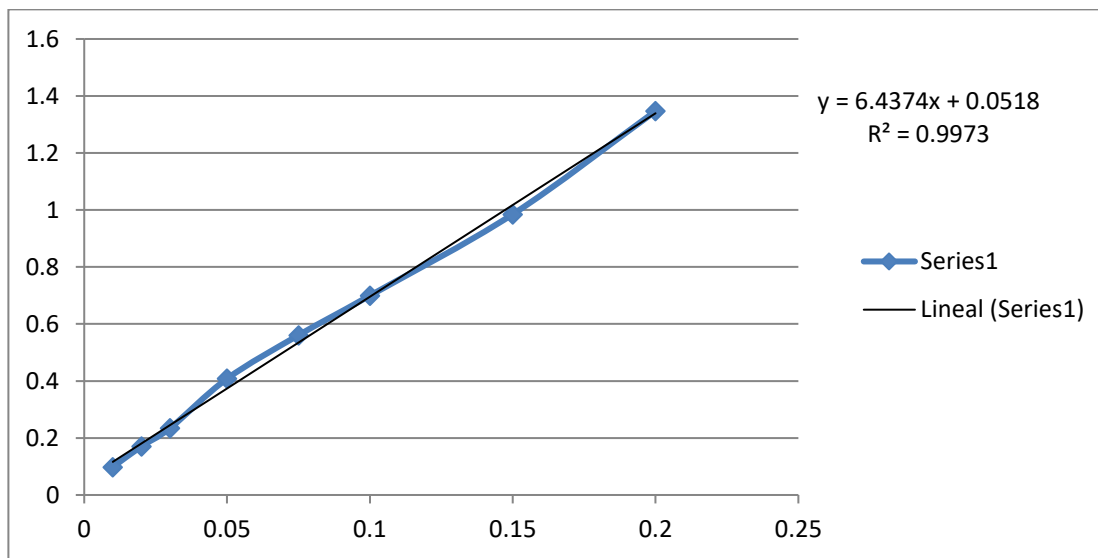
12.2 Curva de calibración de γ -GTP

Se pesaron 13.81 mg de *p*-nitroanilina y se aforaron a 250 mL con ácido acético 1.5 M para preparar la disolución 1 presentada en la Tabla 6, en ésta se especifica la cantidad de agua destilada y disolución 1 añadidas a cada tubo de reacción.

Tubo	Disolución 1 (μ L)	H ₂ O (μ L)	Producto (nmoles/mL)	Producto (μ moles/mL)
1	50	1950	10	0.01
2	100	1900	20	0.02
3	150	1850	30	0.03
4	250	1750	50	0.05
5	375	1625	75	0.75
6	500	1500	100	0.10
7	750	1250	150	0.15
8	1000	1000	200	0.20

Después de adicionar las disoluciones, los tubos se agitaron por inversión y las absorbancias se leyeron a 410 nm en el espectrofotómetro Shimadzu UV-1201.

De manera análoga a la curva estándar de FA, para este caso se obtuvo una ecuación de la forma $y = mx + b$ para conocer la concentración de producto obtenido y dicho valor se empleó para reportar la actividad enzimática como μ mol/Lmin.



Gráfica 2. Curva de calibración para la determinación de la actividad de la γ -GTP.

12.3 Curva de calibración de ALT

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

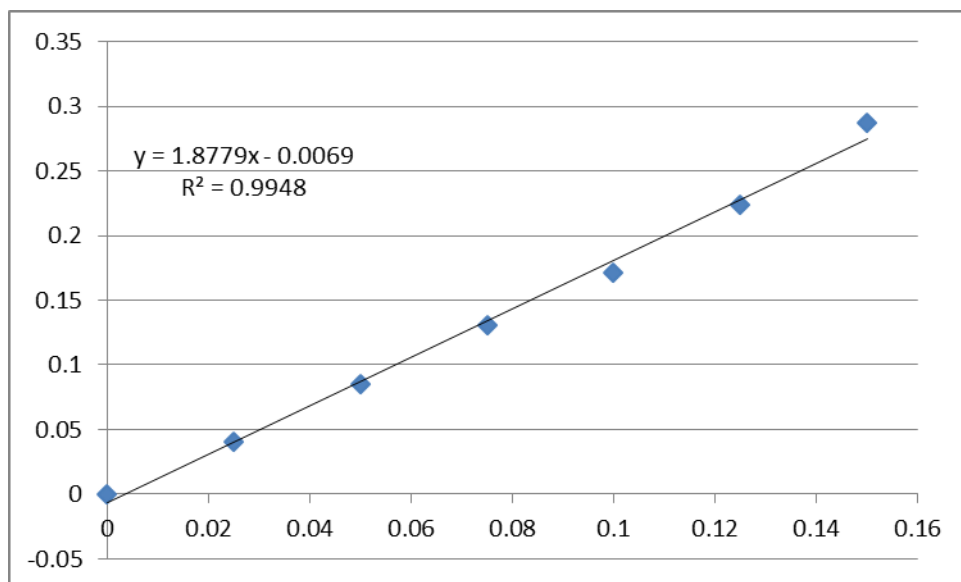
A continuación se describe la preparación de los reactivos utilizados.

- ❖ **Buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.4:** Se mezclaron 840 mL de disolución 0.1 M de fosfato disódico con 160 mL de disolución 0.1 M de fosfato monopotásico.
- ❖ **Disolución de sustrato:** Se disolvieron 1.78 g de D/L alanina y 30 mg de ácido α -oxoglutarico en disolución buffer y se añadieron 0.5 mL de hidróxido de sodio 1 N. La disolución se aforó a 100 mL con disolución buffer. Una vez utilizado el sustrato se conservó a 4 °C hasta su siguiente uso.
- ❖ **Disolución estándar de piruvato (1 μ mol/mL):** la disolución se preparó el mismo día en que fue utilizada, el volumen restante fue desechado. Para prepararla se pesaron 11 mg de piruvato sódico y se mezclaron con 100 mL de disolución buffer.
- ❖ **Reactivo Cromógeno:** Se agregaron 200 mg de 2,4 dinitrofenilhidrazina a HCl 1 N caliente hasta disolverse. Finalmente la disolución se aforó a un litro con HCl 1 N.

Reactivos	Número de tubo						
	1	2	3	4	5	6	7
Disolución sustrato (μ L)	250	225	200	175	150	125	100
Disolución estándar de piruvato (μ L)	----	25	50	75	100	125	150
Buffer de fosfatos (μ L)	50	50	50	50	50	50	50
Reactivo cromógeno (μ L)	250	250	250	250	250	250	250
NaOH 0.4 N (mL)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Piruvato (μ moles)	----	0.025	0.050	0.075	0.100	0.125	0.150

Después de adicionar los reactivos referidos en la Tabla 7 los tubos se mezclaron vigorosamente y se procedió a la lectura de absorbancias a 515 nm en el espectrofotómetro Shimadzu UV-1201.

A partir de los valores de concentración y absorbancia se construyó la curva de calibración y se obtuvo la ecuación de la recta del tipo $y = mx + b$. Con base en los datos de la ecuación, se calcularon las concentraciones (valor de x en la ecuación) a partir de las absorbancias obtenidas para las muestras de plasma.



Gráfica 3. Curva de calibración para la determinación de la actividad de la ALT.

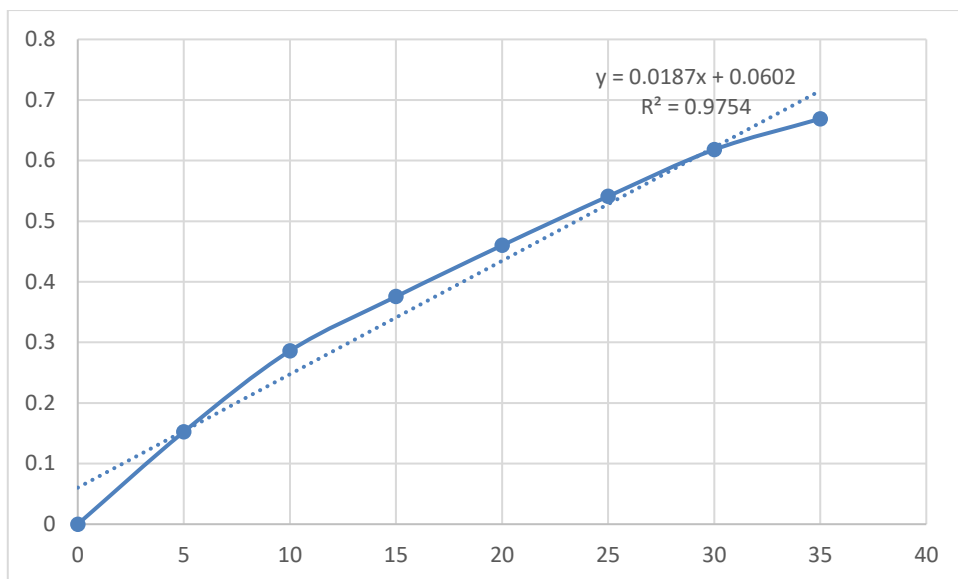
12.4 Proteínas

Se pesaron 10 mg de albúmina sérica bovina y se aforaron a 10 mL con agua tridestilada para prepararla a una concentración de 1 mg/mL. En la Tabla 8 se especifica la cantidad de agua destilada, albúmina y reactivo de Bradford añadidos a cada tubo para llevar a cabo la reacción.

Tubo	Albúmina sérica bovina (µL)	H ₂ O (µL)	Reactivo de Bradford (mL)
1	0	100	2.4
2	5	95	2.4
3	10	90	2.4
4	15	85	2.4
5	20	80	2.4
6	25	75	2.4
7	30	70	2.4
8	35	65	2.4
9	40	60	2.4
10	45	55	2.4
11	50	50	2.4
12	60	40	2.4

Los tubos se agitaron por inversión y a partir de las absorbancias obtenidas a 595 nm en el espectrofotómetro Shimadzu UV-1201 y la concentración conocida de proteínas presentada en la Tabla 8 se calculó la ecuación de la recta.

De manera análoga a las determinaciones de actividad enzimática, los valores de la pendiente, ordenada al origen y las absorbancias para cada muestra (**m**, **b** e **y**, respectivamente), se calculó el valor de concentración de proteínas en los homogenados de hígado.



Gráfica 4. Curva de calibración para la determinación de la cantidad de proteínas.

12.5 GSH

A continuación se describe la preparación de las disoluciones empleadas para elaborar la curva de calibración.

- ❖ **Disolución patrón de glutatión reducido (1 nmol/mL):** se disolvieron 30.7 mg de GSH con disolución de fosfatos 0.3 M hasta completar un volumen de 100 mL.
- ❖ **Disolución de fosfatos:** 42.6 g de Na_2HPO_4 se disolvieron con agua destilada. La disolución se aforó a 1 L, para obtener una concentración final de 0.3 M.
- ❖ **Reactivo de Ellman:** se pesaron 40 mg de ácido 5,5'-ditiobis nitrobenzoico (DTNB) y se disolvieron con 100 mL de una disolución de citrato de sodio al 1%

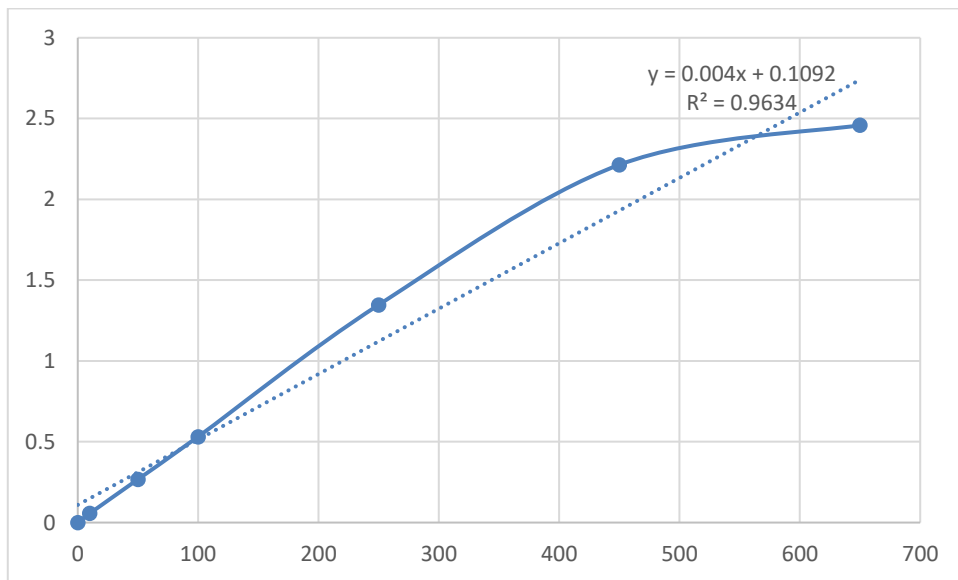
La Tabla 9 muestra las cantidades añadidas de cada una de las disoluciones a fin de obtener distintas concentraciones del producto de la reacción.

Tabla 7. Curva de calibración de GSH.

Tubo	Disolución patrón de GSH (μL)	Disolución de fosfatos (Na_2HPO_4) (mL)	Reactivo de Ellman (DTNB) (mL)	GSH (nmol)
1	0	2.2	0.25	0
2	10	2.19	0.25	10
3	50	2.15	0.25	50
4	100	2.10	0.25	100
5	250	1.95	0.25	250
6	450	1.75	0.25	450
7	650	1.55	0.25	650

Los tubos se agitaron por inversión y a partir de las absorbancias obtenidas a 412 nm en el espectrofotómetro Shimadzu UV-1201 y la concentración conocida de GSH presentada en la Tabla 9 se calculó la ecuación de la recta.

De manera análoga a las determinaciones de actividad enzimática, los valores de la pendiente, ordenada al origen y las absorbancias para cada muestra (**m**, **b** e **y**, respectivamente), se calculó el valor de concentración de GSH en los homogenados de hígado.



Gráfica 5. Curva de calibración para la determinación de la cantidad de GSH.

12.6 Colágena (HP)

Disolución estándar de HP: se pesaron 10 mg (76.26 μmol) de HP y se llevaron a un volumen de 76.26 mL con agua destilada para obtener una disolución de 1 $\mu\text{mol/mL}$ equivalente a 1nmol/ μL .

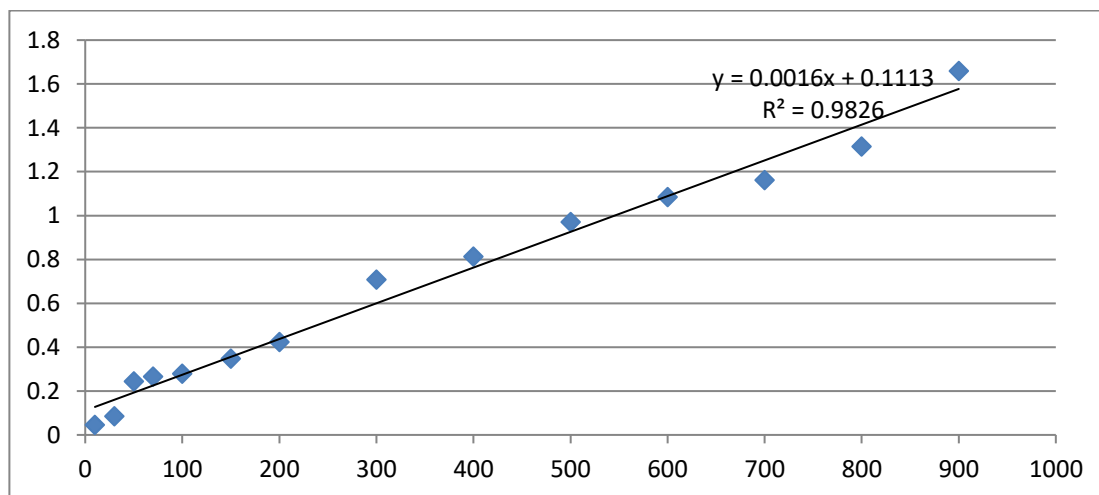
Utilizando la disolución estándar se preparó una serie de 10 tubos con distintas concentraciones de HP presentadas en la Tabla 9.

Tubo	Disolución HP (μL)	H ₂ O (mL)	HP (nmoles)
1	----	2.00	0
2	10	1.99	10
3	30	1.97	20
4	50	1.95	50
5	70	1.93	70
6	100	1.90	100
7	150	1.85	150

8	200	1.80	200
9	300	1.70	300
10	400	1.60	400
11	500	1.50	500

A cada tubo se le agregó 1 mL de cloramina T y se dejaron reposar 20 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se agregaron 0.5 mL de tiosulfato de sodio 2 M, 1 mL de NaOH 1 N, aproximadamente 2 g de NaCl y se agitó inmediatamente para detener la reacción. Posteriormente se agregaron 6 mL de tolueno, se agitaron durante 1 min, se extrajo la capa de tolueno y la fase acuosa se sometió a ebullición en baño maría durante 20 min. Después de enfriar los tubos, se les adicionaron 6 mL de tolueno y se agitaron durante 1 min. Finalmente de la fase orgánica se tomaron alícuotas de 1 mL por duplicado, se les agregaron 4 mL del reactivo de Ehrlich se agitaron fuertemente y se dejó desarrollar la reacción a temperatura ambiente por 30 min. Las absorbancias se leyeron en el espectrofotómetro Shimadzu UV-1201 560 nm.

Para cada valor de concentración correspondió uno de absorbancia, lo que permitió calcular la ecuación de tipo lineal $y = mx + b$. Con dicha ecuación y considerando los valores de m y b como constantes, se calculó la concentración de HP (valor de x) de acuerdo a las absorbancias (valor de y) de cada una de las muestras de hígado.



Gráfica 6. Curva de calibración para la determinación de la cantidad HP.

Tabla 9. Lista completa de los anticuerpos utilizados para los ensayos de Western blot e inmunohistoquímica.

Proteína	Número de catálogo	Marca
IL-6	ARC0962	Invitrogen (Waltham, MA, USA)
IL-10	ARC9102	
Goat anti-Mouse IgG (H+L), HRP	62-6520	
IL-1 β	AB1832P	EMD Millipore (Billerica, MA, USA)
NF- κ B (p65)	MAB3026	
MMP-13	MAB13426	
TGF- β 1	05-1423	
TNF- α	SC-52746	Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA)
IL-17a	SC-374218	
Col-1	C2456	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)
α -SMA	A5691	
4HNE	ab46546	Abcam (Cambridge, MA, USA)
Nrf2	ab31163	
Smad7	ab90086	
phospho-Smad3-Ser213	ab63403	
phospho-JNK-Thr183+Tyr185	ab131499	
Goat anti-Rabbit IgG (H+L), HRP	ab6721	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)
phospho-p38-Thr180+Tyr182	9211S	
β -actin	AM4302	Ambion (Austin, TX, USA)

Tabla 10. Genes estudiados y las sondas utilizadas para las pruebas de qPCR *in vivo*.

Blanco	Secuencia de referencia en el NCBI	Número de catálogo	Tamaño del producto
rNF- κ B (RelA)	NM_199267.2	Rn01502266_m1	67 bp
rIL-1 β	NM_031512.2	Rn00580432_m1	74 bp
rTNF- α	NM_012675.3	Rn01525859_g1	92 bp
rIL-6	NM_012589.2	Rn01410330_m1	121 bp
rIL-10	NM_012854.2	Rn00563409_m1	70 bp
r α -SMA (Acta2)	NM_031004.2	Rn01759928_g1	65 bp
rTGF- β 1	NM_053802.1	Rn01442102_m1	123 bp
rGAPDH	NM_017008.4	Rn01775763_g1	174 bp

Tabla 11. Genes estudiados y las sondas utilizadas para las pruebas de qPCR *in vitro*.

Blanco	Secuencia de referencia en el NCBI	Forward primer	Reverse primer	Tamaño del producto
hIL-6	NM_000600.4	5'-AAA GAG GCA CTG GCA GAA AA-3'	5'-TTT CAC CAG GCA AGT CTC CT- 3'	99 bp
hIL-1 β	NM_000576.2	5'-ATG CAC CTG TAC GAT CAC TGA-3'	5'-ACA AAG GAC ATG GAG AAC ACC-3'	142 bp
hNF- κ B (p65/RelA)	NM_021975.3	5'-AAT GGC TCG TCT GTA GTG C-3'	5'-TGC TCA ATG ATC TCC ACA TAG G-3'	145 bp
hTNF- α	NM_000594.3	5'-ACT TTG GAG TGA TCG GCC-3'	5'-GCT TGA GGG TTT GCT ACA AC- 3'	139 bp
h α -SMA (Acta2)	NM_001141945.2	5'-CTG AGC GTG GCT ATT CCT TC-3'	5'-GCA GTG GCC ATC TCA TTT TC- 3'	109 bp
hPDGF- β receptor	NM_002609.3	5'-GGC TAC ATG GAC ATG AGC AA-3'	5'-TCG GCA GGT CCT CTC AG-3'	150 bp
hSMAD3 (MADH3)	NM_005902.3	5'-GGA GAA ATG GTG CGA GAA GG-3'	5'-GAA GGC GAA CTC ACA CAG C- 3'	259 bp
hTGF- β 1	NM_000660.6	5'-TGA ACC GGC CTT TCC TGC TTC TCA TG-3'	5'-GCG GAA GTC AAT GTA CAG CTG CCG C-3'	152 bp
C-Myc	NM_002467.5	5'-TCA AGA GGC GAA CAC ACA AC-3'	5'-GGC CTT TTC ATT GTT TTC CA- 3'	110 bp
h β -actin (ACTB)	NM_001101.4	5'-GGA GAA TGG CCC AGT CCT C-3'	5'-GGG CAC GAA GGC TCA TCA T- 3'	145 bp