



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

**UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA**

**“Prevención y reversión de la fibrosis hepática por
bloqueo de las vías TGF- β -Smad3 Y JNK-Smad3: efecto
de la naringenina y la curcumina.”**

TESIS

Que presenta

ERIKA HERNÁNDEZ AQUINO

Para obtener el grado de

**DOCTORA EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA**

**Director de la Tesis:
Dr. Pablo Muriel de la Torre**

Ciudad de México

Diciembre, 2017

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

Se contó además con una beca del CONACYT para estudios de posgrado con clave de registro: **358378**

Dedicatorias

Dedico este trabajo y todo lo que él representa a todas y cada una de las personas que a lo largo de cuatro años y han contribuido de alguna manera a que mi formación profesional dentro del Doctorado en Ciencia llegara a su fin satisfactoriamente.

A Dios:

Dios todo poderoso, gracias por haberme dado la fuerza para poder llegar hasta el final de esta gran empresa. Por haber iluminado mi camino cuando más lo necesitaba y haber cuidado de mí y de mis padres mientras estaba fuera de casa, por haberme dado entendimiento, sabiduría, confianza y muuuucha paciencia.

Por haber creado al ser humano con la inquietud para conocer lo que pasa a su alrededor y por lo tanto para querer descubrir lo porqués de los fenómenos naturales y sociales. Las cuestiones biológicas como la transcripción de proteínas, la formación de un nuevo ser en el vientre materno, el mecanismo de acción de los fármacos o la unión de una enzima con su sustrato son mecanismos tan perfectos que solo puedo pensar que fueron pensadas por un ser superior como tú.

Como te dije en la licenciatura y en la maestría: ¡Gracias por ser tú el arquitecto de toda la materia del Universo y sobre todo por ser el mejor Químico!

A mis padres:

Porque sin ellos no existiría, por darme la vida. Gracias por todos sus consejos, regaños, alegrías, enojos, peleas y discusiones que hayamos podido tener, porque todo eso enriquece mi formación. Por haberme enseñado que la responsabilidad y la disciplina son las mejores herramientas que pueda tener para desempeñarme bien en cualquier lugar.

Por darme la mejor herencia de todas, el estudio y el conocimiento, porque eso nadie me lo puede quitar y sin embargo siempre se debe seguir estudiando para perfeccionar las habilidades que se adquieren con el tiempo. Gracias por haber tenido paciencia durante todo este tiempo, por esperarme, preocuparse y sobre todo por soportarme durante 29 años y los que nos faltan.

Al H. Boro:

*A la ahora **Doña Esme**, por haber soportado vivir conmigo algunos años y sobre todo por haber creado a esa bolita de carne llamada Arturo, que desde su nacimiento llenó la casa de alegría y cada vez que regresaba del laboratorio me recibía corriendo para ponernos a jugar, muchas veces eso me ayudó para no volverme más loca de lo que ya estoy. A **Sael** que, aunque nos sacamos de quicio mutuamente y todo el tiempo peleamos, siempre terminamos contentándonos. A la **Tía Edna** que, con sus ocurrencias, lugares a los que nos llevaba a pasear, a comer y sobre todo a perder, nos hizo pasar momentos muy chistosos, si no nos perdemos es como no haber ido a ningún lado. Y a **Gus**, ese pequeño gruñis que poco a poco se fue abriendo (aunque diga que no) a nuevas experiencias, aunque solo sea seamos sus "compañeros" en el fondo se que nos quiere jijijij.*

Mención especial:

*Esta mención especial es para **Jan de Dios** que muchas veces tuvo que escuchar pacientemente mis múltiples traumas académicos y existenciales. Otra es para **Pau, Nadia y Dany** por ser tan chistosos, hacer amena mi estancia temporal en su laboratorio. Y finalmente a **Rosytaaaa** y a **mi Don Benja**, por haber compartido casi 5 años en el laboratorio y llegar a ser más que los técnicos del laboratorio, por ser mis amigos =).*

Agradecimientos:

Al Dr. Pablo Muriel de la Torre: Por el gran apoyo que me ha dado, además de la confianza que ha puesto en mí para estar en su equipo de trabajo. Gracias por sus consejos, correcciones y sobre todo por su paciencia en los momentos más difíciles y por estar abierto a las ideas que tenemos los alumnos.

A mis sinodales Dra. Liliana Favari, Dra. Mineko Shibayama, Dr. José Segovia y Dr. Eduardo Fernández: Agradezco mucho su apoyo en la realización de este trabajo ya que siempre estuvieron dispuestos a compartir sus conocimientos, a dar consejos y críticas constructivas y objetivas. Y en especial a la Dra. Liliana, Dra. Mineko y Dr. Segovia por permitirme estar en sus laboratorios para aprender y trabajar con sus respectivos grupos de investigación.

A la Lic. en Fnf. Rosa Elena Flores Beltrán, al Sr. Benjamín Salinas Hernández, al Sr. Luis Ramón Hernández Guadarrama, a la Hidrobiol. Teresa García Camacho y a la Lic. en Fnf. Laura Dayana Buendía : Por su excelente apoyo técnico para la realización de este trabajo, por hacer muy amena mi estancia en el laboratorio y por sus consejos de todo tipo.

A la M. en C. Angélica Silva Olivares: Por su gran apoyo en una parte muy importante de este trabajo y por brindarme sus explicaciones en materia de inmunohistoquímicas.

Al Dr. Natanael Zarco: Por haber contribuido en la estandarización e implementación de la técnica de western blot, así como por su dedicación, paciencia y buen ánimo durante el proceso experimental.

Al M. en C. Marco Quezada: Por haber participado en la estandarización de las técnicas de RT-PCR y qRT-PCR, pero sobre todo por su paciencia, por haberme enseñado desde el principio y por su ayuda para sortear todos los obstáculos encontrados.

A la Q.F.I. Paula Vergara y a la Q.F.B. Araceli Navarrete: Por su invaluable apoyo en las técnicas de western blot y PCR, así como por su amabilidad y paciencia.

Al M.V.Z. Ricardo Gaxiola Centeno, M.V.Z. Benjamín E. Chávez Álvarez y al M.V.Z. Rafael Leyva Muñoz: Por su trabajo de apoyo técnico en la UPEAL, ya que sin los cuidados que les brindan a los animales de experimentación, ellos no estarían en óptimas condiciones.

Erika Hernández Aquino

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	13
RESUMEN	15
ABSTRACT	16
1 INTRODUCCIÓN	17
1.1 Generalidades del hígado	17
1.2 Fibrosis y cirrosis	18
1.3 Vía canónica y no canónica del TGF- β	21
1.4 Fibrosis experimental: el CCl ₄	24
1.5 La NAR y la CUR como hepatoprotectores	25
1.5.1 La NAR	25
1.5.2 La CUR	29
2 JUSTIFICACIÓN	32
3 HIPÓTESIS	33
4 OBJETIVOS	34
4.1 Objetivo general	34
4.2 Objetivos particulares	34
5 MATERIALES Y MÉTODOS	35
5.1 Material biológico	35
5.2 Reactivos	35
5.3 Diseño experimental	35
5.3.1 Modelo de prevención	35
5.3.2 Modelo de reversión	37
5.3.3 Tratamiento de las muestras	38
5.4 Determinación de los marcadores de daño hepático	40
5.4.1 Alanina aminotransferasa	40
5.4.2 Fosfatasa alcalina	41

5.4.3	Gamma-glutamyl transpeptidasa	42
5.4.4	Peroxidación lipídica	43
5.4.4.1	Determinación de las proteínas por el método de Bradford	44
5.4.5	Glutación reducido en hígado y sangre	44
5.4.6	Glutación peroxidasa	45
5.4.7	Glucógeno	46
5.4.8	Colágena	47
5.5	Histologías	49
5.5.1	Tinción de hematoxilina y eosina	49
5.5.2	Tinción tricrómica de Masson	50
5.5.3	Inmunohistoquímica	51
5.6	Zimografía	52
5.7	Western blot	53
5.8	Reacción en cadena de la polimerasa	56
5.8.1	Extracción de RNA	56
5.8.2	Tratamiento con ADNsa	57
5.8.3	RT-PCR	57
5.8.4	RT-PCR punto final	58
5.8.5	qRT-PCR	58
5.9	Análisis estadístico	59
6	RESULTADOS	60
6.1	Estudio del mecanismo de acción de la NAR en la prevención del daño hepático crónico inducido por el CCl ₄	60
6.1.1	La administración de la NAR previno la inflamación durante el daño hepático crónico experimental	60
6.1.2	La NAR preservó la actividad normal de MMP9 y MMP2 en la cirrosis hepática	61
6.1.3	La NAR bloqueó la transdiferenciación de las CEHs y la síntesis de Col-I por inhibición de las proteínas profibrogénicas	62
6.1.4	La NAR inhibió la proliferación de las CEHs por el bloqueo de la vía no canónica de JNK-pSmad3L	64
6.2	Efecto de la NAR y la CUR sobre el daño hepático crónico previamente establecido por el CCl ₄ : reversión de la cirrosis	65
6.2.1	Efecto de la NAR sobre la reversion de la cirrosis	65
6.2.1.1	Efecto macroscópico y microscópico de la NAR sobre el daño hepático crónico previamente establecido por el CCl ₄	65
6.2.1.2	La NAR revirtió la necrosis y la colestasis en las ratas tratadas con CCl ₄	67

6.2.1.3	La NAR restablece los niveles normales del glutatión reducido, pero no los de la peroxidación lipídica	68
6.2.1.4	La administración de la NAR revirtió la inflamación en las ratas con cirrosis experimental previamente establecida	69
6.2.1.5	La NAR revirtió la acumulación de colágena en las ratas con cirrosis hepática experimental	69
6.2.1.6	Efecto de la NAR sobre la remodelación de la matriz extracelular en las ratas tratadas con CCl ₄	71
6.2.1.7	Efecto de la NAR sobre la transdiferenciación de las CEHs	73
6.2.1.8	La administración de la NAR inhibe la vía JNK-Smad3	73
6.2.1.9	La NAR ejerce sus efectos antifibróticos en parte vía Smad7	75
6.2.1.10	La NAR restableció la capacidad biosintética del hígado en las ratas administradas con CCl ₄	76
6.2.2	Efecto de la CUR sobre la reversión de la cirrosis	77
6.2.2.1	Efecto macroscópico y microscópico de la CUR sobre el daño hepático crónico previamente establecido por el CCl ₄	77
6.2.2.2	La CUR revirtió la necrosis y la colestasis en las ratas tratadas con el CCl ₄	79
6.2.2.3	La CUR restablece los niveles normales del glutatión reducido hepático.	79
6.2.2.4	La administración de la CUR revirtió la inflamación en las ratas con cirrosis experimental	80
6.2.2.5	La CUR revirtió la acumulación de la colágena en las ratas con cirrosis hepática experimental previamente establecida	80
6.2.2.6	Efecto de la CUR sobre la remodelación de la matriz extracelular en las ratas tratadas con el CCl ₄	82
6.2.2.7	Efecto de la CUR sobre la transdiferenciación de las CEHs	84
6.2.2.8	La administración de la NAR inhibe la vía JNK-Smad3	84
6.2.2.9	La CUR ejerce sus efectos antifibróticos vía Smad 7	86
6.2.2.10	La CUR restableció la capacidad biosintética del hígado en las ratas administradas con el CCl ₄	87

7 DISCUSIÓN 88

7.1 Estudio del mecanismo de acción de la NAR en la prevención del daño hepático crónico inducido por el CCl₄ 88

7.2 Efecto de la NAR y la CUR en el daño hepático crónico previamente establecido por el CCl₄: reversión de la cirrosis 91

7.2.1 Efecto de la NAR y la CUR sobre la reversión de la cirrosis previamente establecida a nivel tisular 92

7.2.2 En la reversión de la cirrosis, la NAR y la CUR disminuyeron las CEHs transdiferenciadas 92

7.2.3 La NAR y la CUR inducen la remodelación y la eliminación de la 98

matriz extracelular durante la reversión hepática previamente establecida	
7.2.4 Efecto de la NAR y la CUR sobre la vía canónica y no canónica del TGF- β -Smads	101
7.2.5 Estimulación de Smad7 por la NAR y la CUR puede inhibir la vía canónica del TGF- β	103
7.2.6 Efecto antioxidante de la NAR y la CUR	104
7.2.7 La NAR y la CUR normalizan los marcadores bioquímicos de daño hepático y el glucógeno	104
8 CONCLUSIONES	105
9 PERSPECTIVAS	106
10 REFERENCIAS	107

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla I. Efectos de la naringenina (NAR) en diferentes modelos de daño hepático	27
Tabla II. Efecto de la naringenina en la prevención del daño hepático por la administración del CCl ₄ .	28
Tabla III. Efectos de la curcumina (CUR) en diferentes modelos de daño hepático	30
Tabla IV. Grupos experimentales y dosis en el modelo de prevención del daño hepático crónico	35
Tabla V. Diluciones de CCl ₄ a lo largo de las 8 semanas de tratamiento crónico	36
Tabla VI. Grupos experimentales y dosis en el modelo de prevención del daño hepático crónico	37
Tabla VII. Curva de calibración de la alanina aminotransferasa	41
Tabla VIII. Curva estándar de la fosfatasa alcalina	42
Tabla IX. Curva de calibración de la gamma glutamil transpeptidasa	43
Tabla X. Curva de calibración del glutatión reducido en hígado y sangre	45
Tabla XI. Curva estándar de la hidroxiprolina	48
Tabla XII: Anticuerpos y diluciones utilizadas en la inmunohistoquímica	52
Tabla XIII: Anticuerpos utilizados para el western blot	54
Tabla XIV: Tiempo y número de lavados, así como tiempo de revelado cada proteína estudiada por western blot	55
Tabla XV: Secuencia de primers utilizados para la RT-PCR	58
Tabla XVI: Secuencia de primers y condiciones utilizadas para la qRT-PCR	59

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema de un lobulillo hepático	17
Figura 2. Los hepatocitos apoptóticos inducen la fibrosis hepática	19
Figura 3. Sitios de la fosforilación en la región “linker” y C-terminal de la Smad2 y Smad3	22
Figura 4. Vía de señalización del TGF- β y JNK durante el daño hepático crónico	23
Figura 5. Estructura de la naringenina (4', 5,7-trihidroxi-flavonona, NAR)	26
Figura 6. Estructura química de la curcumina (CUR)	29
Figura 7. Representación esquemática de la hipótesis	33
Figura 8. Esquema del modelo de prevención del daño hepático crónico inducido por el CCl ₄	36
Figura 9. Esquema del modelo de prevención del daño hepático crónico inducido por el CCl ₄	38
Figura 10. Marcadores bioquímicos del daño hepático y otras técnicas realizadas	39
Figura 11. La naringenina (NAR) previno la inflamación en ratas las tratadas con el CCl ₄ .	61
Figura 12. La naringenina (NAR) previno la elevación en la actividad de las metaloproteasas (MMPs) 9 y 2 en las ratas tratadas con el CCl ₄ .	62
Figura 13. La naringenina (NAR) previno la elevación de los niveles proteicos de TGF- β , α -SMA, CTGF, MMP13 y Col-I, mientras que mantuvo los de Smad7 en las ratas tratadas con el CCl ₄ .	63
Figura 14. La naringenina (NAR) previno la fosforilación de Smad3 en el “linker” por JNK en las ratas tratadas con el CCl ₄ .	64
Figura 15. Efecto de la naringenina (NAR) sobre la arquitectura macroscópica y microscópica en las ratas tratadas con el CCl ₄	66

Figura 16. La naringenina (NAR) revirtió la necrosis y la colestasis en las ratas tratadas con el CCl ₄ .	67
Figura 17. La naringenina (NAR) restableció los niveles de glutatión reducido en las ratas tratadas con el CCl ₄ .	68
Figura 18. La naringenina (NAR) revirtió la inflamación en las ratas tratadas con el CCl ₄ .	70
Figura 19. La naringenina (NAR) revirtió la acumulación de colágena en las ratas tratadas con el CCl ₄ por 12 semanas.	71
Figura 20. La naringenina (NAR) revirtió la remodelación de la matriz extracelular de las ratas tratadas con el CCl ₄ .	72
Figura 21. La naringenina (NAR) revirtió la activación de las células estelares de las ratas tratadas con el CCl ₄ .	74
Figura 22. La administración de la naringenina (NAR) inhibió la vía JNK-Smad3 en las ratas tratadas con el CCl ₄ .	75
Figura 23. La administración de la naringenina (NAR) promovió la vía inhibitoria del TGF- β en las ratas tratadas con el CCl ₄ .	76
Figura 24. La naringenina (NAR) restableció la capacidad biosintética del hígado en las ratas administradas con el CCl ₄ .	76
Figura 25. Efecto de la curcumina (CUR) sobre la arquitectura macroscópica y microscópica en las ratas tratadas con el CCl ₄ .	78
Figura 26. La curcumina (CUR) revirtió la necrosis y la colestasis en las ratas tratadas con el CCl ₄ .	79
Figura 27. La curcumina (CUR) restableció los niveles del glutatión reducido (GSH) en las ratas tratadas con el CCl ₄ .	79
Figura 28. La curcumina (CUR) revirtió la inflamación en las ratas tratadas con el CCl ₄ .	81
Figura 29. La curcumina (CUR) revirtió la acumulación de la colágena en las ratas tratadas con el CCl ₄ por 12 semanas.	82
Figura 30. La curcumina (CUR) revirtió la remodelación de la matriz extracelular	83

de las ratas tratadas con el CCl₄.

Figura 31. La curcumina (CUR) revirtió la activación de las células estelares de las ratas tratadas con el CCl₄. 85

Figura 32. La administración de la curcumina (CUR) inhibió la vía JNK-Smad3 en las ratas tratadas con el CCl₄. 86

Figura 33. La administración de la curcumina (CUR) promovió la vía inhibitoria del TGF- β en las ratas tratadas con el CCl₄. 87

Figura 34. La curcumina (CUR) restableció la capacidad biosintética del hígado en las ratas administradas con el CCl₄. 87

LISTA DE ABREVIATURAS

α -SMA	Alfa-actina del músculo liso
ALT	Alanina aminotransferasa
Cas	Caspasa
CAT	Catalasa
$\text{CCl}_3\cdot$	Radical libre triclorometilo
$\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$	Radical triclorometilperoxilo
CEHs	Células estelares hepáticas
CMC	Carboximetil celulosa
Col-I	Colágena tipo I
CTGF	Factor de crecimiento del tejido conectivo
CUR	Curcumina
FA	Fosfatasa alcalina
γ -GTP	Gamma-glutamil transpeptidasa
GCL	Glutamato-cisteína ligasa
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
HP	Hidroxi prolina
H y E	Hematoxilina y eosina
iCEHs	CEHs inactivas
IOD	Índice de densidad óptica
i.p.	Intraperitoneal
IKB	Inhibidor de kappa B
IKK	Cinasa de I κ B
LBD	Dominio de unión a ligando
MDA	Malondialdehído
MEC	Matriz extracelular
MMPs	Metaloproteasas
NAR	Naringenina
NF- κ B	Factor nuclear- κ B
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PL	Peroxidación lipídica
PPAR- γ	Receptor gamma activado por el proliferador del peroxisoma
PUFAS	Ácidos grasos poliinsaturados
EROS	Especies reactivas de oxígeno
R-Smad	Smad activadas por receptor

Ser	Serina
SFB	Suero fetal bovino
Smurf	Factor de ubiquitinación regulador de las proteínas Smad
SOD	Superóxido dismutasa
T β RI	Receptor tipo I
T β RII	Receptor tipo II
TGF- β	Factor de crecimiento transformante-beta
Thr	Treonina
TIMPs	Inhibidores tisulares de metaloproteinasas
TLR	Receptor tipo Toll
TNF- α	Factor de necrosis tumoral-alfa
v.o.	Vía oral
WB	Western blot
SE	Error estándar

RESUMEN

En este trabajo se pretendió elucidar el mecanismo de acción de la NAR en la prevención del daño hepático crónico experimental y evaluar la capacidad de la NAR y la CUR para revertir una cirrosis previamente establecida.

Mecanismo de acción de la NAR en la prevención del daño hepático experimental: las ratas Wistar machos fueron administradas con 400 mg kg⁻¹ de CCl₄ 3 veces/semana i.p, durante 8 semanas para inducir el daño hepático. Por otro lado, para evaluar el mecanismo de la NAR en la prevención de la fibrosis hepática, 8 ratas fueron administradas con 400 mg kg⁻¹ de CCl₄ 3 veces/semana durante 8 semanas + 100 mg kg⁻¹ de NAR diario v.o. por las mismas 8 semanas. La NAR fue capaz de prevenir la elevación de las proteínas profibrogénicas TGF-β, α-SMA, CTGF, Col-1 y MMP13; redujo la actividad de las MMP2 y 9, los niveles de los NF-κB, IL-1β e IL-10, así como la activación de JNK y la fosforilación de Smad3 en el “linker”.

Modelo de reversión de la cirrosis experimental: se administró el CCl₄ por 12 semanas a las ratas Wistar macho (400 mg kg⁻¹, 3 veces/semana); pero, al inicio de la semana 9 de daño se administró la NAR o CUR (100 mg kg⁻¹/2 día, v.o) para determinar su capacidad para revertir la cirrosis experimental previamente establecida. Por medio de las técnicas de western blot, inmunohistoquímica y qRT-PCR se demostró que la NAR y la CUR tuvieron la capacidad de revertir la elevación de los marcadores bioquímicos de daño hepático y de restaurar el GSH y el glucógeno. Por otro lado, regresaron a la normalidad los niveles de TGF-β, α-SMA (proteína y mRNA), CTGF, Col-1 y MMP13, así como la actividad de las MMP2 y 9 y los niveles de NF-κB, IL-1β e IL-10. También pudieron revertir la activación de JNK y la fosforilación de Smad3 en el “linker”, así como la proteína y mRNA de Smad3.

Los resultados mostraron que la NAR y la CUR bloquearon las vías del TGF-β-Smad3 y JNK-Smad3 y por este medio llevaron a cabo sus efectos antifibróticos, haciéndolas buenas candidatas para estudios clínicos.

ABSTRACT

The aim of this study was to elucidate the mechanism of action of naringenin (NAR) to prevent from chronic liver damage and to evaluate the ability of NAR and curcumin (CUR) to reverse the previously established cirrhosis.

Mechanism of action of NAR in preventing experimental liver damage: male Wistar rats were given 400 mg kg^{-1} CCl_4 3 times / week i.p for 8 weeks to induce liver damage. In order to evaluate NAR mechanism in hepatic fibrosis prevention, 8 rats were administered with 400 mg kg^{-1} of CCl_4 3 times / week for 8 weeks + 100 mg kg^{-1} of NAR, daily, p.o. for 8 weeks. NAR was able to prevent the elevation of profibrogenic proteins as TGF- β , α -SMA, CTGF, Col-1 and MMP13; also, reduced the activity of MMP2 and 9, decreased NF- κ B, IL-1 β and IL-10 levels, as well as lowered the activation of JNK and Smad3 phosphorylation in the linker domain.

Reversal model of experimental cirrhosis: CCl_4 was given for 12 weeks to male Wistar rats (400 mg kg^{-1} , 3 times/week); however, NAR or CUR (100 mg kg^{-1} / two times a day, p.o) was administered at the beginning of week 9 of CCl_4 treatment to determine its ability to reverse established experimental cirrhosis. Western blot, immunohistochemistry and qRT-PCR techniques demonstrated that NAR and CUR had the ability to reverse liver damage biochemical markers elevation and to restore GSH and glycogen. On the other hand, levels of TGF- β , α -SMA (protein and mRNA), CTGF, Col-1 and MMP13, as well as the activity of MMP2 and MMP9 and levels of NF- κ B, IL-1 β and IL-10 were restored by NAR or CUR treatment. They also reversed JNK activation and Smad3 phosphorylation in the “linker” domain, as well as protein and Smad3 mRNA.

The results demonstrate that NAR and CUR block TGF- β -Smad3 and JNK-Smad3 pathways and thereby carry out their antifibrotic effects, making them good candidates for properly performed clinical studies.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del hígado

El hígado es la glándula más voluminosa del cuerpo humano, pesa alrededor de 1.4 kg en el adulto promedio, se encuentra debajo del diafragma y ocupa la mayor parte del hipocondrio derecho.

El hígado está formado por unidades funcionales llamadas lobulillos, constituidos por células epiteliales especializadas llamadas hepatocitos organizadas en torno a una vena central. El lobulillo hepático contiene capilares muy permeables llamados sinusoides, a través de los cuales circula la sangre. En los sinusoides también están presentes las células de Kupffer que son macrófagos residentes del hígado (Figura 1) (1).

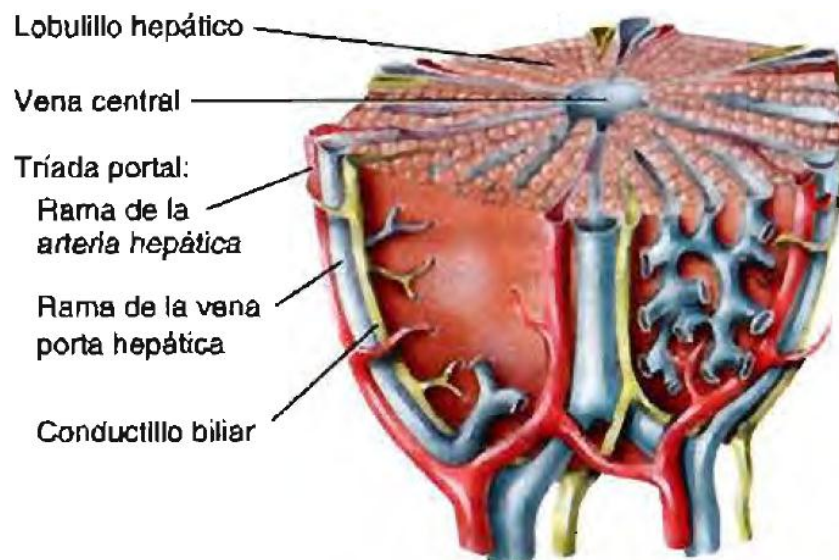


Figura 1. Esquema de un lobulillo hepático. EL lobulillo es la unidad funcional del hígado que consiste en un grupo de hepatocitos dispuestos alrededor de una vena central (1).

Cada célula hepática se encuentra adyacente a los canalículos biliares y la bilis que secretan entra en los canalículos biliares y es almacenada en la vesícula biliar (1, 2). Además de producir bilis, el hígado cumple otras funciones vitales como son: el metabolismo de los

hidratos de carbono, de lípidos y de proteínas; el procesamiento de fármacos y hormonas, la excreción de bilirrubina y el almacenamiento de sales biliares.

1.2 Fibrosis y cirrosis

Las enfermedades hepáticas representan uno de los mayores problemas de salud en la sociedad actual. La fibrosis resulta del daño crónico al hígado en conjunto con la acumulación de proteínas de la matriz extracelular (MEC), llevando a la formación de las cicatrices, la pérdida de la arquitectura tisular, el desarrollo de los nódulos de regeneración y falla del órgano. Independientemente de la causa del daño, la fibrosis representa la consecuencia final de una inflamación hepática crónica (3-5).

Las principales causas de la fibrosis hepática incluyen la infección por el virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis B, el abuso del alcohol y la esteatohepatitis no alcohólica (4, 5).

Los hepatocitos son más susceptibles que otras células a los agentes tóxicos y son las primeras células en dañarse tras una lesión hepática, los hepatocitos lesionados liberan especies reactivas de oxígeno (EROS) que dañan las membranas celulares como la del retículo, la de la mitocondria y la membrana celular derivando en el estrés oxidativo, la peroxidación lipídica (PL) y el incremento de las concentraciones celulares de calcio, hasta llegar a la apoptosis (3-6).

Los hepatocitos apoptóticos sufren la fragmentación del ADN y forman cuerpos apoptóticos que pueden ser fagocitados por las células de Kupffer, las cuales se activan y producen citocinas profibrogénicas como el factor de crecimiento transformante-beta (TGF- β), el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (3-6).

El TGF- β y el PDGF son las principales citocinas involucradas en la fibrogénesis ya que actúan sobre un tipo celular hepático llamado células estelares hepáticas (CEHs). En el

hígado normal las CEHs se encuentran en reposo en el espacio de Disse, expresando marcadores característicos de adipocitos como PPAR γ , SREBP-1c y leptina, además son el principal almacén de vitamina A (4, 6).

Tras el daño hepático y por la intervención del PDGF y del TGF- β , las CEHs se activan, transdiferenciándose en miofibroblastos contráctiles y proliferativos que son los responsables de la excesiva secreción de MEC; además, las CEHs expresan marcadores miogénicos como la alfa-actina del músculo liso (α -SMA) y c- myc. Otra característica de la transdiferenciación de las CEHs es la producción de citocinas proinflamatorias que causan el reclutamiento de linfocitos y la capacidad de migración hacia los sitios de reparación del tejido, donde se acumulan secretando grandes cantidades de MEC. Las CEHs activadas también liberan TGF- β que, de forma autócrina, estimula las vías de señalización profibrogénicas en las CEHs (Figura 2) (3-8).

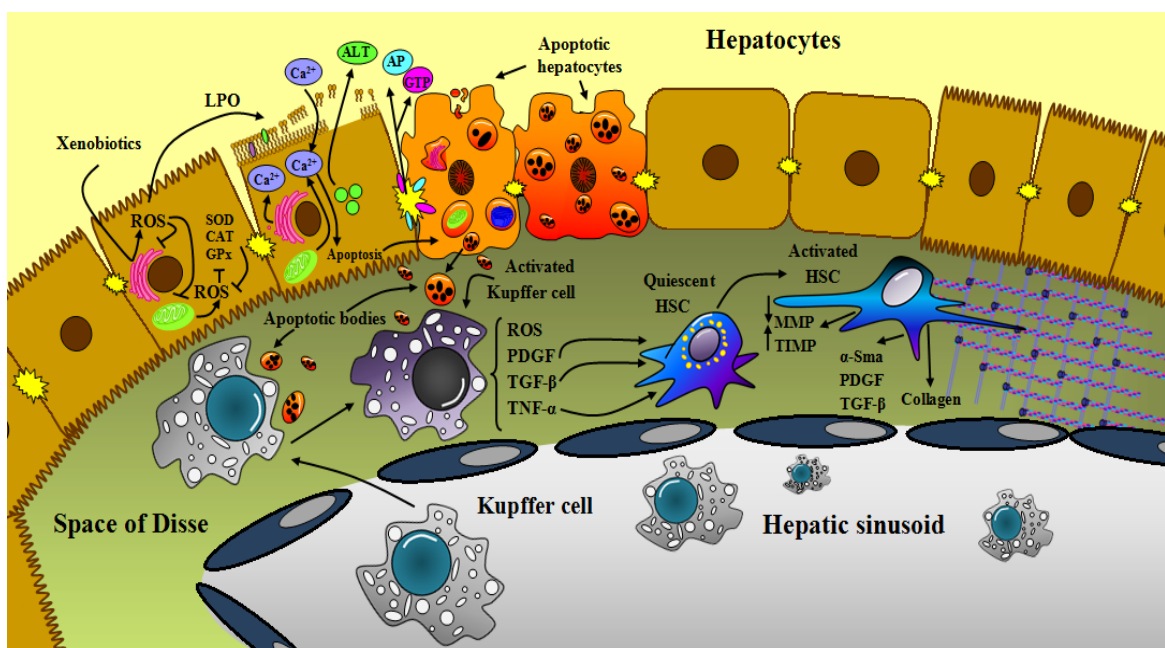


Figura 2. Los hepatocitos apoptóticos inducen la fibrosis hepática. En respuesta a una lesión, los hepatocitos forman cuerpos apoptóticos, que son fagocitados por las células de Kupffer, las células estelares hepáticas o los hepatocitos sanos, posteriormente liberan citocinas profibrogénicas que activan a las células estelares (Modificado de 7).

Las vías de señalización intracelulares juegan un papel fundamental en la patogénesis de la fibrosis, principalmente la del TGF- β , que tiene tres efectos principales: la activación de las CEHs, la estimulación de la síntesis de la MEC y la supresión de la degradación de MEC (6, 7).

En respuesta al TGF- β , las CEHs producen colágena tipos I (Col-I), III y IV, proteoglicanos, glicoproteínas, fibronectina, tenascina y glicosaminoglicanos que son componentes de la MEC. La progresión de la fibrosis hepática está asociada con un aumento en la producción de MEC y a la disminución de su degradación, derivada de dos factores: el primero es la expresión a la baja de las metaloproteasas (MMPs), la cuales desintegran a la MEC. El segundo es la sobreexpresión de los inhibidores tisulares de las metaloproteasas (TIMPs), que inhiben a las MPP. El TGF- β está implicado en la regulación de la remodelación de la MEC que se relaciona directamente con la inhibición de las MMPs, con la expresión aumentada del TIMP1 y del factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF), indicando que la progresión de la fibrosis hepática puede ser detenida por el bloqueo del TGF- β (3, 6).

Los eventos antes mencionados desencadenan el desarrollo de la fibrosis hepática, pero la inhibición o estimulación de ciertas vías de señalización, puede llegar a prevenir o revertir el desarrollo de dicha patología; por ejemplo, el aumento de la actividad colagenolítica o la inhibición de la vía del TGF- β .

La fibrosis hepática progresa rápidamente a la cirrosis en varios entornos clínicos. La cirrosis puede ser definida como la consecuencia final de la fibrosis y tiene como resultado la formación de nódulos de hepatocitos en el parénquima hepático y alteración de la circulación sanguínea y de la función del órgano (4-9).

Más del 40% de los pacientes con cirrosis, son asintomáticos y pueden permanecer así por décadas, pero el deterioro progresivo es inevitable, desarrollándose complicaciones como la ascitis, las hemorragias varicosas, las encefalopatías, la disfunción hepatocelular y el aumento de la resistencia intrahepática. Los pacientes con cirrosis pueden permanecer

libres de complicaciones graves durante varios años, es decir, es una cirrosis compensada, mientras que la cirrosis descompensada se asocia con un tiempo de vida corto y el trasplante de hígado se indica a menudo como la única terapia eficaz (4-10).

Por lo anterior, es indispensable la búsqueda de tratamientos que resuelvan el problema de la salud mundial en el que se ha convertido la cirrosis y la fibrosis, tanto para su prevención como para la reversión, ya que, si se logra prevenir dicha enfermedad, se evitará que siga progresando y se mejorará la calidad de vida del paciente.

1.3 Vía canónica y no canónica del TGF- β

Conocer el mecanismo de acción del TGF- β , es decir, la vía de señalización por la que ejerce sus efectos profibrogénicos, es esencial para buscar puntos de regulación de la vía e impedir el desarrollo de la fibrosis y posteriormente la cirrosis.

El TGF- β es una proteína de 25 kDa, dimérica, que se une a su receptor con actividad de cinasa de serina (Ser)/treonina (Thr). El receptor a este está formado por dos subunidades, el receptor tipo I (T β RI) y el receptor tipo II (T β RII). Primero, el TGF- β se une al T β RII con gran afinidad y después al T β RI; posteriormente, el dominio de cinasa del T β RII, que está constitutivamente activo, fosforila al dominio cinasa Ser/Thr del T β RI, activándolo para fosforilar a unos factores de transcripción citoplasmáticos llamados Smads activadas por receptor (R-Smads) (11, 12).

Las Smads están divididas en tres clases de acuerdo a sus funciones: R-Smads, que son activadas por receptores de la familia del TGF- β ; la Co-Smad4, que se une a las R-Smads para que se puedan traslocar al núcleo y las I-Smads que antagonizan las funciones de las R-Smads, inhibiendo la vía por ubiquitinización del T β RI y R-Smads. Las Smads tienen tres dominios que son: el N-dominio terminal, el dominio “linker” y el C-dominio terminal (12-14).

Una vez que el T β RI ha sido activado fosforila a las R-Smads en su C-terminal activándolas y liberándolas para unirse con la Co-Smad4 para transportarse al núcleo donde se pueden asociar con otras proteínas de unión al ADN y activar o inhibir factores de transcripción para ciertos genes anti (Smad7) o profibrogénicos (α -SMA, Col-I y CTGF) (11, 15).

La vía canónica del TGF- β y R-Smads se lleva a cabo por la fosforilación en las Ser⁴⁶⁵ y Ser⁴⁶⁷ de la Smad2 en su C-terminal y de las Ser⁴²³ y Ser⁴²⁵ de la Smad3 también en su C-terminal. Sin embargo, la región “linker” también puede sufrir fosforilaciones en residuos de Ser y Thr, por las MAPK, incluyendo a ERK, JNK, p38 y CDK4, que pueden fosforilar al “linker” de la Smad2 en la Thr²²⁰, Ser²⁴⁵, Ser²⁵⁰, Ser²⁵⁵, mientras que, a Smad3 en la Thr¹⁷⁹, Ser²⁰⁴, Ser²⁰⁸, Ser²¹³ (Figura 3) (12, 16).

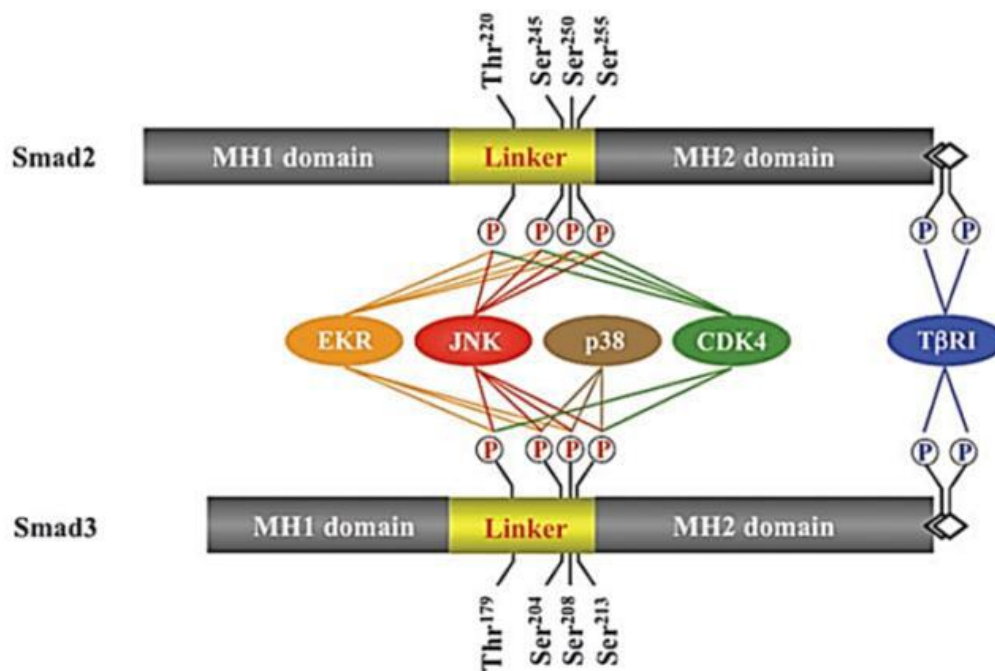


Figura 3. Sitios de la fosforilación en la región “linker” y C-terminal de la Smad2 y Smad3 (17).

El TβRI y JNK/CDK4/ERK fosforilan diferencialmente a las R-Smads, creando tres fosfoisoformas: R-Smads fosforiladas en el C-terminal (pSmad2C y pSmad3C), R-Smads fosforiladas en el “linker” (pSmad2L y pSmad3L) y R-Smads fosforiladas tanto en el C-terminal como en el “linker” (pSmad2L/C y pSmad3L/C) (12, 16).

En condiciones normales, el TGF-β inhibe el crecimiento y la proliferación de las CEHs por regulación a la baja de la expresión de c-Myc, vía pSmad2C y pSmad3C. Por otro lado, el TGF-β favorece la expresión de la Smad7 vía pSmad3C; esta Smad junto con el factor de ubiquitinación regulador de las proteínas Smad (Smurf) ubiquitina al receptor TβRI, mandándolo al proteosoma para su degradación. Así, se inhibe la vía canónica del TGF-β (12,16).

En el daño hepático crónico, la señalización involucrada en la fibrogenesis está dada por el PDGF al activar a JNK, el cual fosforila a Smad2 y Smad3 en el “linker” para generar pSmad2L y pSmad3L (Figura 4). Posteriormente, pSmad3L forma rápidamente un heterocomplejo con Smad4 y se transloca al núcleo, donde estimula la proliferación de las CEHs por la sobre regulación de la transcripción de c-Myc. Después de la fosforilación (citoplasmática) en el C-terminal de la pSmad2L por el TβRI, la pSmad2L/C formada, se transloca al núcleo con Smad4 para estimular la expresión del inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1), que tiene efectos profibrogénicos (Figura 4) (12, 16).

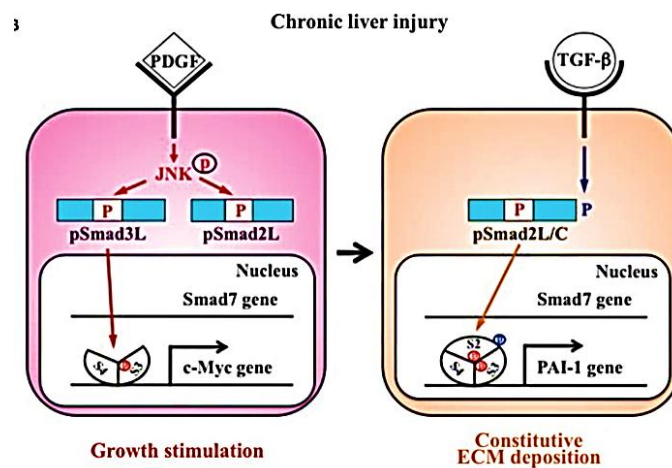


Figura 4. Vía de señalización del TGF-β y JNK durante el daño hepático crónico (18).

A diferencia de la inducción de la Smad7 en las CEHs quiescentes vía pSmad3C, la pSmad3L no induce la expresión de la Smad7 en las CEHs transdiferenciadas a miofibroblastos (Figura 4). Así, bajo poca presencia de la Smad7, la señal profibrogénica de las fosfo-R-Smads puede promover constitutivamente la producción y deposición de MEC por miofibroblastos y acelerar el desarrollo de la fibrosis hepática (Figura 4) (18).

El conocimiento de estas vías es necesario para entender los procesos fibróticos en el hígado y así poder escoger los blancos terapéuticos para inhibir dichas vías. Las diferentes fosfoisoformas de las R-Smads, en particular de las que se encuentran fosforiladas en el “linker” se cree que son responsables de la inducción de genes profibrogénicos en daños crónicos al hígado y por ello es importante estudiarlas y buscar herramientas farmacológicas para bloquearlas y así prevenir o revertir la fibrosis.

1.4 Fibrosis experimental: el CCl₄

Para estudiar el desarrollo de la fibrosis, su fisiopatología y posibles tratamientos, se utilizan diferentes modelos de daño hepático, los cuales tratan de imitar el curso patológico que se desarrolla en los individuos (19).

Un ejemplo de modelo de daño hepático es el del CCl₄, que es una sustancia tóxica ampliamente utilizada para inducir fibrosis hepática, ya que produce una cirrosis hepática con características similares a las que se presentan en el humano (20).

El CCl₄ se activa en los hepatocitos por el CYP2E1, CYP2B1 o CYP2B2 y posiblemente CYP3A, dando lugar al radical libre triclorometilo (CCl₃[•]). Este radical puede unirse a macromoléculas como ácidos nucleicos, proteínas o lípidos, afectando procesos celulares fundamentales, como el metabolismo de lípidos, la síntesis de proteínas o la cadena respiratoria. Por otro lado, la formación de aductos entre CCl₃[•] y el ADN puede iniciar los procesos que llevan al desarrollo del cáncer hepático (21, 22).

El CCl_3^\bullet también puede reaccionar con el oxígeno para formar el radical triclorometilperoxilo ($\text{CCl}_3\text{OO}^\bullet$), una especie altamente reactiva. El $\text{CCl}_3\text{OO}^\bullet$, al ser más inestable que el CCl_3^\bullet , tiende a extraer con mayor rapidez un hidrógeno de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS), iniciando una serie de reacciones que terminan en la completa desintegración de los PUFAS en aldehídos, carbonilos y alcanos. Este proceso es denominado PL y puede comprometer el funcionamiento de las membranas celulares como la mitocondrial y la endoplásmica, lo que resulta en el incremento de calcio celular y pérdida de la homeostasis, que puede contribuir en gran medida a la apoptosis de los hepatocitos (21-23).

Luego de la PL y del daño a los hepatocitos, se activan las células de Kupffer y las CEHs derivando en los típicos procesos fibróticos donde se involucra la vía de señalización del TGF- β (21).

La inducción de la cirrosis por el CCl_4 en ratas parece reproducir muchas características observadas en humanos: el hígado altamente nodulado, la hipertensión portal y la arquitectura normal es remplazada por los nódulos de regeneración, el tejido fibrótico y la proliferación de los conductos biliares (24).

Debido a lo anterior, el CCl_4 es un buen modelo de daño hepático, que se puede utilizar para estudiar los mecanismos por los que se desarrolla la fibrosis, además para desarrollar terapias que lleven a la prevención y a la reversión de esta enfermedad hepática que se encuentra dentro de las primeras causas de muerte entre la población nacional y mundial.

1.5 La NAR y la CUR como hepatoprotectores

1.5.1 La NAR

Los flavonoides tienen propiedades antioxidantes y son potentes inhibidores de la PL. Un flavonoide que ha tomado auge en los últimos años es la naringenina (4', 5,7-trihidroxi-flavonona, NAR) (Figura 6), que es la aglicona natural de la naringina (4',5,7-

trihidroxi flavanona 7-ramnoglucósido). La NAR se encuentra ampliamente distribuida en cítricos, tomates, cerezas y cacao. La NAR tiene propiedades antioxidantes que se atribuyen a su relación estructura-actividad, ya que los sustituyentes hidroxilos del flavonoide pueden donar hidrógenos a las EROS, permitiéndoles adquirir una estructura estable. Además, este compuesto ha sido ampliamente investigado por sus actividades farmacológicas, incluyendo las propiedades antitumorales, las antiinflamatorias y las hepatoprotectoras (12, 25, 26).

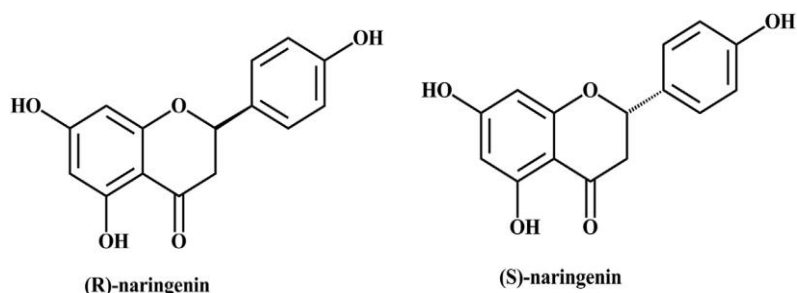


Figura 5. Estructura de la naringenina (4', 5,7-trihidroxi flavonona, NAR). La NAR es un flavonoide de tipo flavanona, con dos isómeros: (*R*)-NAR y (*S*)-NAR que se encuentran en la naturaleza como mezcla racémica (12).

Se conoce que uno de los primeros procesos del daño hepático es el estrés oxidativo, la NAR surge como una alternativa para prevenir o revertir la cirrosis, debido a que es un buen donador de hidrógenos y estabilizador de radicales libres, por sus grupos -OH y capacidad de estabilizarse por resonancia química (12, 25).

Algunos antecedentes demuestran que la NAR es capaz de prevenir el daño hepático inducido por metales pesados, dimetil nitrosamina, etanol e incluso CCl₄ en modelos agudos o de prevención; sin embargo, no se había investigado en la cirrosis (Tabla I). En estos modelos la NAR funciona impidiendo la elevación de marcadores de daño hepático como las enzimas alanina aminotransferasa (ALT), la fosfatasa alcalina (FA) y la gamma-glutamyl transpeptidasa (γ-GTP). Por otro lado, la NAR previene la disminución de la concentración del antioxidante endógeno glutatión reducido (GSH) y mantiene los niveles de la actividad del sistema antioxidante endógeno formado por las enzimas superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) (12).

A nivel de su mecanismo de acción se sabe que la NAR modula los niveles de TGF- β , Smad3, Col-I, TNF- α , factor nuclear- κ B (NF- κ B), COX-2, iNOS, entre otras proteínas involucradas en la fibrosis. También se tienen antecedentes de que la NAR previene la apoptosis de los hepatocitos, la transdiferenciación de las CEHs y la producción excesiva de la MEC (12).

Tabla I. Efectos de la naringenina (NAR) en diferentes modelos de daño hepático.

Modelo	Dosis	Daño	Efecto	Referencia
Rata	20 y 50 mg kg ⁻¹ de peso	Dimetilnitrosamina Hígado	Previene la elevación de la bilirrubina , la disminución de la albúmina sérica y la activación de las células estelares .	28
Rata	100 mg kg ⁻¹ de peso	CCl ₄ agudo, hígado	Inhibe las Cas 3, 8 y 9 .	29
Rata	50 mg kg ⁻¹ de peso	Etanol, hígado	Previene la elevación de ALT, GTP y la peroxidación lipídica , aumenta las actividades de SOD, CAT, GPx, GR, GST así como la cantidad de GSH, vitamina C y E .	30
Rata	50 mg kg ⁻¹ de peso	Cadmio, hígado	Previene la elevación de la ALT, la FA, la LDH, la GTP, la peroxidación lipídica, los dienos conjugados y los protein- carbonilos . Previene la disminución de SOD, CAT, GPx, GST, GR .	31
Rata	20, 40 y 80 mg kg ⁻¹	Níquel	Previene la elevación de los marcadores de daño hepático, la peroxidación y el estrés oxidativo	32
Rata	50 mg kg ⁻¹ de peso	Plomo	Previene la elevación de marcadores de daño hepático, peroxidación y estrés oxidativo	33
Rata	50 mg kg ⁻¹ de peso	Etanol, hígado	Previene la elevación de transaminasas, hierro, ferritina, TNF-α, IL-6, NF-κB, COX-2, e iNOS .	34
Ratón	50 mg kg ⁻¹ de peso	CCl ₄ agudo, Riñón	Previene deposición de colágena y la expresión del TGF-β .	35
Células HSC-T6	0 a 50 μ M	TGF- β , 10 ng/mL	Reducción de la MEC, la Col-I, la fibronectina y el PAI-1. Disminución de la transcripción y la activación de Smad3.	36

A pesar de los diversos estudios de la NAR como hepatoprotector, no se cuentan con estudios sobre su papel durante el daño hepático crónico, ya sea previniendo o revirtiendo la fibrosis experimental. Un antecedente directo del papel de la NAR sobre el daño hepático crónico es el reportado por Hernández-Aquino en el 2013, donde se administró CCl₄ a ratas Wistar macho por 8 semanas y al mismo tiempo NAR (50 mg/kg/día), encontrando que el flavonoide fue capaz de prevenir totalmente la fibrosis inducida por el hepatotóxico (Tabla II); sin embargo, no se evaluó el mecanismo de acción por el que el compuesto natural ejerce su efecto preventivo (27).

Tabla II. Efecto de la naringenina en la prevención del daño hepático por la administración del CCl₄. **a** indica diferencia significativa con respecto al control, P <0.05 y **b** indica diferencia significativa con respecto al grupo CCl₄, P <0.05 (27).

Parámetro	Control	CCl ₄	CCl ₄ +NAR	NAR
Fosfatasa alcalina en $\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$	128.6 ± 16.30	247.4 ± 20.13 ^a	130.8 ± 10.51 ^b	154.5 ± 9.30
γ -glutamyltranspeptidasa en $\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$	11.83 ± 1.18	19.72 ± 2.17 ^a	11.75 ± 1.31 ^b	10.65 ± 0.55
Alanina aminotransferasa en $\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$	41.51 ± 2.04	121.8 ± 2.20 ^a	43.65 ± 3.50 ^b	25.39 ± 7.19
Peroxidación lipídica en nmol MDA mg ⁻¹ proteína	0.09 ± 0.005	0.20 ± 0.01 ^a	0.10 ± 0.006 ^b	0.12 ± 0.007
Glutatión reducido en mmol glutatión g ⁻¹ de tejido	1.40 ± 0.07	0.08 ± 0.03 ^a	2.13 ± 0.04 ^b	1.68 ± 0.09
Glucógeno en g glu 100 g ⁻¹ de tejido	3.99 ± 0.27	1.07 ± 0.20 ^{a,b}	3.81 ± 0.43 ^b	5.18 ± 0.31 ^b
Colágena en mg colágena g ⁻¹ liver	2.47 ± 0.10	7.99 ± 1.43 ^a	4.70 ± 0.73 ^b	2.18 ± 0.39

Con base en lo anterior se concluye que la NAR es un buen hepatoprotector en diversos modelos experimentales, sin embargo, no se tienen estudios detallados sobre su mecanismo de acción en el daño crónico ni se ha evaluado su capacidad para revertir la fibrosis hepática previamente inducida. Cabe señalar que los pacientes acuden al médico con la enfermedad ya establecida, por lo que la capacidad de un compuesto para revertir la cirrosis adquiere gran importancia clínica.

1.5.2 La CUR

Otro producto natural ampliamente estudiado y con propiedades antioxidantes importantes es la curcumina (CUR). Este producto natural tiene propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas, cardioprotectoras y antifibróticas, entre otras (37,38).

Químicamente, la CUR está formada de dos unidades aromáticas, cada una con un grupo -O-metóxilo y sustituyentes fenólicos. Las unidades aromáticas sustituidas están conectadas por un polieno dentro del que se encuentra un estado de equilibrio ceto-enol o un diceto (Figura 6) (39).

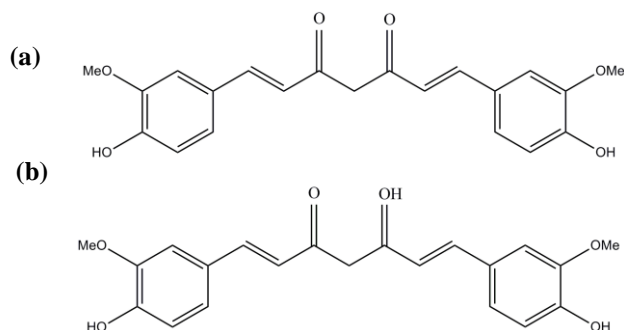


Figura 6. Estructura química de la curcumina (CUR). La CUR está formada por dos unidades aromáticas, cada una con un grupo -O-metoxido y sustituyentes fenólicos. Las unidades aromáticas sustituidas están conectadas por un polieno dentro del que se encuentra un diceto (a) o un estado de equilibrio ceto-enol (b) (39).

La CUR ha probado ser efectiva como hepatoprotectora en diferentes modelos de daño hepático y su mecanismo de acción cada vez está más claro (Tabla III); además de ser un potente antioxidante y de impedir el estrés oxidativo, previene el aumento de marcadores de daño hepático, restituye los niveles de GSH y las actividades de la SOD y la GPx.

Por otro lado, la CUR es capaz de inhibir la vía de señalización del TGF- β , inhibiendo a α -SMA y a Smad3, así como la expresión de los receptores del TGF- β . La CUR previene la elevación de los niveles de TNF- α , IF- γ e IL-6, IL-1 β y NF- κ B y por lo tanto, la

inflamación. Otro efecto de la CUR sobre el daño hepático es la prevención de la apoptosis de los hepatocitos por regular a la baja proteínas proapoptóticas como Bcl-2, Bcl-xL, Bax y caspasa (Cas) 3 (Tabla III).

Tabla III. Efectos de la curcumina (CUR) en diferentes modelos de daño hepático.

Modelo	Dosis	Daño	Efecto	Referencia
Rata	200 mg kg ⁻¹ peso	CCl ₄ agudo, hígado	Previene la disminución del GSH y de la relación GSH/GSSG . Previene elevación de la IL-6 , el TNF-α y la IL-1β a nivel del mRNA y la activación del NF-κB .	40
Rata	20 mg kg ⁻¹ de peso	Etanol, hígado	Reduce la inflamación por reducir los niveles de IF- γ , TNF- α , IL-6. Inhibe la activación de CEHs, aumenta los niveles de PPAR γ y reduce los de PDGF, TGF- β y TR β I y II	41
Ratas	100 mg kg ⁻¹ de peso	LCBC y CCl ₄	Prevención y reversión del incremento del TGF-β a nivel del mRNA y proteína	42
HSC-T6	1.25-10 mM	TGF- β	Suprime la expresión de α-SMA y la deposición de colágena .	43
Células AML12 y Ratones BALB/c	300 mg kg ⁻¹ de peso	TAA crónico, hígado	Inhibe activación de CEHs e inflamación. Regula positivamente P53 y Bax , pero regula negativamente Bcl-2 .	44
Ratas Sprague-Dawley	200 mg kg ⁻¹	CCl ₄ crónico, hígado	Previene la elevación de TGF-β , Smad2 , Smad7 , Smad3 a nivel de proteína y del mRNA. Previene fosforilación de Smad2 y Smad3 .	45
Ratas Sprague-Dawley	200 mg kg ⁻¹ de peso	CCl ₄ subcrónico, hígado	Previene la elevación de la ALT , AST , lípidos, triglicéridos, colesterol y LP .	46
Células HSC-T6 y Ratones BALB/c	50 mg kg ⁻¹ de peso	CCl ₄ crónico, hígado	Previene el aumento de DNMT1 , α-SMA and Col1α1 a nivel de proteína y de mRNA. Modifica patrones de metilación	47
Células HSC-T6 y ratas	300 mg kg ⁻¹ de peso	TAA, crónico hígado	Previene la activación de CEHs, previene la elevación de la expresión de α-SMA , Col-I y TNF-α . Mantiene normal el estrés oxidativo .	48

A pesar del gran conocimiento de los efectos hepatoprotectores de la CUR en modelos agudos y de prevención, no se tienen datos del efecto de este compuesto en un modelo de reversión. El descubrimiento de fármacos antifibróticos con capacidad para revertir la enfermedad es un gran avance para desarrollar medicamentos que en un futuro se encuentren disponibles en el mercado y lleguen a la población que los necesite.

2 JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades hepáticas son una de las primeras causas de muerte entre la población mexicana debido al alto índice de alcoholismo, infecciones por virus de la hepatitis, obstrucciones colestásicas, dieta, obesidad y esteatohepatitis no alcohólica. Todo ello deriva en una alta cantidad de pacientes con fibrosis hepática para la cual aún no se tiene un tratamiento adecuado, siendo una de las mejores opciones el trasplante de hígado, el que no es viable por el escaso número de donadores y problemas de histocompatibilidad. Es por ello que se necesitan fármacos que prevengan o reviertan la fibrosis y conocer su mecanismo de acción.

La fibrosis hepática está estrechamente relacionada con el estrés oxidativo y la generación de EROS, con un posterior desarrollo de la vía del TGF- β canónica y no canónica. Es sabido que los flavonoides como la NAR presentan características químicas que los hacen poderosos antioxidantes por su relación estructura-actividad y porque bloquean algunos puntos de las cascadas de señalización del TGF- β .

Estudios recientes indican que la NAR previene el daño hepático crónico experimental, sin embargo, no se conoce su mecanismo de acción. Además, no se tienen reportes de su capacidad para revertir el daño hepático crónico previamente establecido. Es por ello que se plantea: a) investigar el mecanismo de acción de la NAR en un modelo de prevención de daño hepático crónico con CCl₄ y b) evaluar la capacidad de la NAR y de la CUR para revertir la cirrosis hepática previamente establecida con CCl₄ en ratas.

3 HIPÓTESIS

La administración crónica del CCl_4 induce fibrosis y cirrosis por la generación de las EROS, la PL y por la vía del $\text{TGF-}\beta$. La NAR prevendrá la fibrosis en un modelo de daño crónico inducido con CCl_4 mediante la inhibición tanto de la vía canónica como de la no canónica del $\text{TGF-}\beta$. Por otro lado, la NAR y la CUR revertirán la fibrosis inducida por CCl_4 , por el mismo mecanismo de acción.

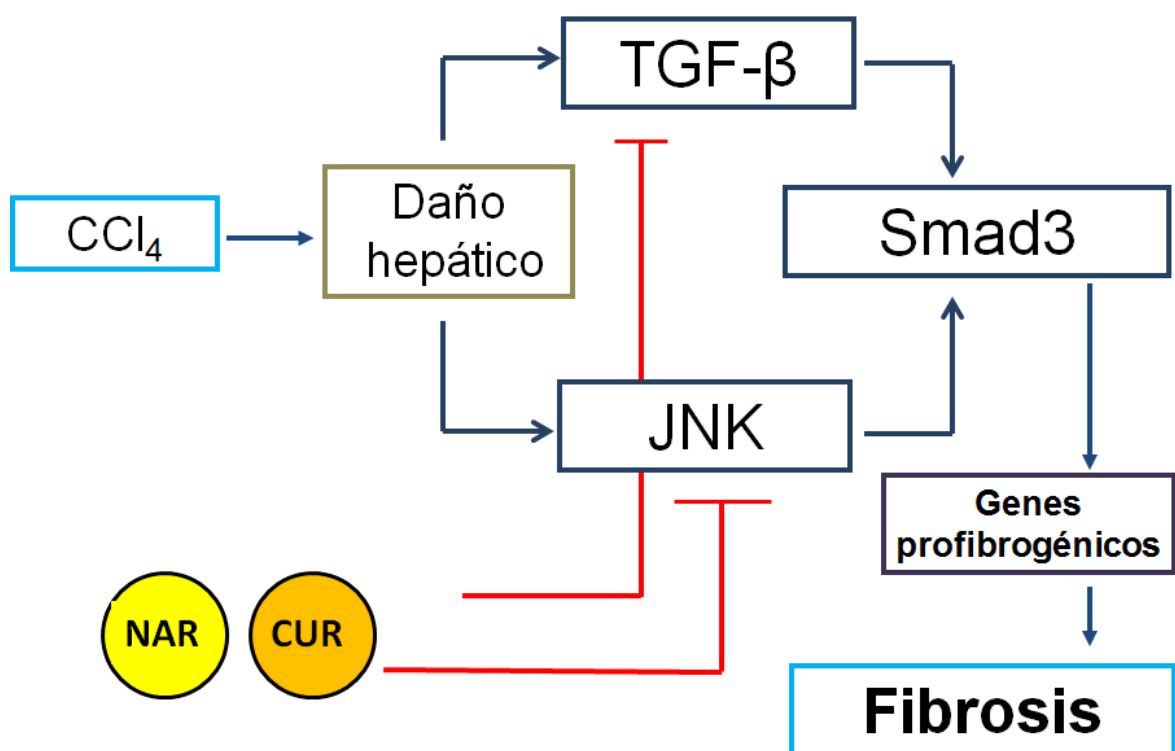


Figura 7. Representación esquemática de la hipótesis.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Investigar el mecanismo de acción de la NAR en la prevención del daño hepático crónico experimental y la evaluación de la capacidad de la NAR y la CUR para revertir una cirrosis previamente establecida.

4.2 Objetivos particulares

- a) Caracterizar el efecto antifibrótico de la NAR y la CUR por inhibición del TGF- β en la fibrosis hepática experimental.
- b) Elucidar el papel de la NAR y la CUR en la vía de señalización canónica del TGF- β -Smads y en las vías alternas de fosforilación de las Smads por acción de JNK en el daño hepático crónico.
- c) Evaluar el efecto antioxidante de la NAR y la CUR sobre el estrés oxidativo durante la fibrosis hepática experimental.
- d) Conocer si la NAR y/o la CUR tienen efectos sobre la inflamación en la fibrosis experimental ya establecida.
- e) Determinar si la NAR y/o la CUR revierten la transdiferenciación de las CEHs en el daño hepático crónico.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material Biológico

En este trabajo experimental se utilizaron ratas Wistar macho proporcionadas por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV-IPN. El estudio cumplió con los requisitos de la institución y con lo establecido en la regulación oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999) con respecto a las especificaciones técnicas para producción, cuidado y manejo de animales de laboratorio. Las ratas se mantuvieron bajo condiciones controladas (22 ± 2 °C, humedad relativa del 50-60% y ciclos de 12 h luz-oscuridad). Fueron alimentadas con LABDIET ® FORMULAB DIET 5053 y agua *ad libitum*.

5.2 Reactivos

La NAR fue adquirida de SIGMA ALDRICH USA, número de catálogo N5893-25G, \pm Naringenin. La CUR fue comprada a SIGMA ALDRICH USA (C1386-50G). El CCl₄ fue de J.T Baker, México, número de catálogo 1512 y el petrolato fue de la marca High Purity, México D.F. con número de catálogo A 1015.

5.3 Diseño experimental

5.3.1 Modelo de prevención

Se utilizaron 60 ratas Wistar macho con un peso de 120-150 g al empezarlos experimentos. Las ratas se dividieron en cuatro grupos aleatoriamente y se trataron de acuerdo al siguiente esquema (Tabla IV):

Tabla IV. Grupos experimentales y dosis en el modelo de prevención del daño hepático crónico.

Modelo de daño hepático crónico con la administración CCl ₄				
Nombre	n	Tratamiento	Dosis	Duración
Control	10	CMC	1 mL día ⁻¹ , v.o.	8 semanas
Daño	20	CCl ₄	400 mg kg ⁻¹ , 3 veces/semana i.p.	8 semanas
Experimental	20	CCl ₄ + NAR	400 mg kg ⁻¹ , 3 veces/semana i.p + 100 mg kg ⁻¹ /día v.o.	8 semanas
NAR	10	NAR	100 mg kg ⁻¹ /diaria v.o.	8 semanas

El modelo de prevención se basó en la administración concomitante del hepatotóxico CCl₄ y del hepatoprotector NAR por 8 semanas (Figura 8).

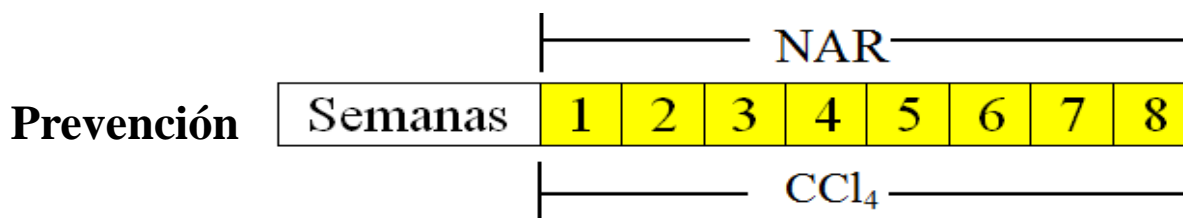


Figura 8. Esquema del modelo de prevención del daño hepático crónico inducido por el CCl₄.

Cabe señalar que durante las 8 semanas de tratamiento con CCl₄ se realizaron diferentes diluciones del tóxico, dependiendo de la semana en la que se encontraba el tratamiento (Tabla V). Este método es ampliamente probado para inducir fibrosis y alcanzar las concentraciones necesarias de CCl₄ para que se logre el efecto de daño deseado.

De cada dilución se tomaron 0.25 mL para ser administrados a cada rata de forma intraperitoneal (i.p.). El vehículo utilizado para administrar el CCl₄ fue petrolato; éste no induce cambios en los marcadores de daño hepático (49, 50), por lo que no se formó un grupo al que se le administrara solamente petrolato.

En el caso de la administración de la NAR, ésta se suspendió en carboximetil celulosa (CMC) al 0.7% como vehículo y se tomó 1 mL de la suspensión para administrarlo a cada rata, de manera intragástrica con una cánula.

Tabla V. Diluciones del CCl₄ a lo largo de las 8 semanas de tratamiento crónico.

Semana	Partes de CCl ₄	Partes de petrolato	Proporción
1 ^a	1	7	1:7
2 ^a	1	6	1:6
3 ^a	1	5	1:5
4 ^a	1	4	1:4
5 ^a	1	3	1:3
6 ^a	1	3	1:3
7 ^a	1	3	1:3
8 ^a	1	3	1:3

Una vez que el periodo de tratamiento para cada grupo terminó y después de las 72 h, los animales fueron sacrificados bajo anestesia de ketamina (100 mg kg⁻¹ de peso) y xilacina (8 mg kg⁻¹ de peso). Se colectaron muestras de sangre por punción cardiaca, mientras que el hígado fue rápidamente removido; de cada uno se tomaron porciones adecuadas para cada determinación que fueron tratadas de acuerdo a cada técnica; mientras que el resto fue guardado a -72 °C.

5.3.2 Modelo de reversión

Se utilizaron 90 ratas Wistar macho con un peso de 120-150 g al inicio del experimento; las ratas se dividieron en seis grupos aleatoriamente y se trataron de acuerdo a la Tabla VI:

Tabla VI: Grupos experimentales y dosis en el modelo de prevención del daño hepático crónico.

Modelo de daño hepático crónico con la administración de CCl₄				
Nombre	n	Tratamiento	Dosis	Duración
Control	10	CMC	1 mL día ⁻¹ , v.o.	4 semanas
Daño	20	CCl ₄	400 mg kg ⁻¹ , i.p., 3 veces/semana	12 semanas
Experimental 1	20	CCl ₄ + NAR	400 mg kg ⁻¹ , i.p., 3 veces/semana + 100 mg kg ⁻¹ /2 día, v.o.	12 y 4 semanas
Experimental 2	20	CCl ₄ + CUR	400 mg kg ⁻¹ , i.p., 3 veces/semana + 100 mg kg ⁻¹ /día, v.o.	12 y 4 semanas
NAR	10	NAR	100 mg kg ⁻¹ /2 día, v.o.	4 semanas
CUR	10	CUR	100 mg kg ⁻¹ /día, v.o.	4 semanas

Para la administración del CCl₄ se utilizó el mismo esquema de diluciones que en el modelo de prevención (Tabla V). A partir de la semana 5 y hasta la 12 se administró el CCl₄ en una dilución de 1:3. En cuanto a la NAR, se utilizó CMC al 0.7% CMC como vehículo y fue administrada dos veces al día vía oral (v.o.). Respecto a la CUR, se administró en CMC 0.7% v.o una vez al día. El modelo de reversión se basó en la administración del CCl₄ por doce semanas continuas, pero al comienzo de la semana 9 se administró la NAR o la CUR junto con el CCl₄ (Figura 9).

72 h después de que terminaron los tratamientos, los animales fueron sacrificados bajo anestesia de ketamina (100 mg kg⁻¹ de peso) y xilacina (8 mg kg⁻¹ de peso). Se colectaron

muestras de sangre por punción cardiaca, mientras que el hígado rápidamente fue removido; de cada uno se tomaron porciones adecuadas para cada determinación que fueron tratadas de acuerdo a cada técnica; mientras que el resto fue guardado a -72°C .

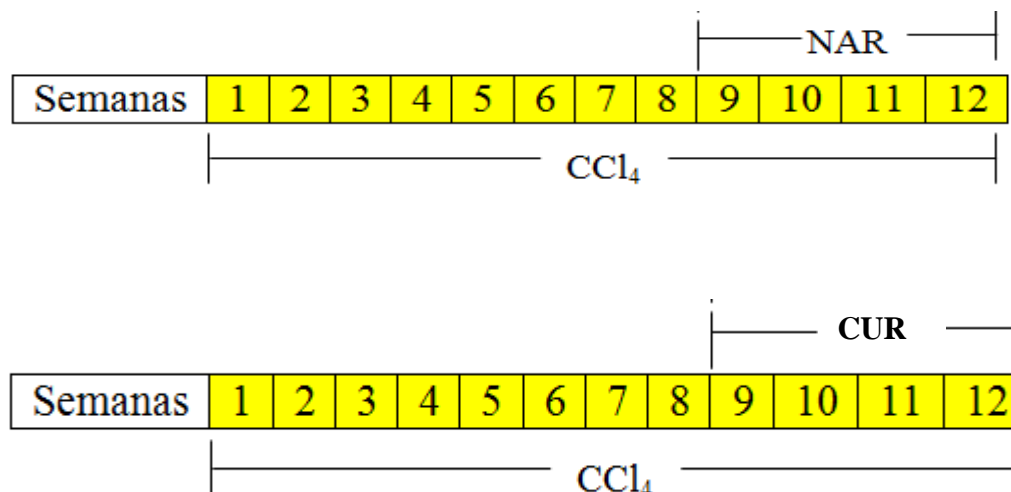


Figura 9. Esquema del modelo de prevención del daño hepático crónico inducido por el CCl_4 .

5.3.3 Tratamiento de las muestras

Una vez finalizados los periodos de experimentación, la sangre y los hígados obtenidos se trataron de la siguiente manera:

La sangre fue depositada en tubos de ensayo de 15 x 75 mm sin heparina; de ésta se tomaron 0.3 mL para determinar el GSH de acuerdo a la técnica. El resto de la sangre fue centrifugada a 1300 rpm por 15 min. El suero obtenido fue utilizado para determinar las actividades enzimáticas de la ALT, la FA y la γ -GTP. El resto del suero fue conservado a 4°C .

Los hígados fueron seccionados para obtener cortes histológicos que se depositaron en viales conteniendo paraformaldehído al 4% en PBS. Con estas muestras se realizó la tinción de hematoxilina y eosina (H y E) y la tinción tricrómica de Masson, así como inmunohistoquímicas para TGF- β , α -SMA, NF- κ B, IL-1 β (Figura 10).

Del resto del órgano, fueron tomados 0.5 g para determinar la PL a través del malondialdehyde (MDA); 0.3 g para cuantificar el GSH, 1g para conocer la actividad enzimática de la GPx, además de 0.5 g para cuantificar el glucógeno y 0.1 g para cuantificar la colágena.

Además, se necesitaron 0.25 g de hígado para los ensayos de zimografía para las MMP2 y MMP9, así como 50 mg para los western blot (WB) que se realizaron para TGF- β , α -SMA, Col-I, CTGF, MMP13, Smad7, JNK, pJNK, pSmad3L, Smad3, NF- κ B, IL-1 β , IL-10 y 50 mg para qRT-PCR y RT-PCR punto final para α -SMA y *Smad3* (Figura 10).

El resto de los hígados fueron introducidos a viales y conservados a -72 °C.

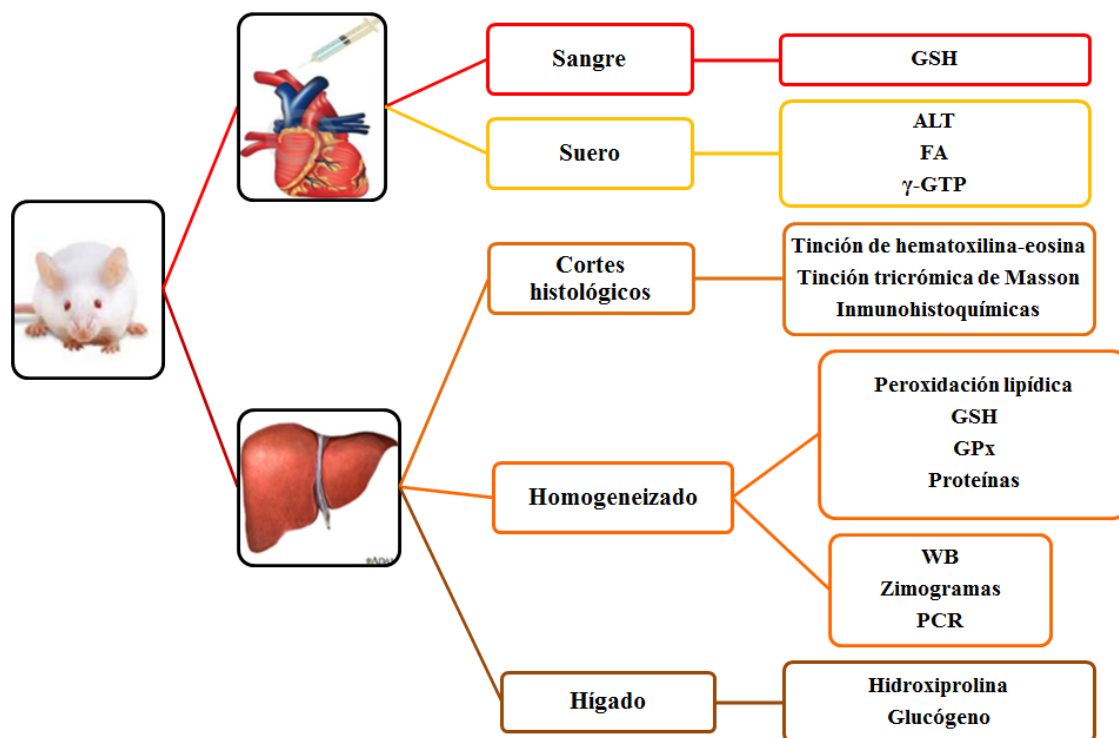


Figura 10. Marcadores bioquímicos del daño hepático y otras técnicas realizadas.

5.4 Determinación de los marcadores de daño hepático

5.4.1 Alanina aminotransferasa

Para determinar la actividad enzimática de la ALT, por duplicado, se depositaron los reactivos indicados a continuación en tubos de ensayo de 15 x 75 mm; más un blanco de reactivos (51):

	BLANCO (mL)	PROBLEMA (mL)
1.- Solución de sustrato	0.25	0.25
2.- Plasma problema	-----	0.05
3.- Se mezclaron y se agitaron suavemente y se incubaron a 37 ° C durante 60 min en un baño maría		
4.- Reactivo cromógeno	0.25	0.25
5.- Plasma problema	0.05	-----
6.- Se incubaron a 37 ° C durante 15 min		
7.- Se adicionaron NaOH 0.4 N.	2.50	2.50
8.- Se lee la absorbancia a 515 nm.		

Curva de calibración de la alanina aminotransferasa.

Se prepararon los siguientes reactivos:

Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.4: Se mezclaron 840 mL de solución 0.1 M de fosfato disódico con 160 mL de la solución 0.1 M de fosfato monopotásico.

Solución de sustrato: Se disolvieron 1.78 g de D/L alanina y 30 mg de ácido alfaoxoglutarico en solución amortiguadora; se añadieron 0.5 mL de hidróxido de sodio 1 N y se completó a 100 mL con solución amortiguadora. Se conservó a 4 °C.

Reactivo cromógeno: Se disolvieron 200 mg de 2,4 dinitrofenilhidrazina en ácido clorhídrico 1N caliente y se completó hasta un litro con HCl 1N.

Solución estándar de piruvato: ($1 \mu\text{mol mL}^{-1}$) se disolvieron 11 mg de piruvato sódico en 100 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.4. Se prepara el mismo día que se utiliza.

La curva de calibración se realizó como se indica en la Tabla VII:

Tabla VII. Curva de calibración de la alanina aminotransferasa.

Reactivos	No. de tubo						
	1	2	3	4	5	6	7
Solución sustrato (μL)	250	225	200	175	150	125	100
Solución estándar de piruvato (μL)	----	25	50	75	100	125	150
Solución amortiguadora de fosfatos (μL)	50	50	50	50	50	50	50
Reactivo cromógeno (μL)	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 (μmoles)	----	0.025	0.05	0.075	0.1	0.125	0.150

Se leyó la absorbancia de cada muestra a 515 nm.

5.4.2 Fosfatasa alcalina

Los ensayos se realizaron por duplicado y con un blanco de reactivos, por la técnica siguiente (52):

- 1.- Se adicionó a cada tubo de reacción, 0.25 mL de solución amortiguadora de glicina 0.1 M y de MgCl_2 1mM, pH 10.5 y 0.25 mL del sustrato p-nitrofenilfosfato.
- 2.- Se colocaron los tubos en baño maría a 37°C por 5 min.
- 3.- Se añadieron 50 μL de la muestra y se mezclaron suavemente.
- 4.- Se incubaron 30 min a 37°C .
- 5.- Se paró la reacción con 5 mL de NaOH 0.02 N y se agitó por inversión.
- 6.- Se leyeron las absorbancias a 410 nm en un espectrofotómetro marca SHIMADZU, con número de serie de UV-1201.

Nota: Para preparar el blanco de reactivos se colocaron 50 μL de agua en lugar de la muestra.

Curva estándar para la fosfatasa alcalina

Para realizar la curva estándar, se prepararon las siguientes soluciones:

1. p-nitrofenol solución estándar $10 \mu\text{moles mL}^{-1}$.
2. 0.5 mL de la solución estándar de p-nitrofenol se llevó a 100 mL con NaOH 0.02 N.
3. NaOH 0.02 N.

Nota: El blanco de reactivos se realizó con 5.5 mL de la solución 3 y se leyeron las absorbancias a 410 nm.

Se siguió la Tabla VIII para realizar la curva de calibración.

Tabla VIII. Curva estándar de la fosfatasa alcalina.

CURVA ESTÁNDAR PARA LA FOSFATASA ALCALINA			
TUBO	Solución 2 (mL)	Solución 3 (mL)	Sustrato hidrolizado (μmoles)
1	0.5	5	0.025
2	1.0	4.5	0.050
3	2.0	3.5	0.10
4	3.0	2.5	0.15
5	4.0	1.5	0.20
6	5.0	0.5	0.25

5.4.3 Gamma-glutamyl transpeptidasa

Se utilizaron tubos de ensayo de 15 x75 mm, por duplicado más un blanco de reactivos (53).

- 1.- En cada tubo se adicionaron:
400 mL de Tris-HCl 200 mM, pH 8.2
100 mL de MgCl_2 200 mM

100 mL de Glicil-glicina 40 mM, pH 8.2.

200 mL de Gamma-glutamyl-p-nitroanilida 10 mM

2.- Previa incubación durante 10 min a 37°C, se inició la reacción con 200 mL de suero.

3.- Se incubó a 37 °C por 30 min y se detuvo la reacción con 2 mL de ácido acético 1.5M.

4.- Se leyó la absorbancia a 410 nm y se cuantificó la p-nitroanilina producida mediante la curva estándar.

Nota: Se hizo un blanco de reactivos sustituyendo los 200 mL del plasma por agua.

Curva estándar de la gamma-glutamyl transpeptidasa

Se pesaron 13.81 mg de p-nitroanilina y se llevaron a 250 mL con ácido acético 1.5M. La curva de calibración se realizó como se indica en la Tabla IX. Se leyó la absorbancia a 410 nm.

Tabla IX.- Curva de calibración de la gamma-glutamyl transpeptidasa.

TUBO No.	SOLUCIÓN 1 (µL)	H₂O (µL)	nmoles mL⁻¹	µmoles mL⁻¹
1	50	1950	10	0.01
2	100	1900	20	0.02
3	150	1850	30	0.03
4	250	1750	50	0.05
5	375	1625	75	0.075
6	500	1500	100	0.1
7	750	1250	150	0.15
8	1000	1000	200	0.20

5.4.4 Peroxidación lipídica

Para realizar esta técnica (54) se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

1. Se pesaron 0.5 g de hígado.

2. Se homogeneizó el hígado en 5 mL de agua.

3. Se tomaron 300 µL del homogeneizado de hígado y se agregaron 700 µL de Tris-HCl 150 mM pH 7.4 para completar 1 mL.

4. Se agregaron 2 mL de TBA al 0.375 % disuelto en TCA al 15 %.
5. Se calentó a ebullición por 45 min.
6. Se centrifugó a 3000 rpm por 10 min y se leyó el sobrenadante a 532 nm.
7. Se determinaron las proteínas del homogeneizado hepático.

5.4.4.1 Determinación de las proteínas por el método de Bradford

Para desarrollar esta técnica se realizó el siguiente procedimiento (55):

1. Se tomaron 100 mL del homogeneizado preparado para determinar PL y se llevaron a 1,000 μ L con agua tridestilada.
2. De la dilución anterior se tomaron 20 mL + 80 mL de agua tridestilada.
3. El blanco de reactivos se preparó con 100 mL de agua.
4. Se añadieron 2.4 mL del reactivo de Bradford.
5. Se leyó la absorbancia a 595 nm.

Curva de calibración para las proteínas

Se preparó una curva de calibración utilizando albúmina bovina sérica (1mg mL^{-1}), con las siguientes concentraciones: 0, 5, 10, 15, 20, 30, 35, 40, 50, 60, 80, 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Se leyeron las absorbancias a 595 nm.

5.4.5 Glutación reducido en hígado y sangre

Para realizar la técnica de cuantificación de GSH se realizó el siguiente procedimiento (56):

1. Se homogeneizaron 0.3 g de hígado o 0.3 mL de sangre en 1.2 mL de solución precipitante.
2. Se centrifugaron por 20 min a 12000 rpm (JA-21).
3. Se tomaron 0.1mL del sobrenadante (por duplicado) y se agregaron 2.1 mL de la solución de fosfatos y 0.25 mL de reactivo de Ellman.

4. Se agitaron y se leyeron a 412 nm, en el espectrofotómetro marca SHIMADZU, con número de serie de UV-1201.

Curva estándar del glutatión reducido

1. Se preparó la solución patrón de GSH 1 (nmol μL^{-1}). Se pesaron 30.733 mg de GSH y se llevaron a 100 mL con solución de fosfatos.

2. Se agitó cada tubo y se leyeron las muestras a 412 nm en un espectrofotómetro marca SHIMADZU, con número de serie de UV-1201.

Tabla X. Curva de calibración del glutatión reducido en hígado y sangre.

Tubo	GSH (μL)	Nmol	Na_2HPO_4 (mL)	DTNB (mL)
B	0	0	2.2	0.25
1	10	10	2.19	0.25
2	50	50	2.15	0.25
3	100	100	2.10	0.25
4	250	250	1.95	0.25
5	450	450	1.75	0.25
6	650	650	1.55	0.25
7	850	850	1.35	0.25

5.4.6 Glutatión peroxidasa

La actividad de la GPx se determinó de esta forma (57):

1.- Se homogeneizó 1g de hígado en 10 volúmenes de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM, pH 7.4 durante 30 s.

2.-Se filtró el homogeneizado haciéndolo pasar por una gasa y se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min a 4 °C. Se obtuvo un sobrenadante de donde se tomó una muestra para medir proteínas.

Reacción enzimática:

- 1.- En un tubo se adicionaron 2 mL de solución amortiguadora de fosfatos 75 mM y 50 μ L de glutatión 60 mM, 0.1 mL de NADPH 3 mM, 200 μ L de sobrenadante y 0.45 mL de agua.
- 2.- La reacción se inició al agregar 0.1 mL de hidroperóxido de cumeno 45 mM.
- 3.- La conversión de NADPH a NADP^+ se monitoreó continuamente a 340 nm por 4 min. La actividad de la GPx se expresó como nmol de NADPH oxidado a NADP^+ $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteínas, utilizando un coeficiente de extinción de $6.22 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

5.4.7 Glucógeno

La determinación del glucógeno hepático se realizó con la técnica de la antrona (58):

1. Se pesaron 0.5 g de hígado en tubos de tapón esmerilado y se les adicionó 1.5 mL de KOH al 30%, se taparon y se hirvieron en baño María, durante 30 min.
2. Después de enfriar, se pasaron a un matraz volumétrico de 25 mL y se aforaron con agua.
3. Se tomaron de 40 a 160 mL de la solución anterior y se llevaron a 1 mL en tubos de 13x100 esmerilados, por duplicado. Se preparó un blanco con 1 mL de H_2O y 2 estándares con 20 μ L de una dilución de glucosa estándar (1 mg mL^{-1}) y se llevaron a 1 mL con agua.
4. Se preparó una solución de antrona 0.2% en H_2SO_4 concentrado. Se añadieron 2 mL de antrona a cada tubo, agitando suavemente y enfriando los tubos en hielo.
5. Se taparon los tubos fríos y se pusieron en un baño de agua hirviendo por 15 min.
6. Se enfriaron de inmediato sobre agua con hielo.

Cada muestra se leyó a una absorbancia de 620 nm en un espectrofotómetro marca SHIMADZU, con número de serie de UV-1201.

5.4.8 Colágena

Para cuantificar la colágena se determinó la hidroxiprolina (HP) con la siguiente técnica (59):

1. Se pesaron 0.1 g del hígado de rata previamente secado con papel filtro y se colocaron en una ampolleta.
2. Se agregaron 2 mL de HCl 6N y se sellaron con el mechero, posteriormente se colocaron a 100 °C en un horno durante 24 h.
3. Una vez hidrolizadas las muestras, se destaparon las ampolletas y se colocaron nuevamente en el horno a temperatura de 60-80 °C, por 24 h o hasta que se secaran.
4. Las muestras ya secas se resuspendieron con 2 mL de solución amortiguadora de acetato de sodio-ácido cítrico, pH 6.0; se agitaron vigorosamente y se vaciaron en tubos de ensayo, las ampolletas se lavaron con 1 mL de la misma solución amortiguadora.
5. Se centrifugó a 3000 rpm durante 15 min.
6. En un tubo conteniendo una pequeña porción de anorita (carbón activado) se depositó el sobrenadante y se agitó durante un min. Se centrifugó a 3000 rpm por 15 min; si el sobrenadante no quedaba claro se repetía este paso.
7. Se tomaron 1 mL del sobrenadante más 1 mL de H₂O y 1 mL de cloramina T. Se dejó reposar exactamente 20 min a temperatura ambiente. Se hizo un blanco de reactivos.
8. Transcurridos los 20 min, se adicionaron 0.5 mL de tiosulfato de sodio 2 M, 1 mL de NaOH 1N y aproximadamente 2 g de NaCl. Se agitó inmediatamente para detener la reacción.
9. A cada tubo se agregaron 6 mL de tolueno y se agitaron durante 1 min. La fase acuosa se utilizó para la cuantificación de HP.
10. 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.
11. Los tubos se enfriaron 15 min en refrigerador y fríos se les adicionó 6 mL de tolueno y se agitaron durante 1 min.
12. De la fase de tolueno se tomaron alícuotas de 1 mL por duplicado y se les agregó 4 mL del reactivo de Ehrlich y se agitaron fuertemente.

13. Se dejaron reposar durante 30 min para que se llevara a cabo la reacción. Se leyeron a 560 nm.

Curva estándar de la hidroxiprolina

Se pesaron 10 mg (76.26 μmol) de HP y se llevaron a un volumen de 76.26 mL, lo que dio una disolución con una concentración $1 \mu\text{mol mL}^{-1}=1\text{nmol } \mu\text{L}^{-1}$. Posteriormente, se siguió con lo indicado en la Tabla XI.

Tabla XI. Curva estándar de la hidroxiprolina.

Tubo	HP μL	H ₂ O mL	HP nmoles
1	10	1.99	10
2	20	1.98	20
3	50	1.95	50
4	70	1.93	70
5	100	1.90	100
6	150	1.85	150
7	200	1.80	200
8	300	1.70	300
9	400	1.60	400
10	500	1.50	500
B	----	2.00	--

1. En tubos con rosca y tapón se adicionaron los reactivos de la Tabla XI. Se agregó 1 mL de cloramina T. Se dejó reposar 20 min a temperatura ambiente.
2. Pasados los 20 min, se detuvo la reacción por la adición de 500 μL de tiosulfato de sodio 2 M; con 1 mL de NaOH 1N y con aproximadamente 2g de NaCl. Se agitó inmediatamente.
3. Se agregaron 6 mL de tolueno a cada muestra y se agitaron durante 1 min.
4. Se extrajo la fase de tolueno y se desechó. El contenido acuoso se cubrió con su respectivo tapón y se colocó en un baño de agua hirviendo durante 20 min.
5. Se enfriaron los tubos y nuevamente se les agregó 6 mL de tolueno y se agitaron durante 1min.

6. Se tomó por duplicado una alícuota de 1 mL de la fase de tolueno y se mezcló con 4 mL del reactivo de Ehrlich y se agitó vigorosamente.
7. Se incubaron los tubos 30 min a temperatura ambiente para desarrollar color. Se leyó la absorbancia a 560 nm.

5.5 Histologías

5.5.1 Tinción de hematoxilina y eosina

En esta técnica de tinción de tejidos se aprecian los núcleos de las células de color violeta-azul y el citoplasma se tiñe de color rosa. El procedimiento fue el siguiente (60):

1. Cortes gruesos de hígado se depositaron en un vial conteniendo una solución fijadora de paraformaldehído al 4% en PBS, el tiempo mínimo de fijación fue de 24 h.
2. Los cortes se lavaron con agua corriente, se deshidrataron en alcoholes y se embebieron en parafina.
3. Se realizaron cortes de 6 micras de espesor y se colocaron en portaobjetos silanizados.
4. Se desparafinaron las muestras y se rehidrataron con xileno, alcohol absoluto y alcohol al 95%.
5. Se aplicó hematoxilina de Harris durante 15 min y se enjuagaron con agua corriente por dos min.
6. Se diferenciaron en alcohol ácido con tres a diez inmersiones y se verificó la diferenciación con microscopio de luz. Los núcleos deben distinguirse y el fondo debe ser de color muy tenue o incoloro.
7. Se lavaron con agua corriente brevemente y luego se sumergieron en agua amoniacal o saturada de carbonato de litio hasta que las secciones fueron de color azul brillante, una vez más se lavaron en agua corriente de 10 a 20 min.
8. Posteriormente, se tiñeron con eosina de 15 s 20 min, dependiendo de la caducidad de la eosina y del grado de contraste deseado (contrateñido); se lavaron con alcohol al 95% y luego con alcohol absoluto y con xileno; finalmente, se montaron con el polímero Permunt o bálsamo.

5.5.2 Tinción tricrómica de Masson

Con esta técnica se busca teñir a las bandas de colágena de color azul, el núcleo celular de color rojo y el citoplasma de color rosa; el procedimiento fue el siguiente (60):

1. Cortes gruesos de hígado se depositaron en un vial conteniendo una solución fijadora de paraformaldehído al 4% en PBS, el tiempo mínimo de fijación fue de 24 h.
2. Los cortes se lavaron con agua corriente, se deshidrataron en alcoholes y se embebieron en parafina.
3. Se hicieron cortes de 6 micras de espesor y se cubrieron con silano.
4. Las muestras se desparafinaron y rehidrataron con xileno, alcohol absoluto y alcohol al 95%, se enjuagaron en agua destilada y se sumergieron en el fijador de Bouin por 1 h a 56 °C.
5. Posteriormente, se enfriaron y lavaron con agua corriente hasta que el color amarillo desapareció.
6. Se enjuagaron con agua destilada para luego sumergirlas en solución de hematoxilina de hierro de Weigert por 10 min.
7. Se enjuagaron las muestras con agua corriente y agua destilada.
8. Se sumergieron en la solución de fucsina ácido-escarlata de Biebrich por 15 min.
9. Se enjuagaron con agua destilada para colocarlas en la solución de ácido fosfomolibdico/ ácido fosfotungsténico por 10-15 min.
10. Se colocaron en la solución de anilina azul por 5-10 min o con la solución verde claro por 1 min, se recuperó la solución y se enjuagaron con agua destilada.
11. Se lavaron con agua acética al 1% por 3-5 min y luego con alcohol al 95%, alcohol absoluto y con xileno. Finalmente se montaron en el polímero Permunt o bálsamo.

5.5.3 Inmunohistoquímica

Se realizaron inmunohistoquímicas para las proteínas TGF- β , α -SMA, NF- κ B e IL-1 β de acuerdo a la técnica siguiente:

1. Se desparafinaron los cortes de hígado fijados en los porta objetos, toda la noche a 60 °C.
2. Se retiró el exceso de parafina con navaja, sin tocar el tejido.
3. Se hidrató el tejido con el siguiente tren:

- | | |
|-----------------------------|----------------------------|
| a) Xilol (100 %) I -5 min | b) Xilol (100 %) II -5 min |
| c) Xilol (100 %) III -5 min | d) Etanol (99.5 %) I -30 s |
| e) Etanol (99.5 %) II -30 s | f) Etanol (99 %) I -30 s |
| g) Etanol (99 %) II -30 s | h) Etanol (80 %) -30 s |

4. Los cortes se enjuagaron con agua corriente.
5. Se lavaron con PBS 1X, 5 min, 3 veces.
6. Se realizó la recuperación de antigénica (15 lb, 121°C, 15 min), utilizando solución amortiguadora de citratos pH 6.0 a 120 °C por 15 min.
7. Se sacaron las muestras de la autoclave y se enfriaron en baño maría.
8. Se enjuagaron con PBS 1X, 5 min, 3 veces.
9. Se bloqueó la peroxidasa endógena con metanol peroxidasa por 1h (46 mL de metanol + 4 mL de H₂O₂ 30%).
10. Se enjuagaron las laminillas con PBS 1X, 5 min, 5 veces.
11. Se bloquearon las uniones inespecíficas del anticuerpo con 50 mL de suero fetal bovino (SFB) al 10% disuelto en leche descremada al 5% (la leche se disolvió en PBS 1X). Se incubó 2 h a temperatura ambiente.
12. Se lavó con PBS 1X, 5 min, 5 veces.
13. Se incubaron las laminillas con el anticuerpo primario diluido en SFB al 3% toda la noche en cámara húmeda a 4 °C.
16. Se lavó con PBS 1X, 5 min, 5 veces.

17. Se adicionó DAB + H₂O₂ 30%, dilución 1:10 y se esperó el tiempo necesario para cada anticuerpo (Tabla XII).

18. Se lavó con PBS 1X, 5 min, 5 veces.

19. Se contracoloró con hematoxilina por 10 min.

20. Se enjuagó con agua corriente.

21. Se deshidrataron las muestras con el siguiente tren:

a) Etanol (85 %) -20 s

b) Etanol (90 %) -20 s

c) Etanol (99 %) -20 s

d) Etanol (100 %) -20 s

e) Etanol (100 %) -20 s

f) Xilol (100 %) I -10 s

g) Xilol (100 %) II -10 s

h) Xilol (100 %) III -10 s

22. Las laminillas se montaron en resina.

Tabla XII: Anticuerpos y diluciones utilizadas en la inmunohistoquímica

Proteína	Marca	Número de catálogo	Dilución	Tiempo de exposición al DAB
α -SMA	Sigma Aldrich	A5691	1:25	45 min
TGF- β	Millipore	MAB1032	1:25	30 min
IL-1 β	Millipore	AB1832P	1:25	60 min
NF- κ B	Millipore	MAB3026	1:50	1h-30 min
Secundario α - mouse	Invitrogen	62-6520	1:200	-----

5.6 Zimografía

La actividad proteolítica de las MMP2 y MMP9 fue estudiada mediante ensayos de zimografía realizando la siguiente técnica:

1. Se pesaron 0.25 g de hígado y se homogeneizaron con 1.7 mL de PBS1X.

2. Las muestras se sonicaron 3 veces por 15 s, con descansos de 15 s, con una amplitud del 60%.

3. Se centrifugó a 13000 rpm por 10 min y el supernadante fue colectado y guardado.
4. Se cuantificaron las proteínas por el método del ácido bicinonínico.
5. Volúmenes equivalentes a 50 μg fueron mezclados con solución amortiguadora de muestra (SDS 2.5%, sucrosa 1% y rojo de fenol, 4 mg mL^{-1})
6. Las muestras preparadas se cargaron en un gel de acrilamida al 8%, copolimerizado con 1 mg mL^{-1} de gelatina.
7. Se corrió una electroforesis a 72 V por 2 h.
8. Se lavaron los geles con Triton X-100 2.5%.
9. Se incubaron los geles con solución amortiguadora de activación (Tris-HCl 50 mM pH 7.4 y CaCl_2 5 mM) a 37 °C por 48 h.
10. Se tiñeron los geles con azul de Coomassie G-250 al 0.25% en ácido acético al 10% y metanol al 30%.
11. Se destiñeron los geles hasta tener una coloración adecuada para ver la actividad proteolítica de las MMPs.
12. Se realizó el análisis densitométrico.

5.7 Western blot

Para conocer los niveles proteicos del TGF- β , α -SMA, Col-I, CTGF, MMP13, Smad7, JNJ, pJNK, pSmad3L, Smad3, NF- κ B, IL-1 β , IL-10 se realizaron pruebas de WB, en base al siguiente procedimiento:

1. Se pesaron 50 mg de hígado y se homogeneizó con 500 μL de solución amortiguadora de lisis (Tris-HCl 1 M pH 8.0, NaCl 5 M, NP40, Triton, EDTA 0.5 M pH 8.0, PMSF 0.1 M, Na_3VO_4 0.1 M, NaF 0.1 M) que tenía inhibidor de proteasas (protease inhibitor cocktail Prod #P8340 Sigma) y de fosfatasa (phosphatase inhibitor cocktail Prod #P0044 Sigma) en una relación de 1:100.
2. Las muestras se sonicaron 3 veces por 15 s, con descansos de 15 s, con una amplitud del 60%.
3. Se centrifugó a 1200 rpm por 2 min y el sobrenadante se guardó a 20 °C.

4. Se cuantificaron las proteínas del sobrenadante por el método del ácido bicinonínico con el kit Pierce BCA Protein Assay Prod # 23223 Thermo Scientific.
5. Volúmenes equivalentes a 50 y 250 µg de proteína fueron cargados en geles de acrilamida de 15, 12 y 10%.
6. Se corrió una electroforesis a 100 V por 2:30 h.
7. Se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF por transferencia húmeda y fue corrida a 0.25 A por 1:40 h.
8. La membrana con las proteínas transferidas fue bloqueada con leche descremada al 0.7%, por 2 h, a temperatura ambiente. La leche fue diluída en TBS 1X-Twee-20.
9. Las membranas fueron incubadas con el respectivo anticuerpo primario por toda la noche a 4 °C (Tabla XIII).

Tabla XIII: Anticuerpos utilizados para el western blot.

Proteína	Compañía	Número de catálogo	Dilución
TGF-β	Millipore	MAB1032	1:500
α-SMA	Sigma Aldrich	A5691	1:500
CTGF	Santa Cruz Biotechnology	SC-14939	1:500
Col-I	Sigma Aldrich	C-2456	1:500
MMP13	Millipore	MAB13426	1:500
NF-κB (p65)	Millipore	MAB3026	1:500
IL-1β	Milipore	AB1832P	1:500
IL-10	Invitrogen	ARC9102	1:500
Smad3	Abcam	Ab65847	1:500
pSmad3L	Abcam	Ab63403	1:250
Smad7	Abcam	Ab90086	1:500
JNK	Cell Signaling	9252	1:500
pJNK	Abcam	Ab131499	1:500

10. Se lavaron las membranas con TBS1X-Tween-20 (Tabla XIV) y luego se expusieron al correspondiente anticuerpo secundario (peroxidase-labeled antibody α -mouse, 62-6520 Invitrogen o al peroxidase-labeled antibody α -rabbit 31460 Thermo Fisher Scientific), por 2 h, a temperatura ambiente.

11. Las membranas se lavaron con TBS1X-Tween-20 como se indica en la Tabla XIV, posteriormente se revelaron con el kit immuno cruz western blotting luminol reagent, santa Cruz Biotechnology #sc-2048, utilizando placas medical X-ray blue/MXB film, Carestream #6040331.

12. Las placas fueron tratadas con el revelador GBX, Carestream Dental #19009343 y con el fijador GBX, Carestream Dental #1901875 13. Las placas reveladas fueron digitalizadas, luego se realizó un análisis densitométrico con el programa ImageJ. Se utilizó β -actina como control de carga.

Tabla XIV: Tiempo y número de lavados, así como tiempo de revelado cada proteína estudiada por western blot.

Proteína	Número de lavados	Tiempo de cada lavado	Tiempo de revelado
TGF- β	3	5 min, 10 min y 15 min	5 s-1 min
α -SMA	3	5 min, 10 min y 15 min	5 s-1 min
CTGF	3	5 min, 10 min y 15 min	1 min
Col-I	3	5 min, 5 min y 5 min	5-10 min
MMP13	3	5 min, 10 min y 15 min	1 min
NF- κ B (p65)	3	5 min, 10 min y 15 min	5 s-1 min
IL-1 β	3	5 min, 10 min y 15 min	5 s-1 min
IL-10	3	5 min, 10 min y 15 min	5 s-1 min
Smad3	3	5 min, 5 min y 5 min	1-10 min
pSmad3L	3	5 min, 5 min y 5 min	1-10 min
Smad7	3	5 min, 5 min y 5 min	1-5 min
JNK	3	5 min, 10 min y 15 min	30 s-1 min
pJNK	3	5 min, 5 min y 5 min	1-10 min

5.8 Reacción en cadena de la polimerasa

5.8.1 Extracción del RNA

1. Se pesaron 50 mg de hígado y se les agregó 1 mL de Trizol y se homogeneizó el hígado.
2. Se incubó el homogeneizado 5 min a temperatura ambiente.
3. Se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4°C y se transfirió la fase acuosa a viales limpios.
4. Se agregaron 200 µL de cloroformo grado biología molecular y se agitó por 15 s.
5. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 5 min.
6. Se centrifugó a 12,000 g por 15 min a 4 °C.
7. De las tres fases formadas, acuosa, interfase y fenólica; se tomó la fase acuosa.
8. Se agregaron 500 µL de isopropanol frío grado biología molecular y se incubaron las muestras 10 min a temperatura ambiente.
9. Se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4 °C.
10. Se decantó el sobrenadante y se conservó la pastilla.
11. Se adicionó 1 mL de etanol al 80%, se agitó y se incubó 10 min a temperatura ambiente.
12. Se centrifugó a 7,500 g por 9 min a 4 °C.
13. Se repitió el paso anterior.
14. Se decantó el sobrenadante extremando precauciones para no perder la pastilla.
15. Se secaron los viales, invirtiéndolos sobre papel, aproximadamente 10 min, para evaporar el etanol.
16. Se resuspendió la pastilla con pipeta, en 60-200 µL de agua libre de nucleasas.
17. El RNA obtenido se guardó a -20 °C.
18. Se cuantificó el RNA.
19. Se corrió un gel de agarosa al 1% con 5 µg de RNA total para conocer la integridad de la muestra.

5.8.2 Tratamiento con ADNsa

1. Se trataron 5 µg de RNA con enzima ADNsa (New England Biolabs REF M0303S) en una relación de 0.2 U de enzima por cada 1 µg de RNA; en un volumen de reacción final de 100 µL que contenía solución amortiguadora 10X, agua libre de RNAsas, 5 µg de RNA total y 1µL de ADNsa.
2. Se mezcló por pipeteo y se agitó.
3. Se incubó a 37 °C por 15 min en baño María.
4. Se incubó a 75 °C por 15 min en baño María.
5. A cada muestra se le dio una agitación rápida y se guardaron a -20 °C para su posterior uso en la RT-PCR.

5.8.3 RT-PCR

1. Se tomaron 10 µL de cada muestra tratada con ADNsa y se mezclaron con 2 µL de Oligo dT (Invitrogen by Life technologies REF 18418012) en una relación de 1µL de Oligo dT por cada 5 µg de RNA.
2. Se incubaron las muestras 10 min en baño María a 73 °C.
3. Se pasaron las muestras a hielo y se esperaron 5 min.
4. Se preparó la solución amortiguadora de reacción: 4 µL de First strand buffer 5X, 2 µL de DTT 0.1 M y 1 µL de dNTPs (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific REF 28025-013) de acuerdo al número de muestras requeridas y se agregaron 7 µL a cada muestra.
5. Se incubaron las muestras en baño María por 2 min a 42 °C.
6. A cada muestra se le agregó 1µL de enzima transcriptasa reversa MMLV (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific REF 28025-013).
7. Se incubó por 50 min en baño María a 42 °C.
8. Se incubaron las muestras en baño María por 15 min a 73 °C.
9. Se rotularon los tubos adecuadamente, indicando que contenían cADN y se guardaron a -20 °C.

5.8.4 RT-PCR punto final

1. Se preparó el “master mix” necesario para el número de muestras a trabajar: 1.25 μL de solución amortiguadora 10X, 8.9 μL H_2O libre de RNAsas, 0.25 μL dNTPs (Invitrogen REF 10297018), 0.5 μL Fwd primer 10 μM , 0.5 μL Rev primer 10 μM y 0.1 μL de Taq polimerasa (Invitrogen REF 11615010).
2. Se mezclaron 11.5 μL del master mix con 1 μL de cADN, se mezclaron y procesaron las muestras en el termociclador con los primers descritos en la Tabla XV.

Tabla XV: Secuencia de primers utilizados para la RT-PCR.

Genes	Secuencia de los primers	Número de ciclos	Temperatura de alineamiento ($^{\circ}\text{C}$)	Tamaño del producto (pb)
<i>α-SMA</i>	F 5' GAATGAACGCTTCCGCTGCC 3' R 5' TCCTGTCAGCAATGCCTGGG 3'	30	61	185
<i>Smad3</i>	F 5' TGATCCCTCCAATTCAGAGC 3' R 5' AAAGACCTCCCCTCCAATGT 3'	40	59	130
<i>β-actina</i>	F 5' TGGCACCACCTTCTACA-3' R 5'-TCACGCACGATTTCCC-3'	25	53	377

- 3.-Cada muestra fue cargada en un gel de agarosa al 1% al que se le agregaron 5 μL de bromuro de etidio. El gel se corrió de 70-90 V.
- 4.- Se desmontó el gel, se colocó en un fotodocumentador para observar el producto de reacción.

5.8.5 qRT-PCR

- 1.- Se preparó una mezcla de reacción de acuerdo al número de muestras a trabajar. Para *α -SMA* y *Smad3*: SYBER FAST 2X 2.5 μL (Kapa sybr fast universal qPCR KIT REF KK4601), H_2O libre de RNAsas 1.8 μL , Fwd primer 200 nM 0.1 μL y Rev primer 200 nM 0.1 μL . Para *β -actina*: SYBER FAST 2X 2.5 μL , H_2O libre de RNAsas 1.9 μL , Fwd primer 200 nM 0.05 μL , Rev primer 200 nM 0.05 μL .

- 2.-Se tomaron 4.5 μ L de la mezcla de reacción y se depositarlos en viales de 0.2 mL, uno por cada muestra. Se agregaron 0.5 μ L de cADN a cada vial y se agitaron.
- 3.- En placas adecuadas (Illumina EC-200-1002 y EC-200-1003) se depositaron 4 μ L de la mezcla anterior, se colocó la aplaca en el termociclador y se programó el equipo de acuerdo a la Tabla XVI.

Tabla XVI: Secuencia de primers y condiciones utilizadas para la qRT-PCR.

Genes	Secuencia de los primers	Número de ciclos	Temperatura de alineamiento (°C)	Tiempo de alineamiento (s)
<i>α-SMA</i>	F 5' GAATGAACGCTTCCGCTGCC 3' R 5' TCCTGTCAGCAATGCCTGGG 3'	40	60	10
<i>Smad3</i>	F 5' TGATCCCTCCAATTCAGAGC 3' R 5'AAAGACCTCCCCTCCAATGT 3'	40	60	10
<i>β-actina</i>	F 5' TGGCACCACACCTTCTACA-3' R 5'-TCACGCACGATTCCC-3'	40	50	10

- 4.-Los datos obtenidos fueron analizados por el método del $2^{-\Delta \Delta C_T}$ como se describe en: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta \Delta C_T}$ method, Livak K.J. y Schmittgen T.D. (61).

5.9 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en las determinaciones de FA, γ -GTP, ALT, GPx, GSH, LP, colágena y glucógeno fueron expresados como el promedio de ocho experimentos independientes \pm el error estándar (SE). En el caso de los ensayos de zimografía, inmunohistoquímica, WB y qRT-PCR, los datos fueron expresados como el promedio de tres experimentos independientes \pm el SE. En todas las pruebas se llevó a cabo un análisis de una varianza seguida por la prueba de Tukey, utilizando el software Graph Pad Prism. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando p fue <0.05

6 RESULTADOS

6.1 Estudio del mecanismo de acción de la NAR en la prevención del daño hepático crónico inducido por el CCl₄.

Durante el modelo de prevención de daño hepático crónico, las ratas Wistar macho fueron administradas por 8 semanas con CCl₄ y NAR al mismo tiempo, para conocer el mecanismo de acción de la NAR en la prevención de la cirrosis experimental. A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

6.1.1 La administración de la NAR previno la inflamación durante el daño hepático crónico experimental.

El NF- κ B es una proteína muy importante durante el desarrollo de la inflamación, ya que regula la expresión de interleucinas como la IL-1 β proinflamatoria y la IL-10 antiinflamatoria.

Por medio de análisis de WB se investigaron los niveles de NF- κ B (p65), IL-1 β e IL-10 en el modelo de prevención de daño hepático, encontrando que los niveles basales de estas proteínas fueron incrementados por la administración de CCl₄: el p65 aumentó casi 3 veces respecto al grupo control, mientras la IL-1 β y la IL-10 aumentaron 3.8 y 1.8 veces, respectivamente. La administración de la NAR previno la inflamación en ratas tratadas por 8 semanas con CCl₄, ya que pudo mantener los niveles normales de p65, IL-1 β y IL-10 (Figura 11). Por otro lado, el tratamiento con la NAR sola no modificó los parámetros de la inflamación medidos en este estudio.

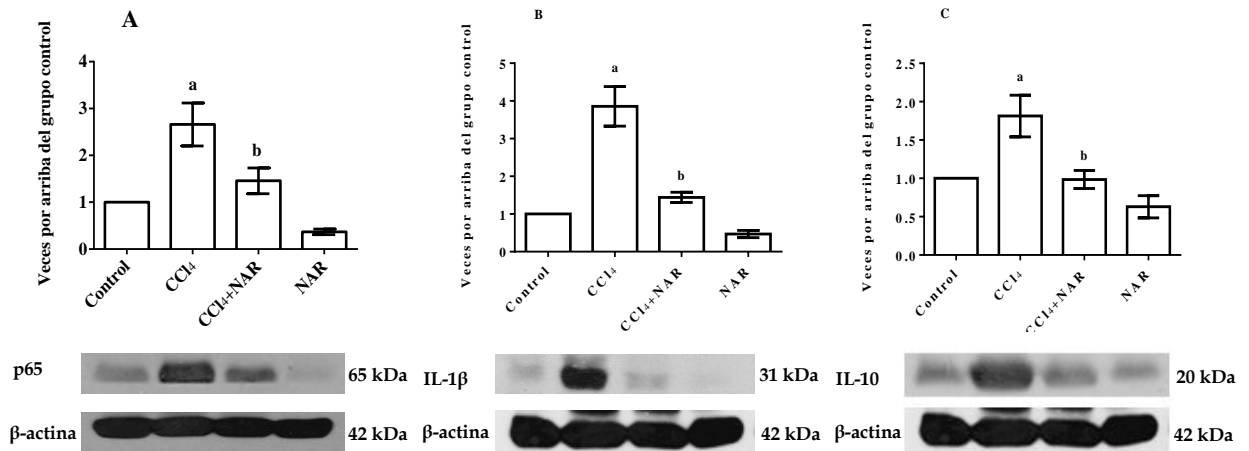


Figura 11. La naringenina (NAR) previno la inflamación en las ratas tratadas con el CCl₄. Niveles de proteína de (A) NF-κB (p65), (B) IL-1β y (C) IL-10 en muestras de tejido hepático, mediante la técnica de western blot, de las ratas control, las ratas tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), las ratas tratadas con CCl₄ más NAR (CCl₄ + NAR) y las ratas administradas con NAR sola (NAR). Se usó β-actina como control. Los valores se expresan como aumento de veces del IOD relativo normalizado a los valores del grupo control (control = 1). Cada barra representa el valor promedio de tres ratas ± error estándar. **a** significa $P < 0.05$ respecto al grupo control y **b** significa $P < 0.05$ respecto al grupo de CCl₄.

6.1.2 La NAR preservó la actividad normal de MMP9 y MMP2 en la cirrosis hepática.

Las MMPs son enzimas responsables de degradar la MEC, entre las más importantes están la MMP9 y la MMP2.

Como se observa en la Figura 12, en condiciones normales, la MMP9 y la MMP2 presentaron una actividad basal, sin embargo, debido a la administración de CCl₄, ésta aumentó 3.7 y 5.4 veces, respectivamente, comparada con el grupo control. El tratamiento preventivo con NAR mantuvo la actividad basal de las MMPs en la cirrosis experimental inducida por CCl₄.

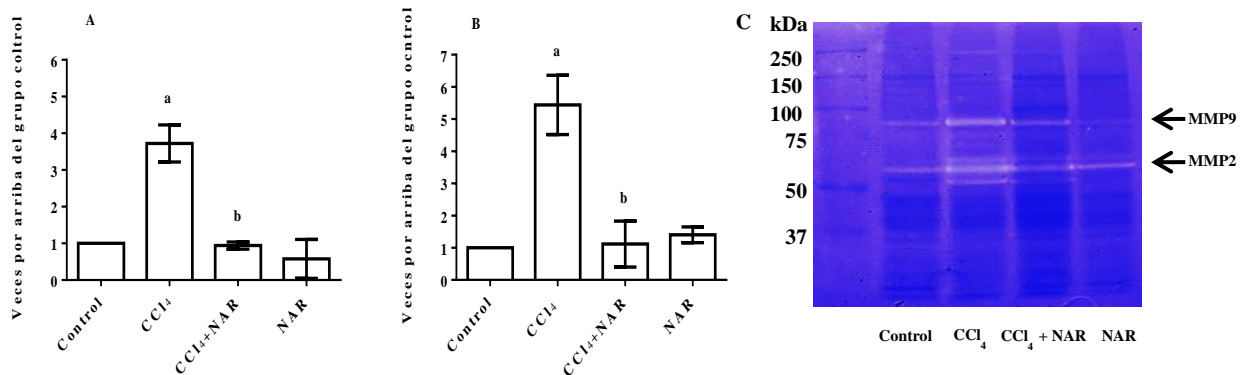


Figura 12. La naringenina (NAR) previno la elevación en la actividad de las metaloproteasas (MMPs) 9 y 2 en las ratas tratadas con el CCl₄. La actividad de (A) la MMP9 y (B) la MMP2 fue analizada por zimografía usando (C) geles con gelatina como sustrato. Fueron analizadas muestras de hígado de las ratas control, las ratas tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), las ratas tratadas con CCl₄ más NAR (CCl₄ + NAR) y las ratas administradas con NAR sola (NAR). Los valores se expresan como aumento de veces del IOD relativo normalizado a los valores del grupo control (control = 1). Cada barra representa el valor promedio de tres ratas ± error estándar (SE). **a** significa $P < 0.05$ respecto al grupo control y **b** significa $P < 0.05$ respecto al grupo de CCl₄.

6.1.3 La NAR bloqueó la transdiferenciación de las CEHs y la síntesis de Col-I por inhibición de las proteínas profibrogénicas.

Como se ha dicho antes, el TGF- β induce la transdiferenciación de las CEHs, así como la expresión de α -SMA, Col-I y CTGF en dichas células. En el grupo control, se observaron niveles normales de TGF- β , α -SMA, CTGF y Col-I; sin embargo, la fibrosis experimental inducida por CCl₄ incrementó sus niveles varias veces por arriba del grupo control; por otro lado, la administración de la NAR previno completamente la elevación de los niveles proteicos de TGF- β , α -SMA, CTGF y Col-I, durante la administración del hepatotóxico. Interesantemente, la NAR por sí sola redujo los niveles basales de α -SMA y Col-I respecto al grupo control (Figura 13 paneles A-E).

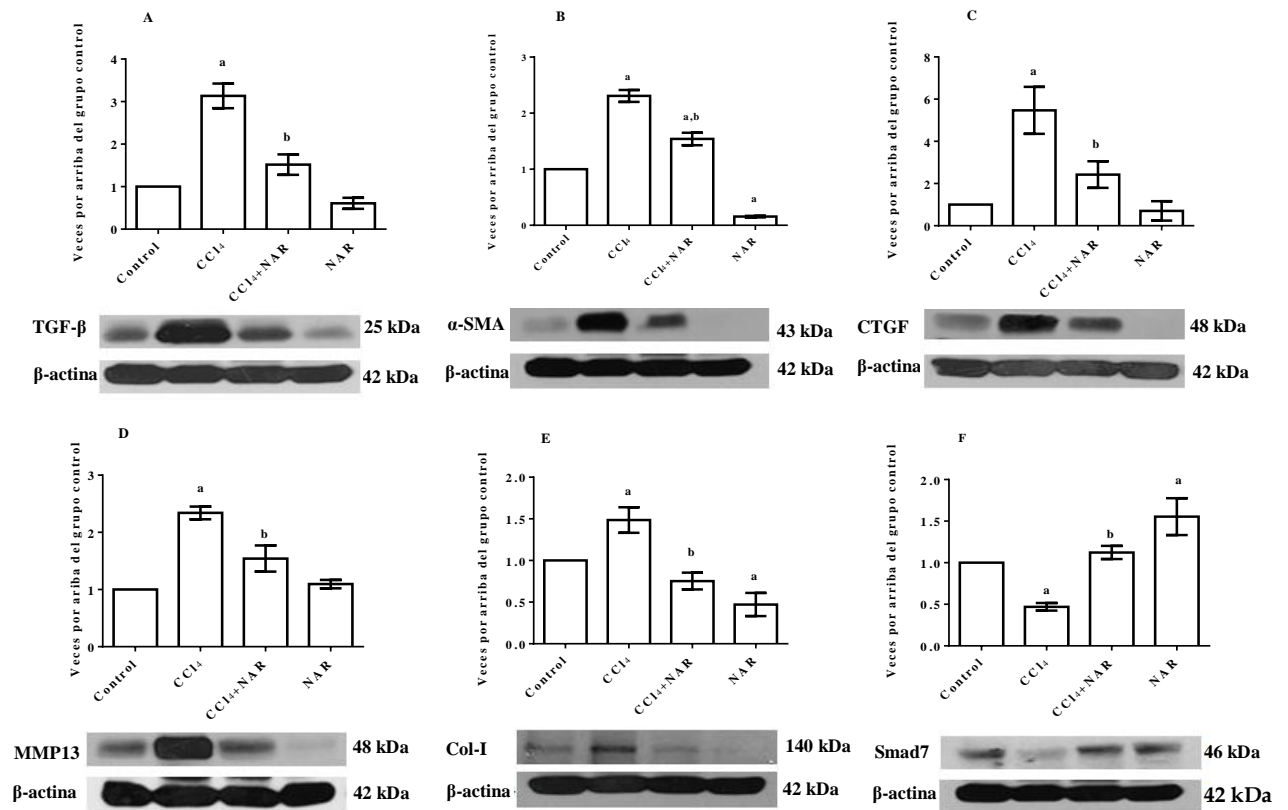


Figura 13. La naringenina (NAR) previno la elevación de los niveles proteicos de TGF- β , α -SMA, CTGF, MMP13 y Col-I, mientras que mantuvo los de Smad7 en las ratas tratadas con el CCl₄. Por western blot fueron determinados (A) el TGF- β , (B) la α -SMA, (C) el CTGF, (D) la MMP13, (E) la Col-I y (F) la Smad7, en muestras de hígado de las ratas control, las ratas tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), las ratas tratadas con CCl₄ más NAR (CCl₄ + NAR) y las ratas administradas con NAR sola (NAR). Se usó β -actina como control. Los valores se expresan como aumento de veces del IOD relativo normalizado a los valores del grupo control (control = 1). Cada barra representa el valor promedio de tres ratas \pm error estándar (SE). **a** significa $P < 0.05$ respecto al grupo control y **b** significa $P < 0.05$ respecto al grupo de CCl₄.

La MMP13 está involucrada en los procesos de migración y proliferación de las CEHs y activación del TGF- β (62). Como puede observarse en la Figura 13D, debido a la administración de CCl₄, los niveles de MMP13 se incrementaron 2.3 veces respecto al grupo control. El tratamiento con la NAR mantuvo los niveles basales de MMP13 en la cirrosis inducida por CCl₄.

La Smad7 inhibe la vía de señalización del TGF- β ; los niveles de la Smad7 bajaron significativamente por la administración de CCl₄, sin embargo, este efecto fue prevenido por el tratamiento con la NAR. El flavonoide por sí mismo disminuyó los niveles de α -SMA y Col-I, pero aumentó los de Smad7 respecto al grupo control (Figura 13 paneles B, E, F).

6.1.4 La NAR inhibió la proliferación de las CEHs por el bloqueo de la vía no canónica de JNK-pSmad3L.

Los resultados de este trabajo confirmaron que durante el desarrollo de la fibrosis hepática apareció un incremento significativo de pJNK, pSmad3L y Smad3 comparado con el grupo control (Figura 14). Interesantemente, la administración de la NAR previno la activación de JNK, la elevación de Smad3 total, así como la fosforilación de ésta en la región “linker” por acción de pJNK (Figura 14).

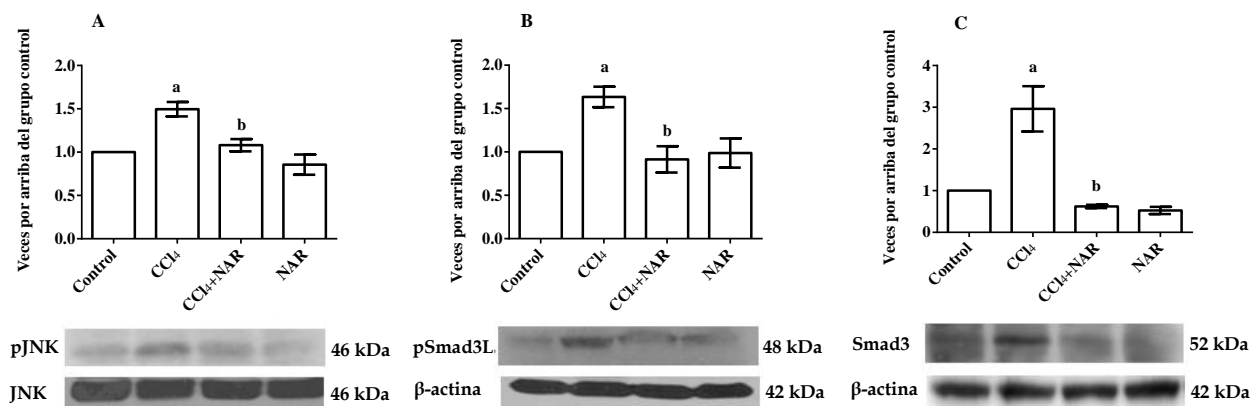


Figura 14. La naringenina (NAR) previno la fosforilación de Smad3 en el “linker” por JNK en las ratas tratadas con el CCl₄. Por western blot fueron analizadas (A) pJNK, (B) pSmad3L y (C) Smad3 total en muestras de hígado de las ratas control, las ratas tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), las ratas tratadas con CCl₄ más NAR (CCl₄ + NAR) y las ratas administradas con NAR sola (NAR). Se usó β -actina como control. Los valores se expresan como aumento de veces del IOD relativo normalizado a los valores del grupo control (control = 1). Cada barra representa el valor promedio de tres ratas \pm error estándar (SE). **a** significa $P < 0.05$ respecto al grupo control y **b** significa $P < 0.05$ respecto al grupo de CCl₄.

6.2 Efecto de la NAR y la CUR sobre el daño hepático crónico previamente establecido por el CCl₄: reversión de la cirrosis.

6.2.1 Efecto de la NAR sobre la reversión de la cirrosis.

En el modelo de reversión del daño hepático crónico se administró CCl₄ por 12 semanas a ratas Wistar macho; sin embargo, al inicio de la semana 9 de daño se administró la NAR para estudiar su efecto en la reversión de la cirrosis experimental previamente establecida (Tabla VI y Figura 9). A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

6.2.1.1 Efecto macroscópico y microscópico de la NAR sobre el daño hepático crónico previamente establecido por el CCl₄.

La apariencia macroscópica y microscópica de los hígados extraídos de cada grupo experimental se muestra en la Figura 15. La Figura 15A muestra un hígado representativo del grupo control, de apariencia lisa y color rojo oscuro, característico de un hígado sano. El tratamiento con CCl₄ produjo la fibrosis macronodular (Figura 15B) que fue revertida por la administración de la NAR (Figura 15C). Los hígados de las ratas tratadas con NAR solamente tuvieron una apariencia parecida a la del grupo control (Figura 15D).

Los resultados del estudio histopatológico se muestran en la Figura 15 paneles E-H. En la Figura 15E se observa que el grupo control no mostró alteraciones en el parénquima hepático. La Figura 15F corresponde a un corte de hígado representativo del grupo tratado con CCl₄; en este caso, el tejido hepático mostró alteración del parénquima del hígado, esteatosis, proliferación de conductos biliares y depósitos de hemosiderina. El daño hepático fue revertido por la administración de NAR ya que se observaron grandes áreas de tejido aparentemente sanas (Figura 15G). El grupo administrado con NAR no mostró ninguna modificación a nivel histológico (Figura 15H).

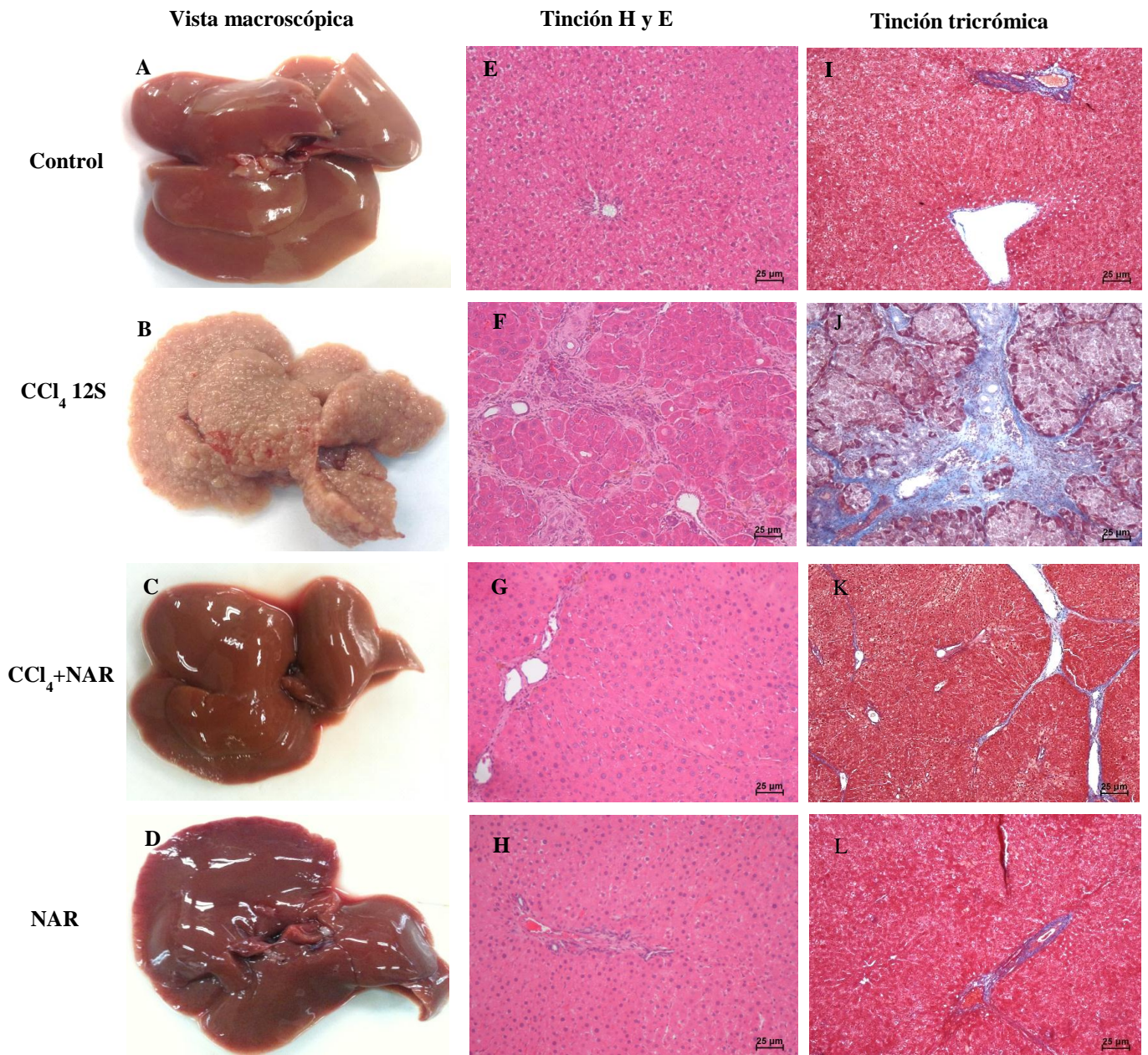


Figura 15. Efecto de la naringenina (NAR) sobre la arquitectura macroscópica y microscópica en las ratas tratadas con el CCl₄. Aspecto macroscópico de los hígados en (A) las ratas controles, (B) las ratas administradas con tetracloruro de carbono (CCl₄), (C) las ratas tratadas con CCl₄ más NAR (CCl₄ + NAR) y (D) las ratas con NAR sola. Tinción de hematoxylin y eosina en los hígados de (E) las ratas control, (F) las ratas administradas con CCl₄, (G) las ratas tratadas con CCl₄ + NAR y (H) las ratas con NAR sola. Tinción tricrómica de Masson de (I) las ratas control, (J) tratadas con CCl₄, (K) con CCl₄ + NAR y (L) NAR sola. Barra de escala = 25 μm.

La tinción tricrómica de Masson se muestra en la Figura 15 paneles I-L. La Figura 15J representa una muestra de hígado de una rata cirrótica; se observó una gran cantidad de depósitos de colágena alrededor de los nódulos de regeneración, la distorsión del parénquima es evidente cuando se compara con el grupo control (Figura 15I). Respecto al grupo tratado con CCl₄ más NAR, es importante hacer notar que se observa reabsorción de las fibras de colágena en la luz de los vasos, depósitos de hemosiderina, atipias nucleares, así como una considerable disminución de la fibrosis (Figura 15K). El grupo de NAR no muestra cambios respecto al control sano (Figura 15L).

6.2.1.2 La NAR revirtió la necrosis y la colestasis en las ratas tratadas con CCl₄.

Como se muestra en la Figura 16, la administración crónica del CCl₄ incrementó significativamente la actividad sérica de la ALT, un marcador de la necrosis hepática (63). Después de la administración de CCl₄, la FA y la γ -GTP, dos marcadores de colestasis (63), también incrementaron significativamente sus niveles séricos respecto al grupo control. La administración de la NAR revirtió el incremento en la actividad sérica de ALT, FA y γ -GTP, sugiriendo que la NAR fue capaz de revertir la necrosis y la colestasis causadas por la administración de CCl₄ por 12 semanas (Figura 16). El tratamiento con NAR a ratas sanas no modificó los indicadores de la necrosis y la colestasis.

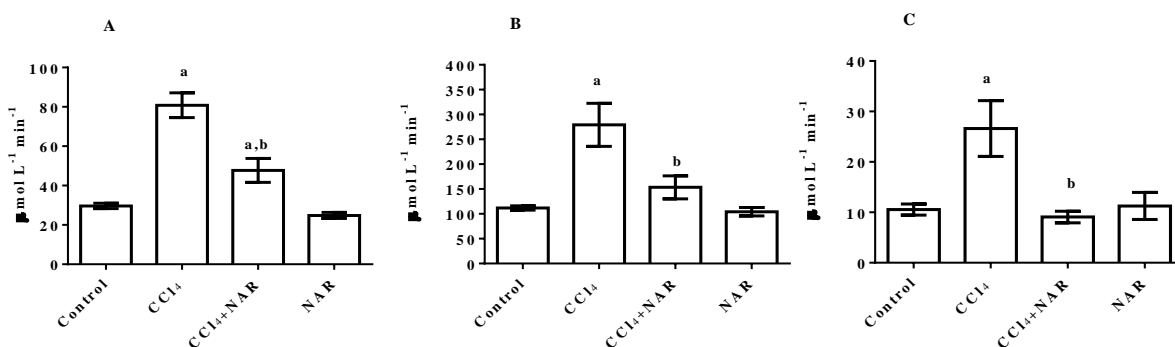


Figura 16. La naringenina (NAR) revirtió la necrosis y la colestasis en las ratas tratadas con el CCl₄. Actividades de (A) la alanina aminotransferasa; (B) la fosfatasa alcalina y (C) la γ -glutamyl transpeptidasa fueron determinadas en suero de las ratas control, las ratas tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), las ratas tratadas con CCl₄ más NAR (CCl₄ + NAR) y las ratas administradas con NAR sola (NAR). Cada barra representa el valor promedio de ocho ratas \pm error estándar (SE). **a** significa $P < 0.05$ respecto al grupo control y **b** significa $P < 0.05$ respecto al grupo de CCl₄.

6.2.1.3 La NAR restablece los niveles normales del glutatión reducido, pero no los de la peroxidación lipídica.

Uno de los principales productos de la PL es el MDA, que es utilizado para medir el estrés oxidativo en tejidos (64). Como se esperaba, la inducción de la cirrosis aumentó la PL ya que, los niveles de MDA fueron elevados significativamente comparados con el grupo control. La administración de la NAR redujo de manera modesta los niveles de MDA, sin que el efecto fuera significativo (Figura 17A).

El GSH es uno de los antioxidantes endógenos más importantes (65). Las ratas tratadas con CCl_4 mostraron bajos niveles de GSH hepático, comparados con el grupo control, pero la NAR restauró los niveles normales de GSH en las ratas con daño hepático crónico (Figura 17B).

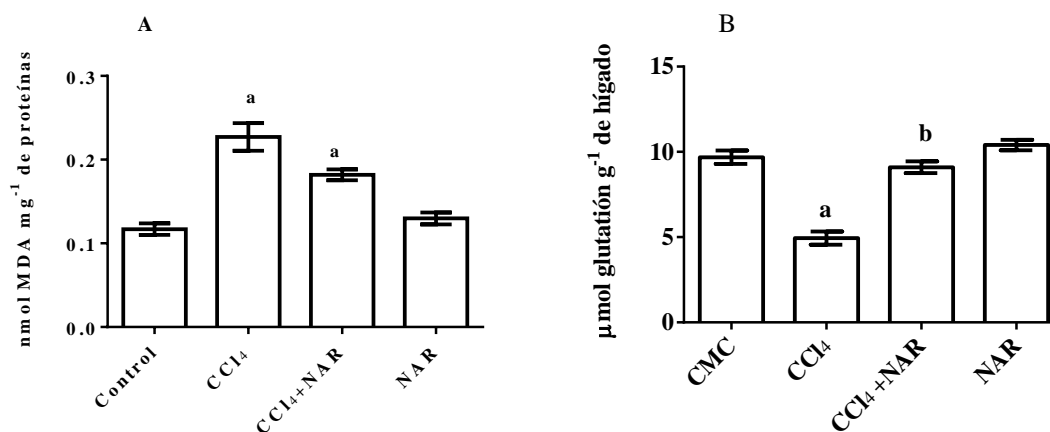


Figura 17. La naringenina (NAR) restableció los niveles de glutatión reducido en las ratas tratadas con el CCl_4 . Fueron determinados (A) la peroxidación lipídica y (B) el glutatión reducido en tejido hepático de las ratas control, las ratas tratadas con tetracloruro de carbono (CCl_4), las ratas tratadas con CCl_4 más NAR ($\text{CCl}_4 + \text{NAR}$) y las ratas administradas con NAR sola (NAR). Cada barra representa el valor promedio de ocho ratas \pm error estándar (SE). **a** significa $P < 0.05$ respecto al grupo control y **b** significa $P < 0.05$ respecto al grupo de CCl_4 .

6.2.1.4 La administración de la NAR revirtió la inflamación en las ratas con cirrosis experimental previamente establecida.

El NF- κ B, la IL-1 β y la IL-10 son importantes mediadores de la inflamación. Tras la administración de CCl₄ por 12 semanas, los niveles proteicos de estas citocinas se elevaron 2.5, 3.8 y 5.3 veces, respectivamente comparados con el grupo control, sin embargo, la administración de la NAR al inicio de la novena semana de daño logró restablecer los niveles basales de p65, IL-1 β e IL-10 (Figura 18).

En la Figura 18B se muestran cortes de tejido hepático con reactividad hacia p65 e IL-1 β ; en el grupo control se apreció el parénquima hepático normal y los niveles basales de p65 e IL-1 β ; sin embargo, en el grupo con cirrosis experimental se observó cambio en la estructura del parénquima, así como grandes áreas positivas a p65 e IL-1 β que colocalizan con regiones dañadas, con la acumulación de colágena y con presencia de CEHs. La administración de NAR disminuyó significativamente las zonas positivas para p65 e IL-1 β .

6.2.1.5 La NAR revirtió la acumulación de colágena en las ratas con cirrosis hepática experimental.

Uno de los principales parámetros a evaluar durante la cirrosis hepática es la acumulación de colágena. Durante 12 semanas de administración del CCl₄, los niveles de colágena total y Col-I aumentaron 5 y 3.3 veces, respectivamente comparados con el grupo control; sin embargo, tras la administración de la NAR por 4 semanas los valores de la colágena total y Col-I disminuyeron significativamente (Figura 19).

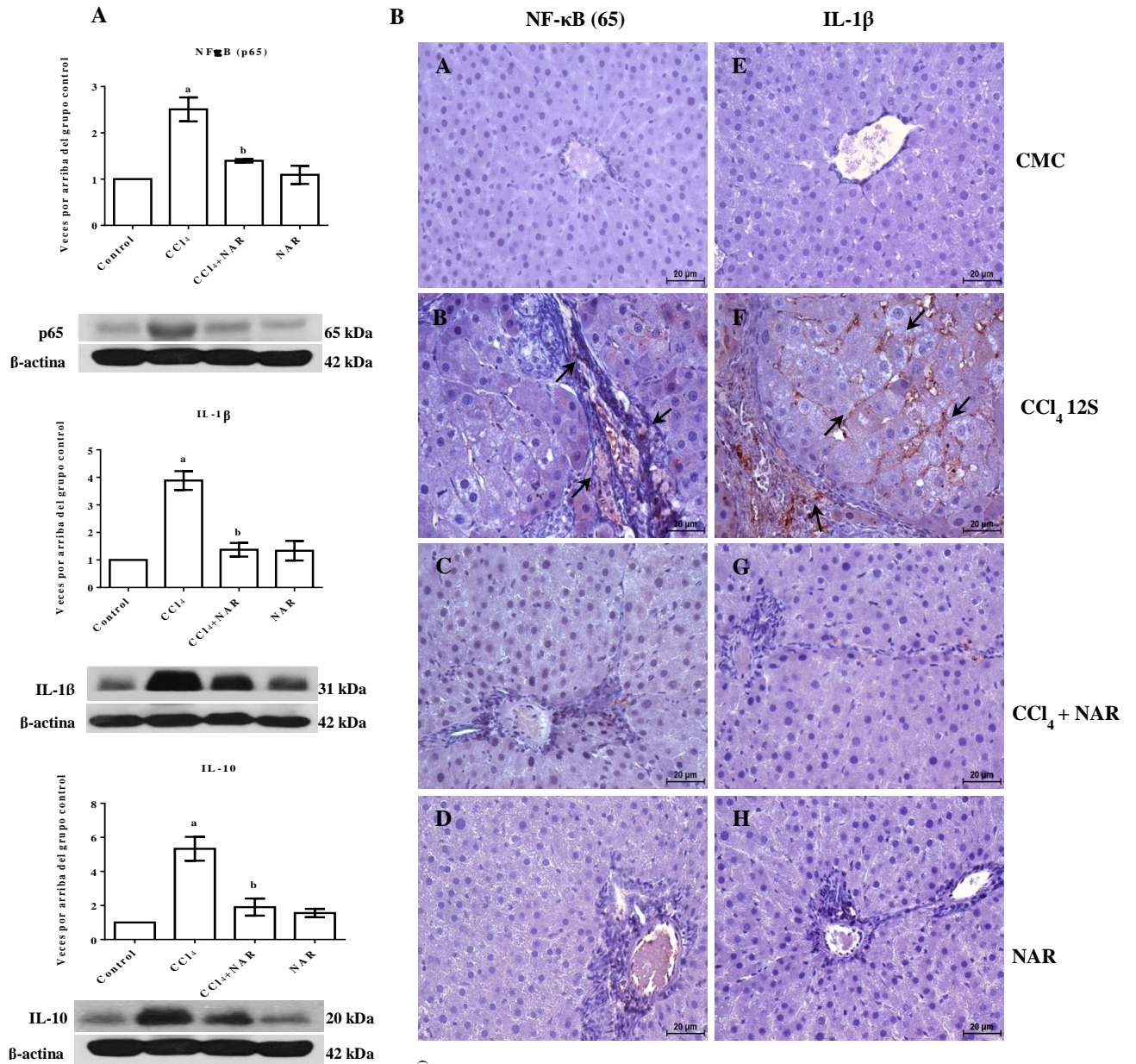
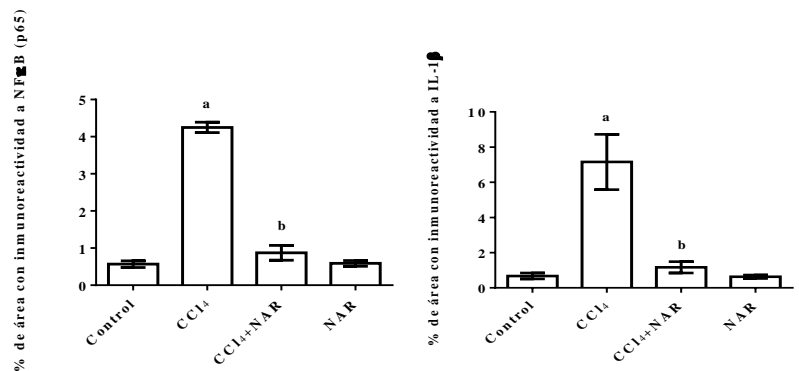


Figura 18. La naringenina (NAR) revirtió la inflamación en las ratas tratadas con el CCl₄. (A) western blot de NF- κ B (p65), IL-1 β e IL-10 y (B) inmunohistoquímicas para NF- κ B (p65) e IL-1 β de tejido hepático de las ratas control, las ratas tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), las ratas tratadas con CCl₄ más NAR (CCl₄ + NAR) y las ratas tratadas con NAR. Se usó β -actina como control. Los valores se expresan como el aumento de veces del IOD relativo normalizado a los valores del grupo control (control = 1) y en % de área con inmunoreactividad. Cada barra representa el valor promedio de tres ratas \pm error estándar (SE). **a** significa $P < 0.05$ respecto al grupo control y **b** significa $P < 0.05$ respecto al grupo de CCl₄.



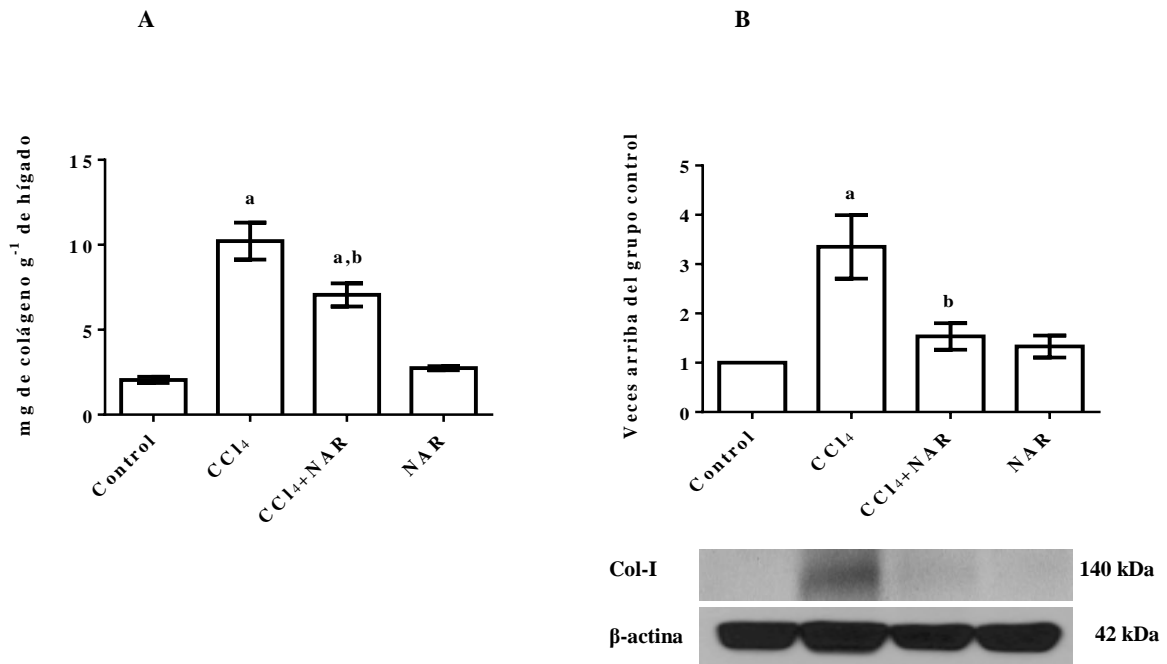


Figura 19. La naringenina (NAR) revirtió la acumulación de colágena en las ratas tratadas con el CCl₄ por 12 semanas. Fueron determinadas (A) la colágena total y (B) la Col-I en tejido de las ratas control, las ratas tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), las ratas tratadas con CCl₄ más NAR (CCl₄ + NAR) y las ratas administradas con NAR sola (NAR). Cada barra representa el valor promedio de ocho ratas ± error estándar (SE). **a** significa $P < 0.05$ respecto al grupo control y **b** significa $P < 0.05$ respecto al grupo de CCl₄.

6.2.1.6 Efecto de la NAR sobre la remodelación de la matriz extracelular en las ratas tratadas con CCl₄.

La MEC sufre un proceso de remodelación y recambio que se ve influenciado por el CTGF y las MMPs y esto favorece la migración de las CEHs y el almacenamiento de las citocinas profibrogénicas. Como se esperaba, los niveles proteicos de CTGF y de MMP13 se elevaron significativamente en el grupo de cirrosis experimental respecto al grupo control. En cuanto a las MMP2 y 9, la administración crónica del CCl₄ aumentó su actividad 27 y 8 veces, respectivamente comparada con el grupo control (Figura 20). El flavonoide NAR pudo regresar los niveles proteicos a niveles basales de CTGF y de MMP13 y la actividad de las MMP2 y 9 (Figura 20). Por su parte, el tratamiento con NAR sola, no influyó en el comportamiento de estas proteínas.

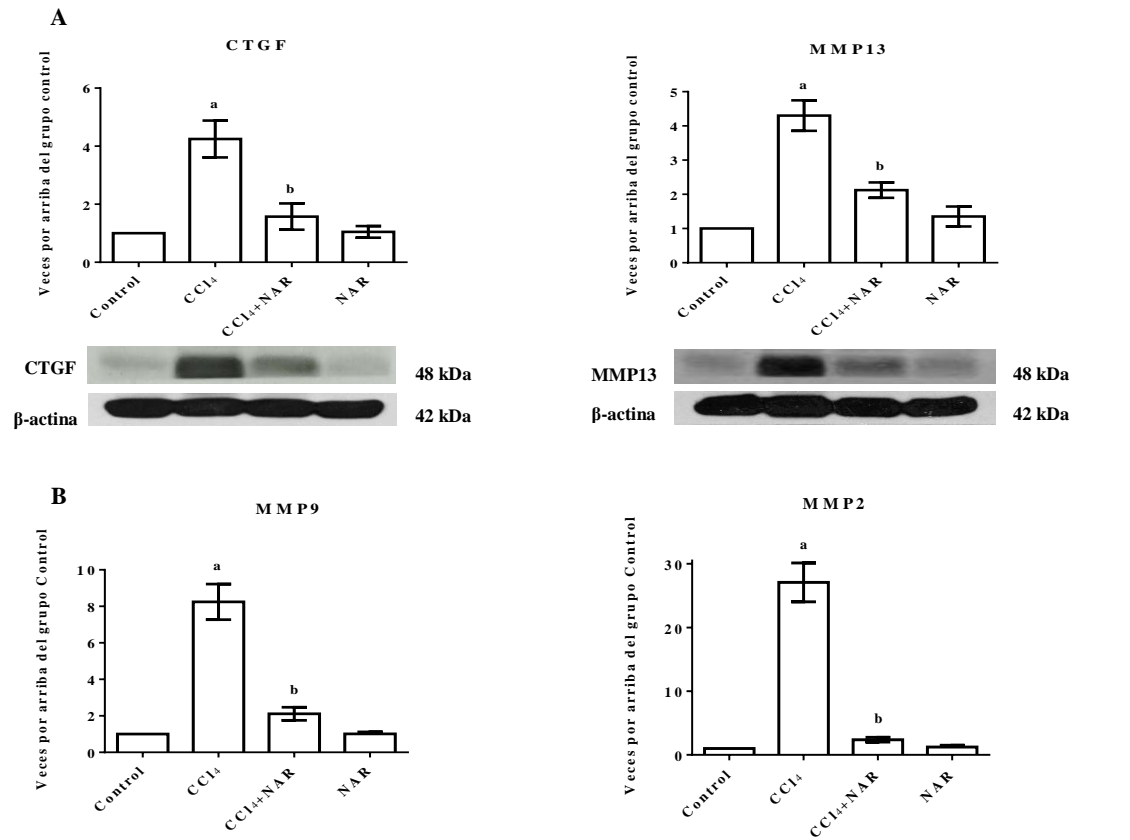
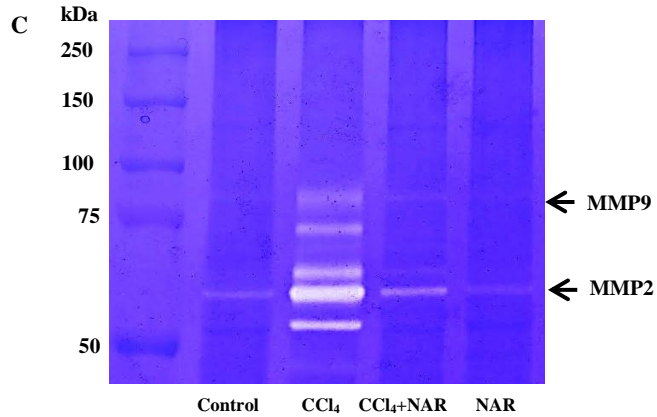


Figura 20. La naringenina (NAR) revirtió la remodelación de la matriz extracelular de las ratas tratadas con el CCl₄. Niveles de proteína de (A) CTGF y de la metaloproteasa (MMP) 13 y (B) actividad de la MMP9 y la MMP2 en muestras de tejido hepático, mediante la técnica de western blot y (C) zimografía, de las ratas control, las ratas tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), las ratas tratadas con CCl₄ más NAR (CCl₄ + NAR), y las ratas administradas con NAR sola (NAR). Se usó β-actina como control. Los valores se expresan como aumento de veces del IOD relativo normalizado a los



Cada barra representa el valor promedio de tres ratas ± error estándar (SE). **a** significa $P < 0.05$ respecto al grupo control y **b** significa $P < 0.05$ respecto al grupo de CCl₄.

6.2.1.7 Efecto de la NAR sobre la transdiferenciación de las CEHs.

La transdiferenciación de las CEHs es un hecho muy importante en el desarrollo de la cirrosis ya que estas células son las principales productoras de colágena. El TGF- β es un inductor de la activación de las CEHs, mientras que la α -SMA es un marcador de transdiferenciación; estas proteínas se elevaron significativamente comparadas con el grupo control tras la administración de CCl₄ (Figura 21). El efecto del CCl₄ fue revertido totalmente en las ratas del grupo CCl₄ + NAR; los niveles proteicos de TGF- β y de α -SMA regresaron a la normalidad tras la administración del flavonoide, este efecto se estudió por WB y por inmunohistoquímica (Figura 21 paneles A y B).

En la Figura 21C (gel de RT-PCR punto final y gráfica de qRT-PCR), se observa que los niveles de expresión de α -Sma aumentaron significativamente tras la administración del CCl₄, sin embargo, la NAR fue capaz de revertir el efecto del hepatotóxico de manera significativa.

6.2.1.8 La administración de la NAR inhibe la vía JNK-Smad3.

Durante el daño crónico hepático, además de la vía canónica del TGF- β -Smad3, se desarrolla la vía no canónica del JNK-Smad3.

Debido a la administración de CCl₄, los niveles de fosforilación de JNK aumentaron significativamente respecto a los basales; interesantemente, la cantidad de JNK total no fue modificada por el hepatotóxico. En cuanto a la proteína Smad3, ésta se evaluó a nivel de mRNA, proteína y fosforilación en el “linker”, encontrándose que en los hígados tratados con CCl₄ se favorece tanto la expresión como la fosforilación en el “linker” (Figura 22). El compuesto natural NAR revirtió el efecto producido por el CCl₄ al regresar a los valores normales la activación de JNK, así como la expresión de Smad3 y su fosforilación en el “linker” por parte de JNK (Figura 22).

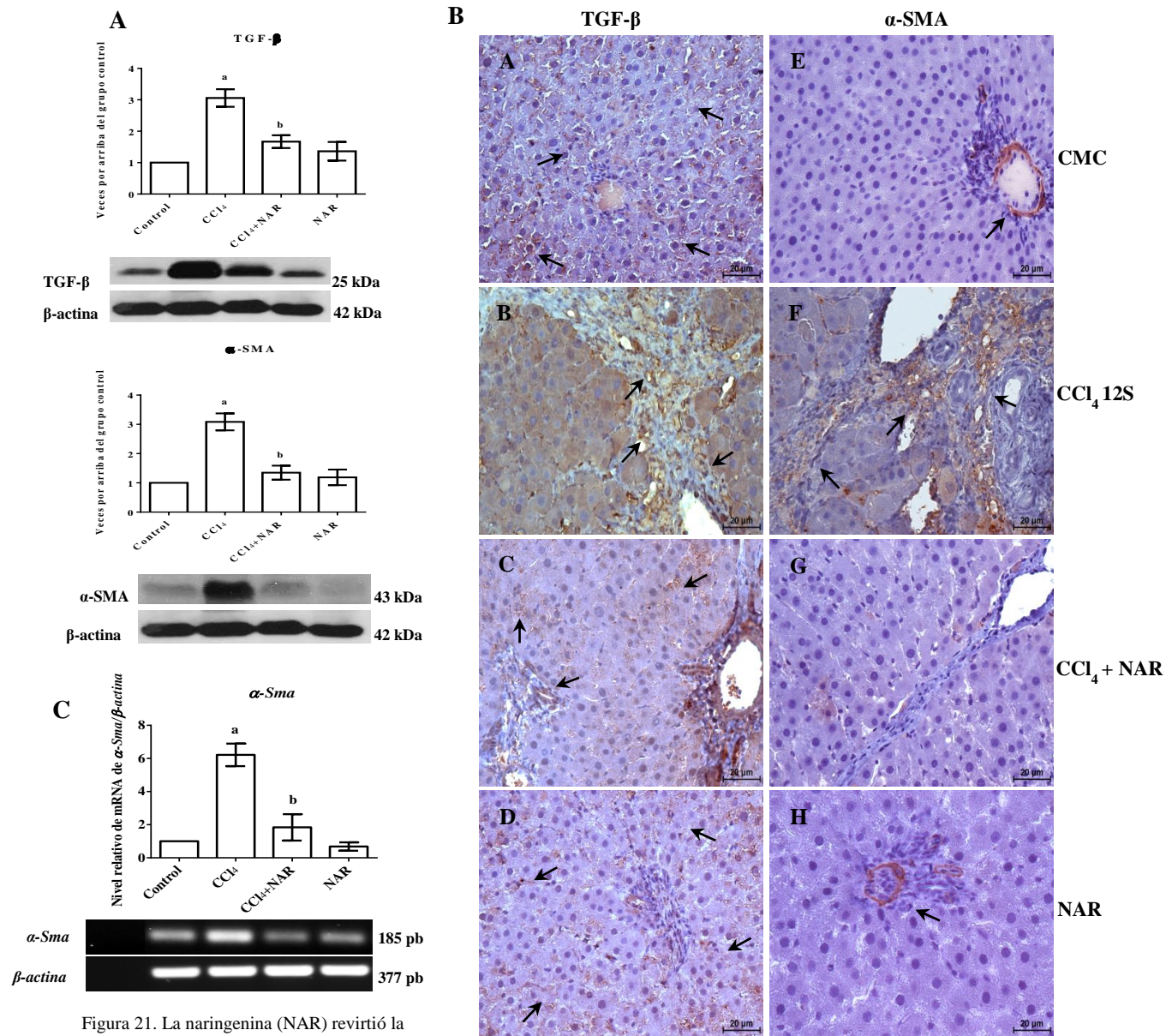
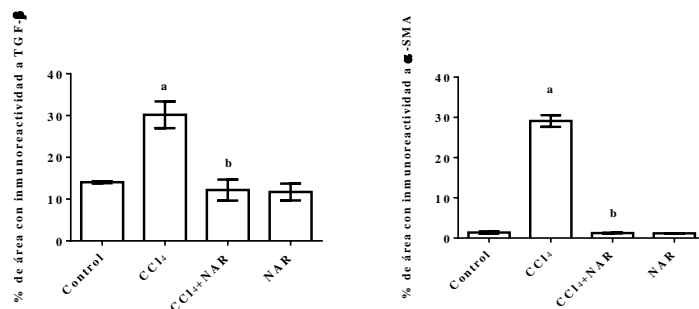


Figura 21. La naringenina (NAR) revirtió la activación de las células estelares de las ratas tratadas con el CCl₄. Western blot de (A) TGF- β y α -SMA; (B) inmunohistoquímica para TGF- β y α -SMA y (C) gel de RT-PCR punto final y gráfica de qRT-PCR de α -Sma de tejido hepático de las ratas control, las ratas tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), las ratas tratadas con CCl₄ más NAR (CCl₄ + NAR), Se usó β -actina como control. Los valores se expresan como aumento de veces del IOD relativo normalizado a los valores del grupo control (control = 1) y % de área con inmunoreactividad. Cada barra representa el valor promedio de tres ratas \pm error estándar (SE). **a** significa $P < 0.05$ respecto al grupo control y **b** significa $P < 0.05$ respecto al grupo de CCl₄.



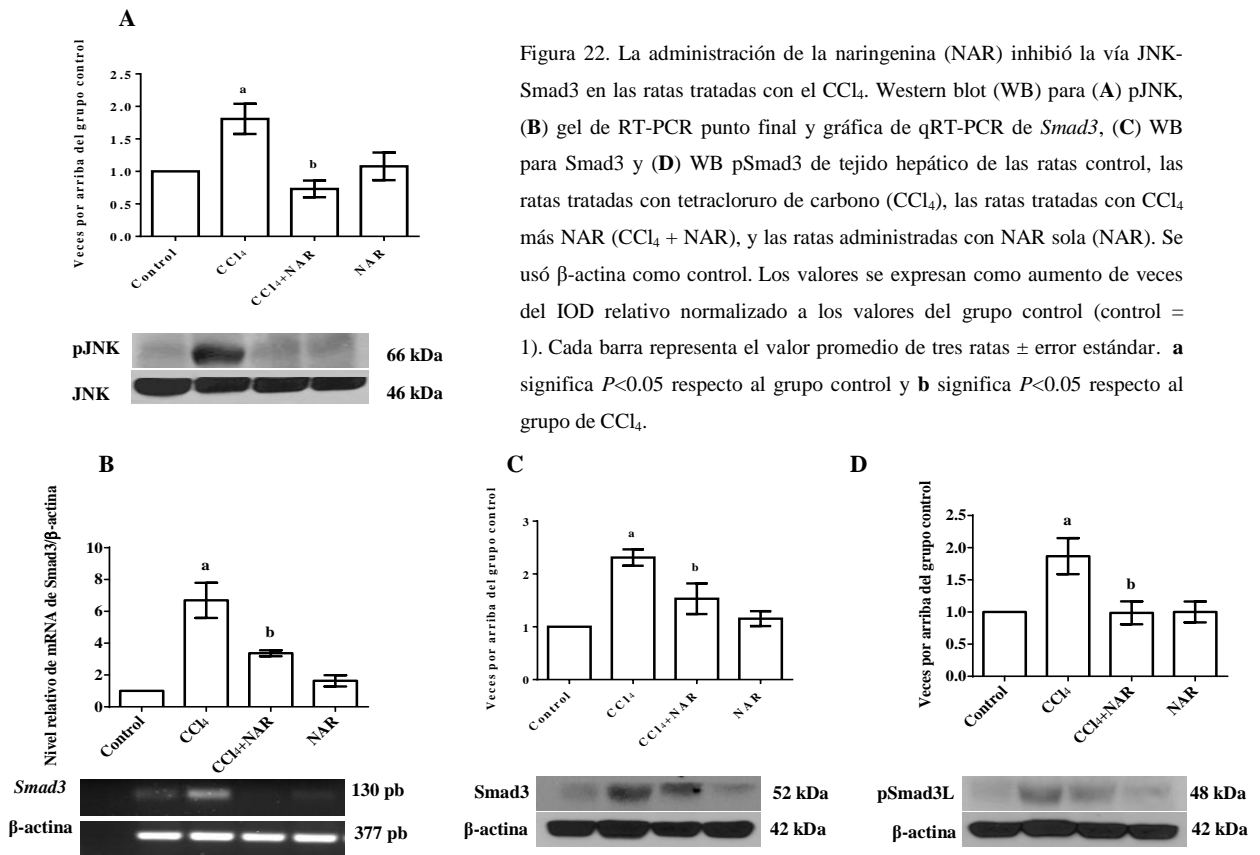


Figura 22. La administración de la naringenina (NAR) inhibió la vía JNK-Smad3 en las ratas tratadas con el CCl₄. Western blot (WB) para (A) pJNK, (B) gel de RT-PCR punto final y gráfica de qRT-PCR de *Smad3*, (C) WB para Smad3 y (D) WB pSmad3 de tejido hepático de las ratas control, las ratas tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), las ratas tratadas con CCl₄ más NAR (CCl₄ + NAR), y las ratas administradas con NAR sola (NAR). Se usó β -actina como control. Los valores se expresan como aumento de veces del IOD relativo normalizado a los valores del grupo control (control = 1). Cada barra representa el valor promedio de tres ratas \pm error estándar. **a** significa $P < 0.05$ respecto al grupo control y **b** significa $P < 0.05$ respecto al grupo de CCl₄.

6.2.1.9 La NAR ejerce sus efectos antifibróticos en parte vía Smad7

La Smad7 tiene como función principal regular negativamente la vía del TGF- β , por lo que su estatus durante la fibrosis es muy importante.

Durante la inducción de cirrosis por 12 semanas se encontró que el valor de Smad7 disminuyó 50% respecto del grupo control, pero la administración de la NAR desde la semana 9 de daño logró revertir el efecto del CCl₄ de forma significativa (Figura 23).

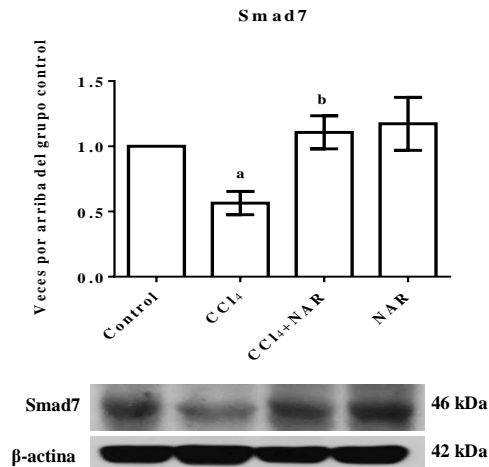


Figura 23. La administración de la naringenina (NAR) promovió la vía inhibitoria del TGF- β en las ratas tratadas con el CCl₄. Western blot para Smad7 de tejido hepático de las ratas control, las ratas tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), las ratas tratadas con CCl₄ más NAR (CCl₄ + NAR), y las ratas administradas con NAR sola (NAR). Se usó β -actina como control. Los valores se expresan como aumento de veces del IOD relativo normalizado a los valores del grupo control (control = 1). Cada barra representa el valor promedio de tres ratas \pm error estándar. **a** significa $P < 0.05$ respecto al grupo control y **b** significa $P < 0.05$ respecto al grupo de CCl₄.

6.2.1.10 La NAR restableció la capacidad biosintética del hígado en las ratas administradas con CCl₄.

La medición del glucógeno hepático es un importante parámetro de la funcionalidad del órgano. Los hígados con cirrosis mostraron valores significativamente bajos de glucógeno en comparación con los hígados sanos, este hecho fue revertido por la NAR quien restauró los niveles normales de glucógeno (Figura 24).

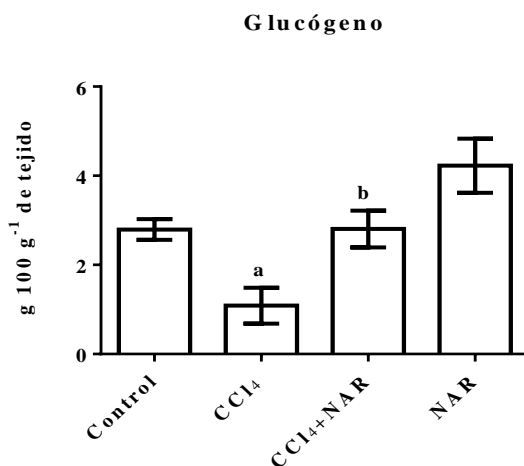


Figura 24. La naringenina (NAR) restableció la capacidad biosintética del hígado en las ratas administradas con el CCl₄. La cantidad de glucógeno en tejido hepático fue determinada en las ratas control, las ratas tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), las ratas tratadas con CCl₄ más NAR (CCl₄ + NAR), y las ratas administradas con NAR sola (NAR). Cada barra representa el valor promedio de ocho ratas \pm error estándar. **a** significa $P < 0.05$ respecto al grupo control y **b** significa $P < 0.05$ respecto al grupo de CCl₄.

6.2.2 Efecto de la CUR sobre la reversión de la cirrosis.

Durante el modelo de reversión del daño hepático crónico, se administró CCl₄ por 12 semanas a ratas Wistar macho, sin embargo, al inicio de la semana 9 se administró la CUR para estudiar su efecto en la reversión de la cirrosis experimental. A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

6.2.2.1 Efecto macroscópico y microscópico de la CUR sobre el daño hepático crónico previamente establecido por el CCl₄.

La apariencia macroscópica y microscópica de los hígados extraídos de cada grupo se muestra en la Figura 25. El hígado de una rata control se muestra en la Figura 25A. El tratamiento con CCl₄ produjo fibrosis macronodular (Figura 25B). La administración de la CUR fue capaz de revertir la fibrosis inducida experimentalmente (Figura 25C). El grupo tratado con CUR mostró una apariencia similar a la del grupo control (Figura 25D).

En la Figura 25 paneles E-H se observan los resultados de la tinción de H y E. El grupo control no tuvo alteraciones en el parénquima hepático (Figura 25E). La Figura 25F corresponde a un corte de hígado del grupo de daño crónico; en este caso, el tejido mostró alteraciones morfológicas del parénquima hepático, proliferación de conductos biliares y esteatosis en los hepatocitos. El grupo administrado con el compuesto natural tuvo una gran disminución del daño hepático ya que se encontraron amplias zonas de hepatocitos de apariencia normal, aunque mantuvo depósitos discretos de hemosiderina y atipias nucleares (Figura 25G). El grupo administrado con CUR permaneció con una arquitectura de apariencia normal (Figura 25H).

En la Figura 25 paneles I-L se muestra la tinción tricrómica de Masson. Una muestra representativa de hígado cirrótico se aprecia en la Figura 25J, se observó una gran cantidad de colágena alrededor de los nódulos de regeneración y en las zonas de proliferación de conductos biliares, comparado con el grupo control (Figura 25I). Respecto al grupo CCl₄ +

CUR, se apreciaron áreas aparentemente normales, así como una considerable disminución de las fibras de colágena (Figura 25K). El grupo de CUR no mostró cambios respecto al grupo control (Figura 25L).

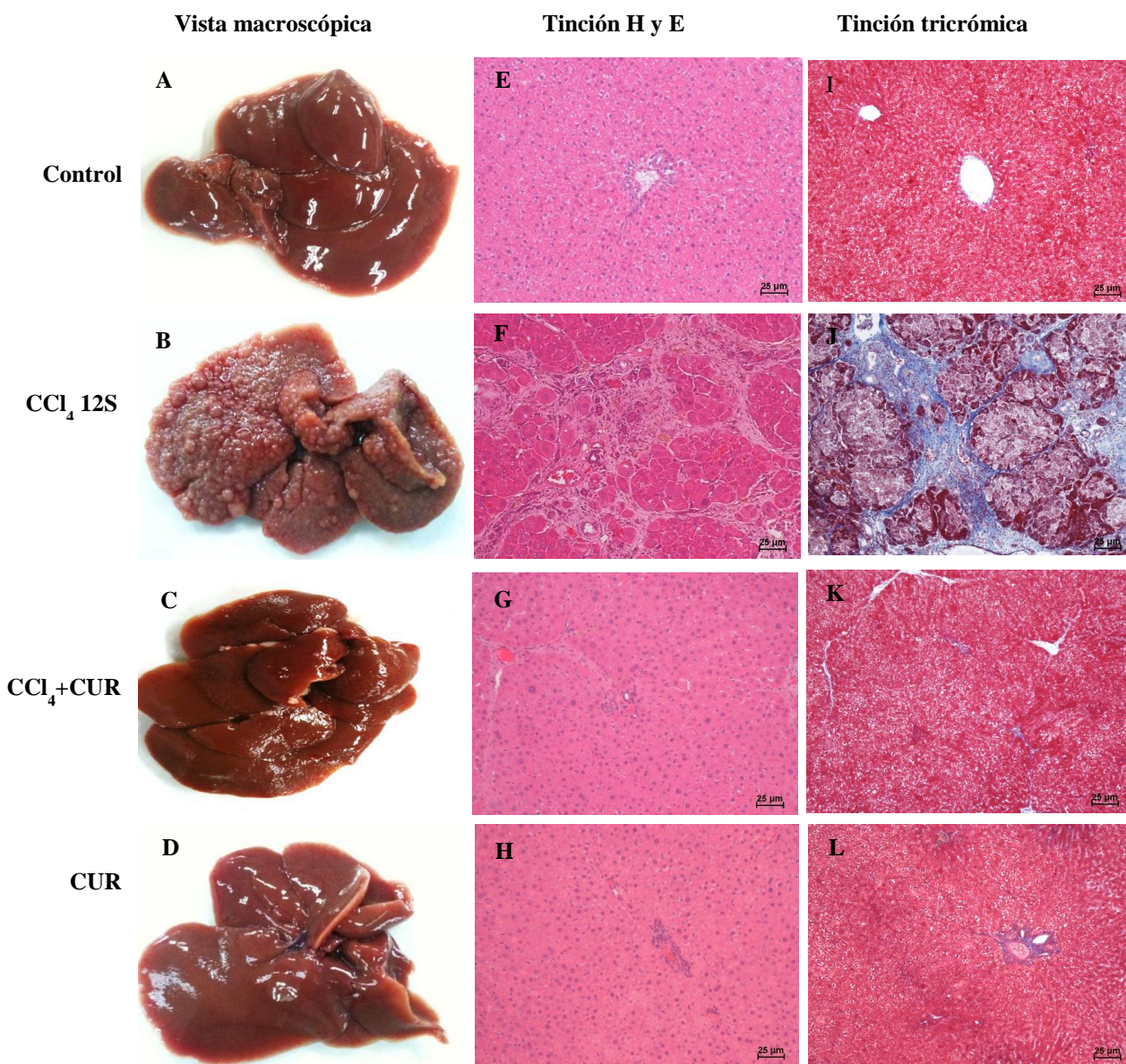


Figura 25. Efecto de la curcumina (CUR) sobre la arquitectura macroscópica y microscópica en las ratas tratadas con el CCl₄. Aspecto macroscópico de los hígados en (A) las ratas controles, (B) las ratas administradas con tetracloruro de carbono (CCl₄), (C) las ratas tratadas con CCl₄ más CUR (CCl₄ + CUR) y (D) las ratas con CUR sola. Tinción de hematoxilina y eosina en los hígados de (E) las ratas control, (F) las ratas administradas con CCl₄, (G) las ratas tratadas con CCl₄ + CUR y (H) las ratas con CUR sola. Tinción tricrómica de Masson de (I) las ratas control, (J) tratadas con CCl₄, (K) con CCl₄ + CUR y (L) CUR sola. Barra de escala = 25 μm.

6.2.2.2 La CUR revirtió la necrosis y la colestasis en las ratas tratadas con el CCl₄.

Como se muestra en la Figura 26, la actividad sérica de la ALT (A), la FA (B) y la γ -GTP (C) incrementaron significativamente debido a la administración crónica del CCl₄; sin embargo, la administración de la CUR revirtió este efecto, sugiriendo que la CUR fue capaz de revertir la necrosis y la colestasis causada por la administración por 12 semanas de CCl₄. La administración de CUR sola no modificó estos parámetros.

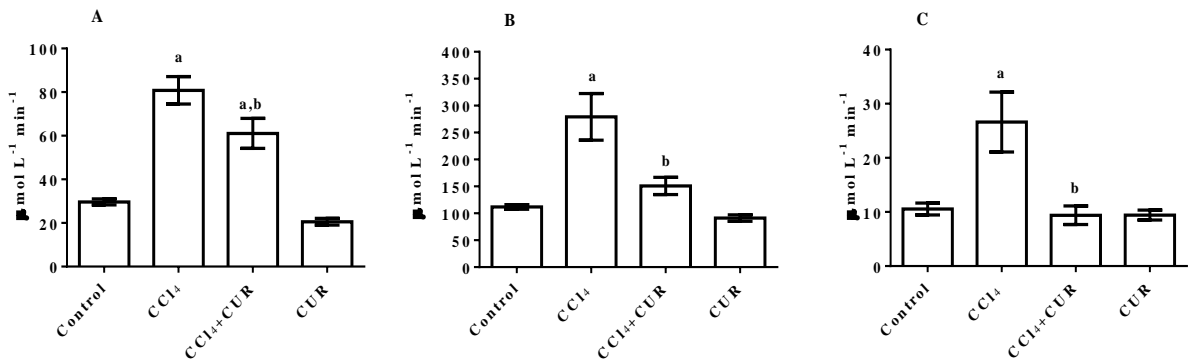


Figura 26. La curcumina (CUR) revirtió la necrosis y la colestasis en las ratas tratadas con el CCl₄. Actividades de (A) la alanina aminotransferasa; (B) la fosfatasa alcalina y (C) la γ -glutamil transpeptidasa fueron determinadas en el suero de las ratas control, las ratas tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), las ratas tratadas con CCl₄ más CUR (CCl₄ + CUR) y las ratas administradas con CUR sola (CUR). Cada barra representa el valor promedio de ocho ratas \pm error estándar (SE). **a** significa $P < 0.05$ respecto al grupo control y **b** significa $P < 0.05$ respecto al grupo de CCl₄.

6.2.2.3 La CUR restablece los niveles normales del glutatión reducido hepático.

Comparadas con el grupo control, las ratas con daño hepático de 12 semanas mostraron bajos niveles de GSH hepático, sin embargo, la CUR restauró los niveles normales de GSH en las ratas con daño hepático crónico. El grupo de ratas tratadas únicamente con CUR mostró valores normales de GSH (Figura 27).

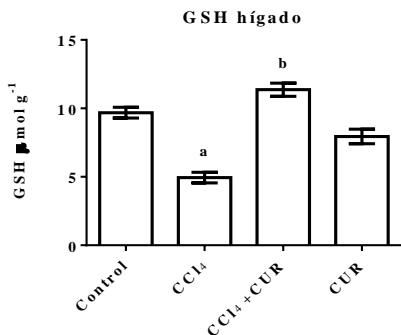


Figura 27. La curcumina (CUR) restableció los niveles del glutatión reducido (GSH) en las ratas tratadas con el CCl₄. El GSH fue determinado en tejido hepático de las ratas control, las ratas tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), las ratas tratadas con CCl₄ más CUR (CCl₄ + CUR), y las ratas administradas con CUR sola (CUR). Cada barra representa el valor promedio de ocho ratas \pm error estándar. **a** significa $P < 0.05$ respecto al grupo control y **b** significa $P < 0.05$ respecto al grupo de CCl₄.

6.2.2.4 La administración de la CUR revirtió la inflamación en las ratas con cirrosis experimental.

Como se esperaba, la administración de CCl₄ por 12 semanas aumentó los niveles proteicos de p65, IL-1 β e IL-10 4.7, 7.2 y 7.3 veces, respectivamente comparados con el grupo control. Sin embargo, la administración de la CUR al inicio de la novena semana de daño logró restablecer los niveles basales de p65, IL-1 β e IL-10 (Figura 28A).

En la Figura 28B se muestran los resultados de las inmunohistoquímicas para p65 e IL-1 β . El grupo control muestra tejido hepático normal y niveles basales de p65 e IL-1 β ; por otro lado, el grupo de CCl₄ mostró grandes áreas positivas hacia p65 e IL-1 β que coincidieron con espacios ricos en colágena y en CEHs. Interesantemente, la administración de CUR disminuyó significativamente las zonas positivas para p65 e IL-1 β , mientras que las ratas tratadas solamente con CUR no mostraron cambios (Figura 28B).

6.2.2.5 La CUR revirtió la acumulación de la colágena en las ratas con cirrosis hepática experimental previamente establecida.

El valor de la colágena total aumentó de 2.0 mg g⁻¹ de hígado en el grupo control hasta 10.2 mg g⁻¹ de hígado en el grupo tratado durante 12 semanas con CCl₄. Tras la administración de la CUR por 4 semanas, los valores de la colágena total disminuyeron significativamente comparados con el grupo control (Figura 29). Las ratas tratadas únicamente con CUR no mostraron cambios en los valores de colágena total.

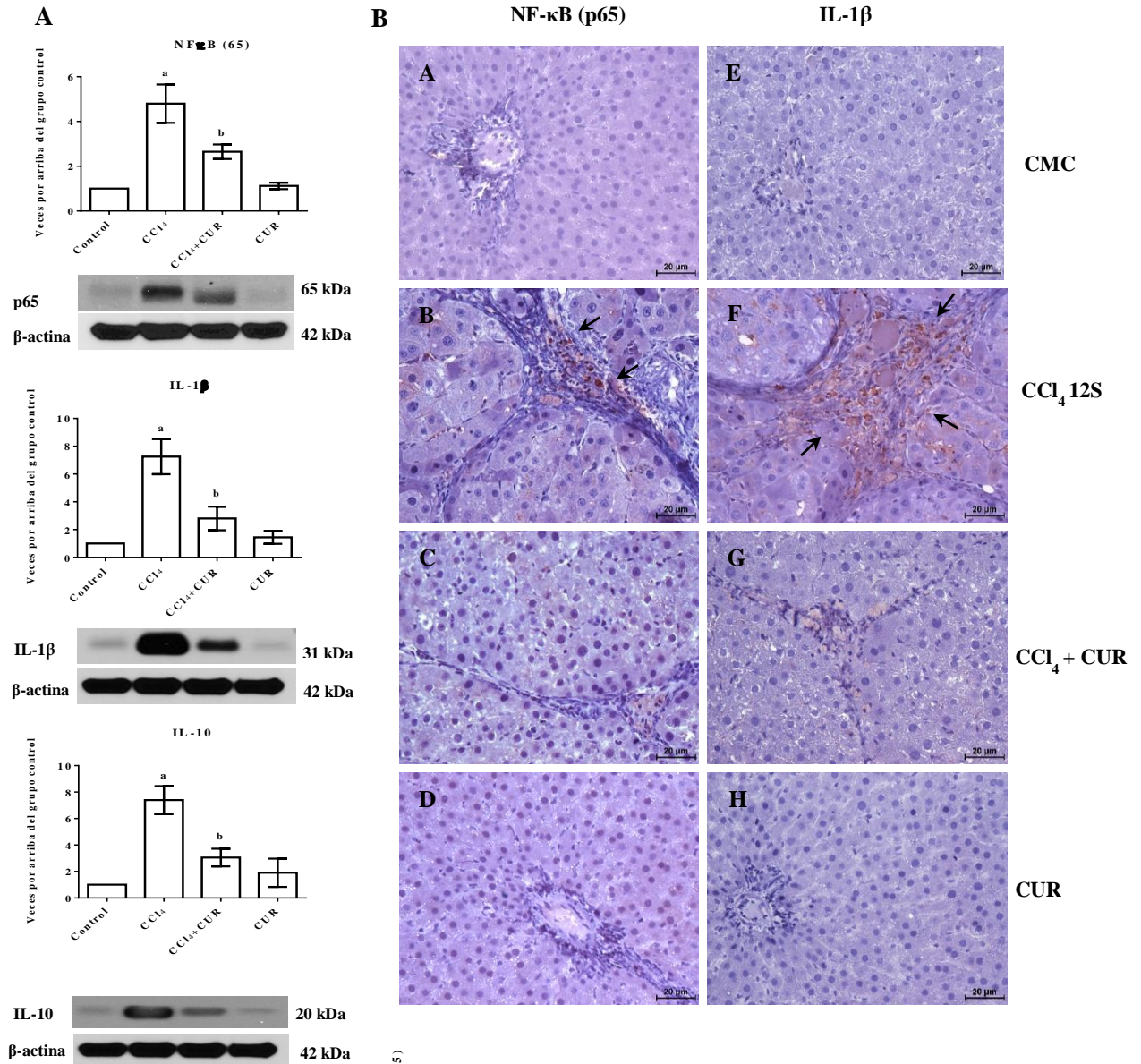
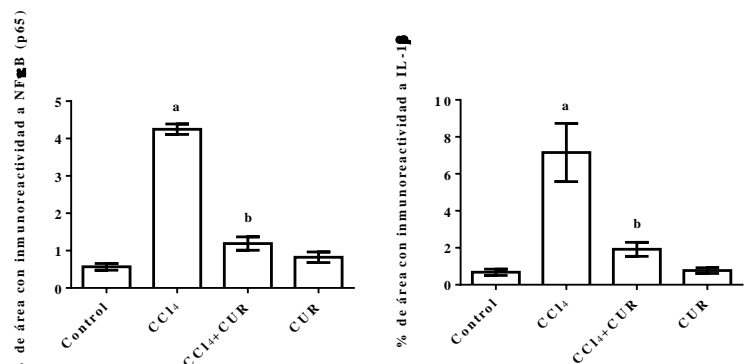


Figura 28. La curcumina (CUR) revirtió la inflamación en las ratas tratadas con el CCl₄. (A) western blot de NF-κB (p65), IL-1β e IL-10 y (B) inmunohistoquímicas para NF-κB (p65) e IL-1β de tejido hepático de las ratas control, las ratas tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), las ratas tratadas con CCl₄ más CUR (CCl₄ + CUR), y las ratas administradas con CUR sola. Se usó β-actina como control. Los valores se expresan como aumento de veces del IOD relativo normalizado a los valores del grupo control (control = 1) y en % de área con inmunoreactividad. Cada barra representa el valor promedio de tres ratas ± error estándar (SE). **a** significa $P < 0.05$ respecto al grupo control y **b** significa $P < 0.05$ respecto al grupo de CCl₄.



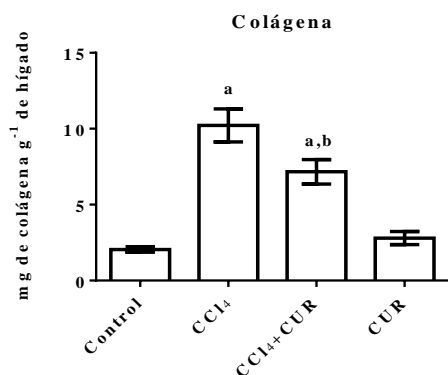


Figura 29. La curcumina (CUR) revirtió la acumulación de la colágena en las ratas tratadas con el CCl₄ por 12 semanas. La colágena total fue determinada en tejido de las ratas control, las ratas tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), las ratas tratadas con CCl₄ más CUR (CCl₄ + CUR), y las ratas administradas con CUR sola (CUR). Cada barra representa el valor promedio de ocho ratas ± error estándar. **a** significa $P < 0.05$ respecto al grupo control y **b** significa $P < 0.05$ respecto al grupo de CCl₄.

6.2.2.6 Efecto de la CUR sobre la remodelación de la matriz extracelular en las ratas tratadas con el CCl₄.

Debido a la cirrosis experimental, los niveles proteicos de CTGF y de MMP13 se elevaron 2.7 y 1.8 veces, respectivamente respecto al grupo control. En cuanto a las MMP9 y 2, la administración crónica del CCl₄ elevó su actividad 8 y 27 veces, respectivamente en comparación al grupo control. El producto natural CUR tuvo la capacidad de regresar a niveles basales los niveles proteicos del CTGF y de la MMP13, sí como la actividad de las MMP2 y 9 (Figura 30).

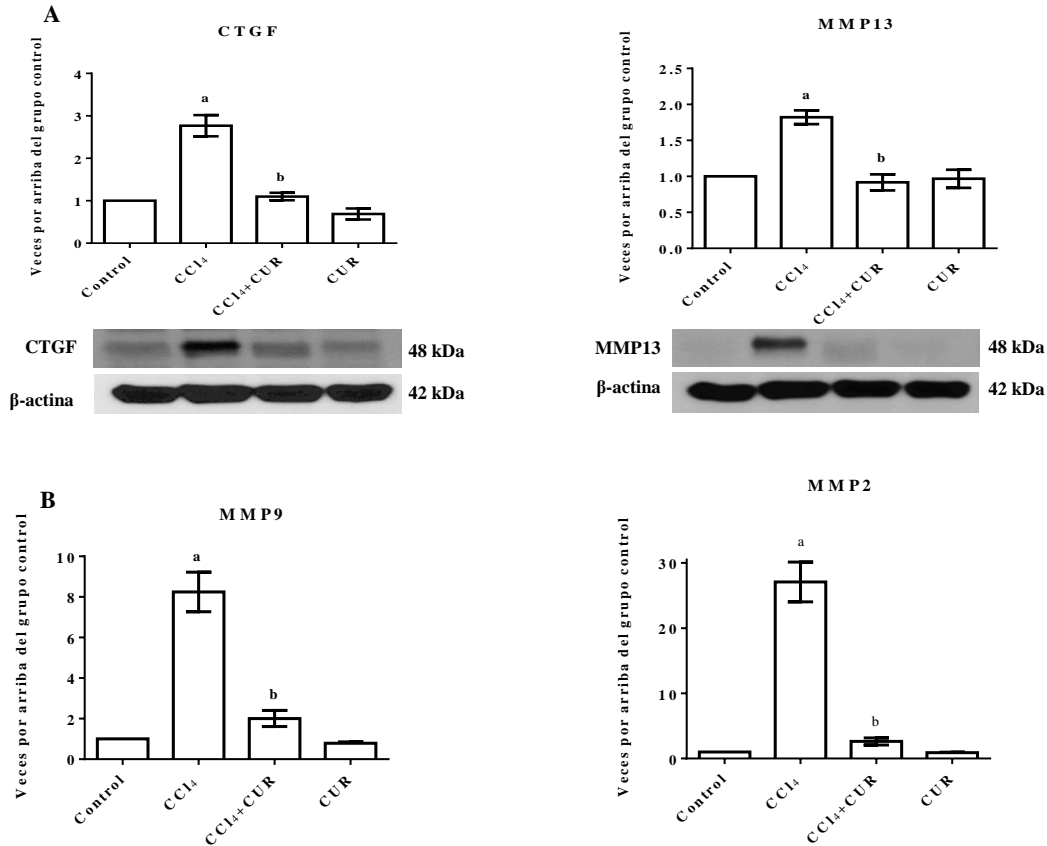


Figura 30. La curcumina (CUR) revirtió la remodelación de la matriz extracelular de las ratas tratadas con el CCl₄. Niveles de proteína de (A) CTGF y de la metaloproteasa (MMP) 13 y (B) actividad de la MMP9 y la MMP2 en muestras de tejido hepático, mediante la técnica de western blot y zimografía (C), de las ratas control, las ratas tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), las ratas tratadas con CCl₄ más CUR (CCl₄ + CUR), y las ratas administradas con CUR sola (CUR). Se usó β-actina como control. Los valores se expresan como aumento de veces del IOD relativo normalizado a los Cada barra representa el valor promedio de tres ratas ± error estándar (SE). **a** significa $P < 0.05$ respecto al grupo control y **b** significa $P < 0.05$ respecto al grupo de CCl₄.

6.2.2.7 Efecto de la CUR sobre la transdiferenciación de las CEHs.

Al término de la administración de CCl₄ por 12 semanas, los niveles proteicos de TGF- β y α -SMA se elevaron significativamente comparados con el grupo control (Figura 31A). Esto fue confirmado por inmunohistoquímica observando que en el grupo de daño existe una gran cantidad de reacción positiva hacia TGF- β y α -SMA y esto colocaliza con zonas fibróticas, ricas en colágena y en CEHs (Figura 31B). A nivel del mRNA, el hepatotóxico aumentó significativamente los niveles de α -Sma como se muestra en la Figura 31C (gel de RT-PCR punto final y gráfica de qRT-PCR).

El efecto del CCl₄, fue revertido totalmente en las ratas del grupo CCl₄ + CUR; los niveles proteicos del TGF- β y de la α -SMA regresaron a la normalidad tras la administración del flavonoide (Figura 31 paneles A y B); además, el compuesto natural fue capaz de disminuir los niveles de α -Sma en el grupo de reversión Figura 31C.

6.2.2.8 La administración de la CUR inhibe la vía JNK-Smad3.

Debido a la administración de CCl₄, la fosforilación de JNK aumentó significativamente respecto a JNK total, la cual no se vio modificada por el hepatotóxico (Figura 32). En cuanto a la proteína Smad3, ésta se evaluó a nivel de mRNA, proteína y fosforilación en el “linker”, encontrándose que en los hígados tratados con CCl₄ se favorece tanto la expresión como la fosforilación en el “linker”. El tratamiento con CUR revirtió el efecto desarrollado durante la cirrosis, regresando a valores normales la activación de JNK así como la expresión de Smad3 y su fosforilación en el “linker” por parte de JNK (Figura 32).

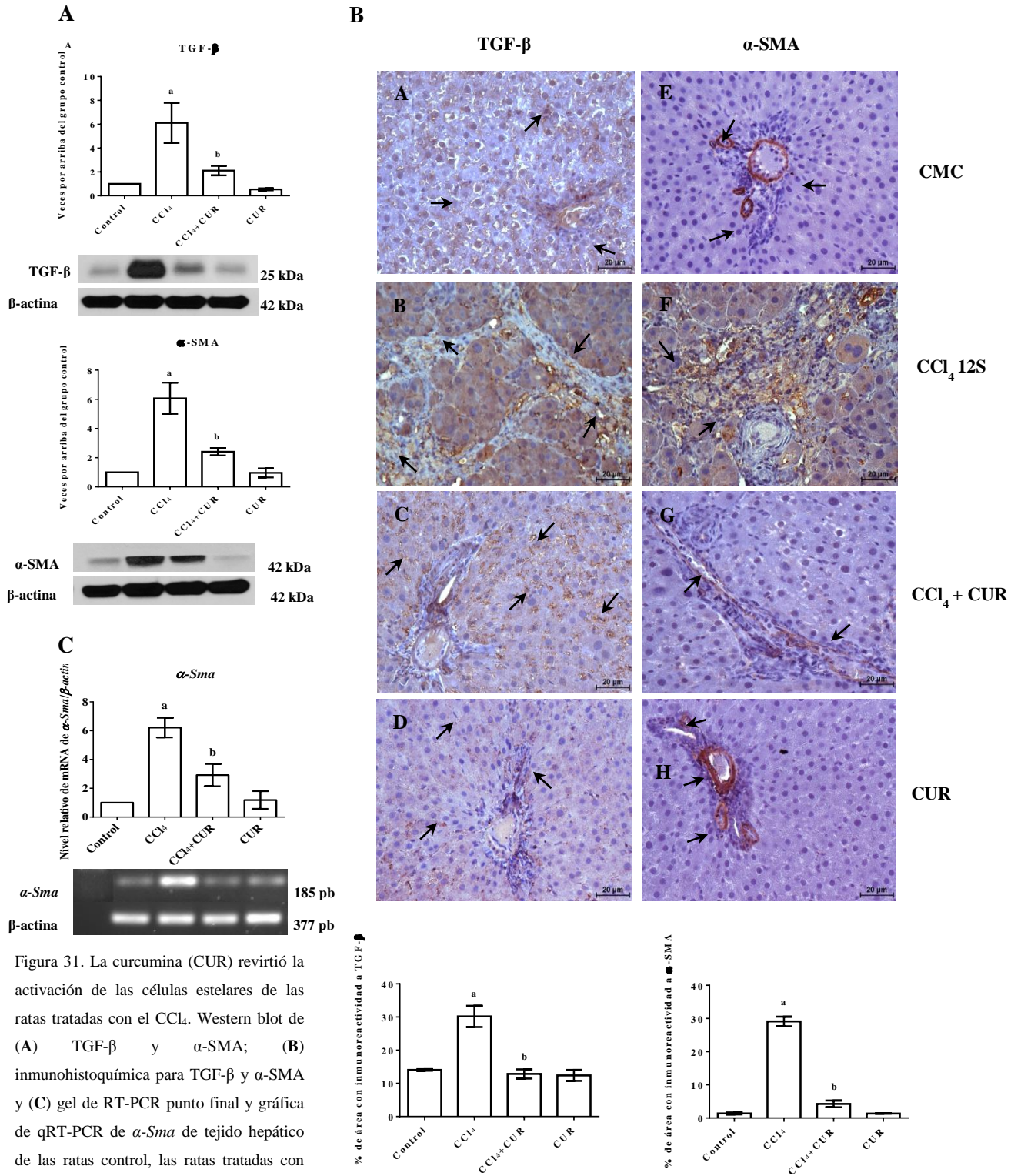


Figura 31. La curcumina (CUR) revirtió la activación de las células estelares de las ratas tratadas con el CCl₄. Western blot de (A) TGF- β y α -SMA; (B) inmunohistoquímica para TGF- β y α -SMA y (C) gel de RT-PCR punto final y gráfica de qRT-PCR de α -Sma de tejido hepático de las ratas control, las ratas tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), las ratas tratadas con CCl₄ más CUR (CCl₄ + CUR). Se usó β -actina como control. Los valores se expresan como aumento de veces del IOD relativo normalizado a los valores del grupo control (control = 1) y % de área con inmunoreactividad. Cada barra representa el valor promedio de tres ratas \pm error estándar (SE). **a** significa $P < 0.05$ respecto al grupo control y **b** significa $P < 0.05$ respecto al grupo de CCl₄.

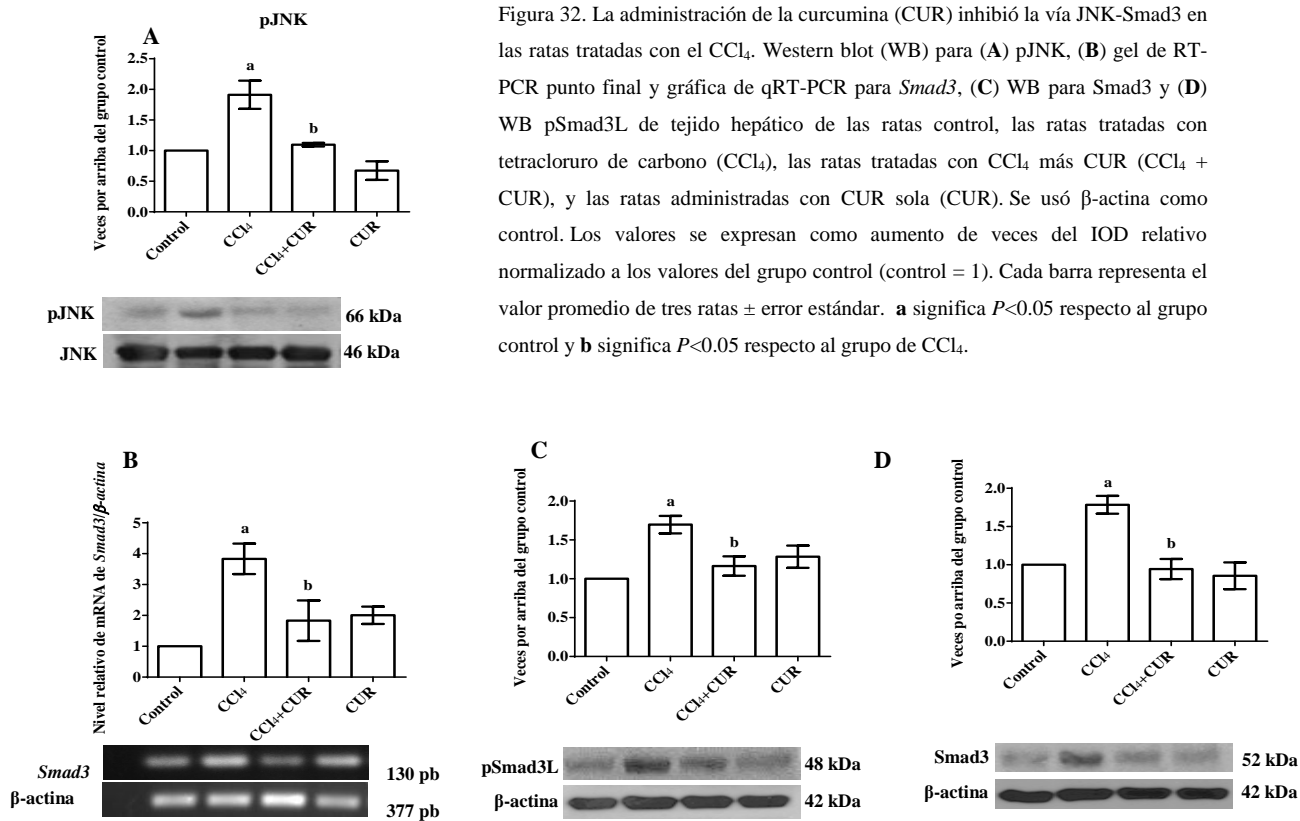


Figura 32. La administración de la curcumina (CUR) inhibió la vía JNK-Smad3 en las ratas tratadas con el CCl₄. Western blot (WB) para (A) pJNK, (B) gel de RT-PCR punto final y gráfica de qRT-PCR para *Smad3*, (C) WB para Smad3 y (D) WB pSmad3L de tejido hepático de las ratas control, las ratas tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), las ratas tratadas con CCl₄ más CUR (CCl₄ + CUR), y las ratas administradas con CUR sola (CUR). Se usó β-actina como control. Los valores se expresan como aumento de veces del IOD relativo normalizado a los valores del grupo control (control = 1). Cada barra representa el valor promedio de tres ratas ± error estándar. **a** significa $P < 0.05$ respecto al grupo control y **b** significa $P < 0.05$ respecto al grupo de CCl₄.

6.2.2.9 La CUR ejerce sus efectos antifibróticos vía Smad 7

Durante la inducción de la cirrosis por 12 semanas con CCl₄ se encontró que el valor de Smad7 disminuyó 60% respecto del grupo control.

La administración de la CUR durante las últimas 4 semanas de daño logró revertir el efecto del CCl₄ de forma significativa (Figura 33). Por otro lado, la administración de la CUR sola no modificó los valores de Smad7.

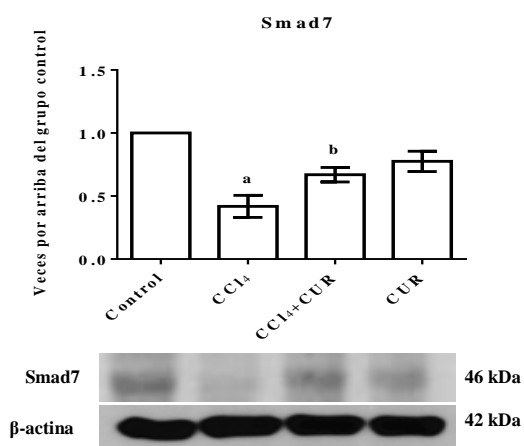


Figura 33. La administración de la curcumina (CUR) promovió la vía inhibitoria del TGF- β en las ratas tratadas con el CCl₄. Western blot para Smad7 de tejido hepático de las ratas control, las ratas tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), las ratas tratadas con CCl₄ más CUR (CCl₄ + CUR), y las ratas administradas con CUR sola (CUR). Se usó β -actina como control. Los valores se expresan como aumento de veces del IOD relativo normalizado a los valores del grupo control (control = 1). Cada barra representa el valor promedio de tres ratas \pm error estándar. **a** significa $P < 0.05$ respecto al grupo control y **b** significa $P < 0.05$ respecto al grupo de CCl₄.

6.2.2.10 La CUR restableció la capacidad biosintética del hígado en las ratas administradas con CCl₄.

La medición del glucógeno hepático es un importante parámetro de la funcionalidad hepática. Los hígados con cirrosis mostraron valores significativamente bajos de glucógeno en comparación con los hígados sanos, este hecho fue revertido por la CUR quien restauró los niveles normales de glucógeno (Figura 34).

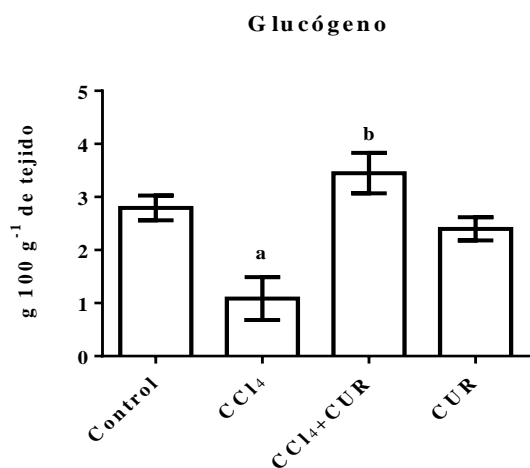


Figura 34. La curcumina (CUR) restableció la capacidad biosintética del hígado en las ratas administradas con el CCl₄. La cantidad de glucógeno en tejido hepático fue determinada en las ratas control, las ratas tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), las ratas tratadas con CCl₄ más CUR (CCl₄ + CUR), y las ratas administradas con CUR sola (CUR). Cada barra representa el valor promedio de ocho ratas \pm error estándar. **a** significa $P < 0.05$ respecto al grupo control y **b** significa $P < 0.05$ respecto al grupo de CCl₄.

7 DISCUSIÓN

7.1 Estudio del mecanismo de acción de la NAR en la prevención del daño hepático crónico inducido por el CCl₄.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto hepatoprotector de la NAR en un modelo de daño crónico inducido por CCl₄ para investigar si los efectos benéficos de la NAR están asociados con sus propiedades antioxidantes, a la inhibición de la vía del NF-κB y / o al bloqueo ya sea de la vía canónica o de la no canónica del TGF-β.

La NAR previene la necrosis hepática bloqueando al NF-κB.

Las ratas tratadas con CCl₄ mostraron un aumento en los niveles de NF-κB, IL-1β e IL-10, pero la administración de la NAR impidió este aumento. La actividad del NF-κB depende de la vía iniciada por el receptor tipo Toll (TLR), cuando este receptor es activado, se estimula el reclutamiento de una serie de proteínas que llevan a la fosforilación y activación de la cinasa de IκB (IKK) que cataliza la fosforilación del inhibidor de kappa B (IKB) que inhibe al NF-κB; esta fosforilación es necesaria para la degradación de IKB y a traslocación del NF-κB al núcleo (66).

Se ha reportado que este efecto es debido a que la NAR regula a la baja al mensajero y la proteína del TLR4 y TLR2, indispensables para la activación citosólica del NF-κB (67). Además, la NAR disminuye la translocación del NF-κB hacia el núcleo y su unión al ADN (67-69). Esto conduce a la inhibición de la expresión de interleucinas dependientes de NF-κB como la IL-1β y la IL-10 y por lo tanto, a la prevención de la inflamación.

La NAR preserva la actividad de las MMP9 y MMP2 en ratas tratadas con CCl₄.

Durante la fibrosis, las CEHs activadas y las células de Kupffer expresan MMP9 y MMP2; estas enzimas conducen a la activación del TGF-β ya que lo escinden de su depósito en la

MEC. Una vez liberado, el TGF- β favorece la actividad invasiva y proliferativa de las CEHs (35, 62, 70, 71).

En este estudio, la administración crónica del CCl₄ aumentó la actividad de la MMP9 y la MMP2, mientras que la NAR mantuvo la actividad normal de las MMPs, esto concuerda con reportes que indican que la NAR reduce los niveles del mRNA y de la proteína de MMP9 y 2, reduciendo así su actividad (72-74). Por lo tanto, parece probable que el efecto antifibrótico de la NAR pueda deberse, en parte, a la regulación a la baja de las MMP9 y 2 ya que, al inhibirlas, se reduce la probabilidad de la activación del TGF- β y su efecto en las CEHs.

La NAR inhibe la vía TGF- β -Smad3, lo que lleva a la regulación a la baja de la α -SMA, del CTGF y la Col-I

A través de pSmad3C, el TGF- β induce la expresión de α -SMA, el CTGF y la Col-1 en las CEHs activadas; la proteína α -SMA es un marcador de transdiferenciación muy específico que está estrechamente relacionado con capacidades contráctiles y de movilidad de las CEHs activadas. El CTGF es una proteína que amplifica la acción profibrogénica del TGF- β y la Col-I es uno de los principales tipos de colágena en la MEC (6, 75-77).

En este estudio, la administración del CCl₄ aumentó los niveles proteicos del TGF- β , de la α -SMA, el CTGF y la Col-I; sin embargo, la NAR preservó los niveles normales de estas proteínas. El posible mecanismo por el cual la NAR inhibe la vía del TGF- β -Smad3 es 1) una reducción en los niveles del TGF- β tisular; 2) una disminución del mRNA y/o de la proteína de Smad3, con la consecuente reducción de su fosforilación, evitando así la translocación nuclear de pSmad3C y 3) una reducción en la unión del TGF- β a su receptor específico T β RII, que conduce a la inhibición de la fosforilación de Smad3 (36, 72, 78-81).

Nuestros resultados están de acuerdo con otros reportes que indican que la inhibición de la vía del TGF- β -Smad3 por la NAR resulta en la disminución de los niveles del mRNA y la

proteína de la α -SMA, el CTGF y la Col-I (28, 36, 82), proporcionando así un mecanismo lógico para explicar las propiedades antifibróticas de la NAR.

La NAR inhibe la vía profibrogénica del TGF- β , preservando los niveles de la proteína Smad7

En contraste con la Smad3, la Smad7 ejerce un efecto inhibitor sobre la vía del TGF- β mediante la ubiquitinización y posterior degradación proteosomal del T β RI (83). Como se ha descrito por otros grupos de trabajo (84, 85), la administración de CCl₄ redujo los niveles de Smad7, pero la NAR fue capaz de prevenir este evento. Lou et al (72), reportaron que la NAR fue capaz de conservar los niveles de mRNA de Smad7 en células pancreáticas tratadas con TGF- β . La prevención de la disminución de Smad7 por la NAR, es un mecanismo valioso mediante el cual la vía TGF- β es regulada a la baja para prevenir la fibrosis.

La NAR bloquea la acción profibrogénica del TGF- β por inhibición de la MMP13

La MMP13 se expresa en las CEHs, las células de Kupffer y las células perisinusoidales; esta MMP libera citocinas unidas a MEC tal como el TGF- β , que conduce a la proliferación y migración de las CEHs (62). La administración de CCl₄ produjo un aumento en los niveles de MMP13; sin embargo, la NAR mantuvo los niveles normales de MMP13 durante el daño hepático.

La MMP13 puede ser regulada positivamente por la IL-1 β , el NF- κ B y JNK (62, 86); sin embargo, estas proteínas también fueron inhibidas por la NAR. Mediante la regulación negativa de MMP13, la NAR pudo prevenir la deposición de MEC en ratas tratadas con CCl₄.

La NAR también previno la fibrosis inducida por CCl₄ bloqueando la vía no canónica del TGF- β

Después de la administración de CCl₄, la activación de JNK se elevó, al igual que los niveles de la proteína Smad3 y su fosforilación en la región “linker”. Ha sido reportado que durante la administración de CCl₄, la pSmad3L se localiza en el núcleo de las CEHs. La fosforilación de la Smad3 en la región “linker” es catalizada por la pJNK, resultando en una rápida translocación de la pSmad3L al núcleo, en donde estimula la expresión de c-myc, un importante inductor de la proliferación de las CEHs (18, 87, 88), que a su vez conduce a una mayor producción de MEC. La NAR fue capaz de prevenir el aumento de los niveles de la Smad3 y de su fosforilación por pJNK lo que finalmente resultó en una disminución de la síntesis de la MEC.

7.2 Efecto de la NAR y la CUR en el daño hepático crónico previamente establecido por el CCl₄: reversión de la cirrosis.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la NAR y la CUR en un modelo de cirrosis previamente establecida por la administración de CCl₄ e investigar si estos productos naturales eran capaces de revertir la cirrosis.

El primer reporte que se tiene sobre la reversión de la cirrosis hepática fue de Cameron y Karunaratne en 1936 (89); desde entonces, el proceso de la reversión, las vías de señalización y las células implicadas en este fenómeno han sido ampliamente estudiadas no solo para entender lo que sucede sino para encontrar fármacos que ayuden a la cura de esta enfermedad. En algunos casos, cuando el agente etiológico de la cirrosis es retirado se presenta una reversión natural y espontánea tanto en la clínica como en modelos animales de cirrosis; dicha reversión dependerá del tipo y tiempo de exposición del agresor (90-94).

En el caso del alcoholismo es difícil que el agente etiológico sea removido por completo ya que las personas sufren dependencia, por lo que es importante desarrollar fármacos que sean capaces de provocar reversión de la cirrosis aun estando presente el agente causal. En

base a lo anterior se estudiaron los efectos de la NAR y la CUR en un modelo de cirrosis previamente establecida.

7.2.1 Efecto de la NAR y la CUR sobre la reversión de la cirrosis previamente establecida a nivel tisular.

Los resultados obtenidos muestran que los productos naturales aquí estudiados fueron capaces de revertir el efecto de la administración de CCl₄ a nivel macroscópico e histológico; sin embargo, aun permanecieron fibras de colágena remanentes que, si bien fueron de mucho menor grosor que las observadas en el grupo de daño, aun podían ser apreciadas por la tinción tricrómica de Masson. En este sentido, se ha reportado que, en la reversión espontánea, tras 366 días de recuperación aún se observan septos fibróticos residuales formados por MEC de tipo reticular; ésta MEC contiene CEHs con alta actividad de la enzima transglutaminasa, responsable de este tipo de uniones (95, 96).

Esta MEC residual está caracterizada por ser rica en elastina y representa las fibras de colágena más maduras que no fueron degradadas durante el proceso de reversión a diferencia de las fibras de colágena menos maduras (95, 96). Así, se puede decir que las fibras de colágena remanentes observadas en los grupos tratados con NAR y CUR son fibras de tipo reticular que no fueron degradadas.

7.2.2 En la reversión de la cirrosis, la NAR y la CUR disminuyeron las CEHs transdiferenciadas.

Se conoce que las CEHs son primordiales para el desarrollo de la fibrosis hepática, así como para el proceso de reversión y que su eliminación es importante para la recuperación de la fibrosis. Ha sido reportado que, durante la reversión espontánea, las CEHs pueden ser eliminadas por tres mecanismos: la apoptosis, la reversión del fenotipo tipo miofibroblasto y la senescencia. Esto tiene como resultado la disminución de las células positivas α -SMA,

aumento de la actividad colagenolítica, la disminución de las fibras de colágena y la resolución del daño hepático (91-93, 97-100).

Durante la reversión de la cirrosis previamente establecida se observó una disminución del principal marcador de transdiferenciación y activación de las CEHs (α -SMA) no solo a nivel de proteína sino también a nivel del mRNA. Esto fue corroborado por inmunohistoquímica donde la marca positiva se observó principalmente en el tejido fibrótico. Este importante efecto sobre α -SMA es un indicador de la pérdida de CEHs activadas que concuerda con reportes previos, en donde, tras el establecimiento de la fibrosis y el retiro del agente etiológico se observa un decremento de las CEHs desde el tercer día de recuperación, sin importar el tipo de daño (92-95); sin embargo, en este trabajo no fue retirado el agente procirrótico, por lo que aun durante el daño constante al hígado por el CCl₄, la NAR y la CUR fueron capaces de disminuir las células positivas para α -SMA.

Se puede sugerir que uno de los principales mecanismos por lo que la NAR y la CUR revierten la fibrosis hepática es induciendo la eliminación de las CEHs, principales productoras de colágena durante el desarrollo de la enfermedad, a pesar de que el CCl₄ se siguió administrando. Sin embargo, falta por conocer cuál es la forma por la que estos polifenoles eliminan las CEHs transdiferenciadas o si pierden su actividad por un mecanismo de reversión del fenotipo.

La principal causa descrita por la que disminuyen las CEHs en la reversión espontánea es la apoptosis (101-106) y si bien no existen reportes específicos sobre el efecto de la NAR en la inducción de la apoptosis de las CEHs, se sabe que ésta puede inducir la apoptosis en líneas celulares de cáncer ya que promueve tanto la vía intrínseca (107-111) y como la extrínseca (107, 112).

En cuanto a la CUR, sí existen reportes del efecto proapoptótico de ésta sobre las CEHs: inhibe la proliferación de las CEHs en cultivo, disminuye el número de células en fase S del

ciclo celular e incrementa las células en G2/M; también induce cambios morfológicos asociados con la apoptosis como el aumento de CEHs hipodiploides, la cromatina condensada alrededor de la membrana nuclear, los organelos condensados, los cuerpos apoptóticos y la fragmentación del ADN (113, 114). El mecanismo puede ser la inducción de la vía intrínseca y la disminución de la proteína antiapoptótica Bcl-2 a nivel de proteína y del RNAm en CEHs (44, 115-117).

Basado en estos reportes, se puede hipotetizar que uno de los mecanismos por los que la NAR y la CUR revierten la cirrosis hepática previamente establecida es la inducción de apoptosis sobre las CEHs, sin embargo, es necesario llevar a cabo los experimentos necesarios con el fin de demostrar la capacidad de estos compuestos para inducir la apoptosis en las CEHs mediante la inducción de la vía intrínseca y extrínseca.

El NF- κ B no solo está implicado en los procesos de inflamación, también tiene efectos antiapoptóticos ya que promueve a las proteínas Bcl-xl, Bcl-2, TRAF-1, TRAF-2, c-IAP1 y c-IAP2 que tienen efectos antiapoptóticos (104, 118); respecto a esto, se ha reportado que la inhibición del NF- κ B en las CEHs promueve la apoptosis y previene la fibrosis hepática (119, 120). En este estudio se encontró que la NAR revierte la elevación del NF- κ B y también de las interleucinas que regula (IL-1 β e IL-10), esto en una cirrosis previamente establecida por la administración de CCl₄. Si bien no se tienen reportes directos de que la NAR promueva la apoptosis en las CEHs por inhibir al NF- κ B, sí se sabe que este flavonoide inhibe dicho factor.

En algunos modelos de daño hepático se ha reportado que la NAR reduce el mRNA del NF- κ B y por lo tanto, también el mRNA de las proteínas de la inflamación reguladas por éste como el TNF- α , la IL-6 y la IL-1 β (34, 121). Se sabe, por experimentos en otros tejidos, que la NAR inhibe la vía del NF- κ B debido a que regula a la baja el mRNA del TLR4 y del TLR2, por lo que previene la fosforilación de IKB, reduciendo la traslocación y la unión del NF- κ B al ADN; esto tiene como resultado una pobre inducción de las proteínas

TNF- α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-12, IL-13, IL-17, IL-22, IL-23 e IL-10 (67-69, 81, 122-125).

Si bien la influencia de la NAR sobre el NF- κ B ha sido estudiada sobre todo en el ámbito antiinflamatorio, no se puede dejar de hipotetizar que este compuesto podría inhibir los efectos antiapoptóticos que ejerce el NF- κ B y, por lo tanto, reducir la supervivencia de las CEHs y así favorecer la reversión de la cirrosis hepática.

Un hecho bien conocido es que la CUR posee efectos antiinflamatorios y esto es debido a que inhibe a la vía del NF- κ B en diferentes puntos. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que tras la administración crónica del CCl₄, los niveles del NF- κ B, la IL-1 β y la IL-10 aumentaron considerablemente, pero la CUR revirtió este efecto.

Se sabe que la CUR tiene la capacidad de disminuir la activación del NF- κ B, así como su traslocación al núcleo en un modelo de daño hepático agudo con CCl₄ (41). Lo anterior es debido a que la CUR reduce el mRNA del mismo NF- κ B, de los receptores TLR2, TLR4 y del adaptador MyD88 en CEHs activadas, llevándolas hacia la apoptosis (126-128). Otro efecto de la CUR sobre el NF- κ B es que el polifenol inhibe la activación del IKK y por lo tanto, la fosforilación de IKB, así como su degradación, que deriva en la nula fosforilación de p65, su traslocación al núcleo y su acetilación. Esto lleva a que el efecto positivo del NF- κ B sobre IAP1, IAP2, XIAP, Bcl-2, Bcl-xl y TRAF1, que son moléculas antiapoptóticas, sea eliminado (129).

Por lo anterior, se puede decir que la inhibición del NF- κ B por parte de la NAR y la CUR no solo disminuye la inflamación (efecto sobre la IL-1 β y la IL-10), sino también los efectos antiapoptóticos de este factor en las CEHs y da otra explicación del por qué las CEHs disminuyen con el tratamiento con la CUR, pero se necesita corroborar dicha hipótesis para conocer si este es otro mecanismo de influencia de los productos naturales sobre la disminución de las CEHs.

Además de la inducción de la apoptosis, se ha descrito un segundo mecanismo por el que la fibrosis hepática puede ser revertida: la reversión del fenotipo tipo miofibroblasto. Durante la reversión espontánea existen ciertas CEHs que escapan de la apoptosis y en vez de ser eliminadas adquieren un fenotipo intermedio entre CEHs quiescentes y activadas denominadas CEHs inactivas (iCEHs) (91, 99). Se tienen reportes de que la inducción de la expresión de genes asociados a la síntesis de lípidos en las CEHs activadas puede ser una buena estrategia para revertir su fenotipo, por ejemplo, el receptor gamma activado por el proliferador del peroxisoma (PPAR- γ) (120, 102, 130-135). En este sentido, se cuenta con reportes de que la NAR tiene efectos sobre el PPAR- γ , por ejemplo, aumenta la proteína del PPAR- γ y promueve su actividad ya que activa su dominio de unión a ligando (LBD), sugiriendo que sirve como un ligando natural (136-138). Sabiendo que la NAR mejora su actividad y es un ligando natural del PPAR- γ , quizás el flavonoide pueda inducir la actividad de esta proteína en las CEHs transdiferenciadas que han escapado a la apoptosis e inducir la reversión de su fenotipo hacia uno intermedio.

En cuanto a la CUR, se tiene evidencia de que puede promover un fenotipo tipo adipocito en las CEHs cuando éstas son incubadas con el producto natural, ya que incrementa el número y tamaño de las gotas de lípidos, tan características de su estado quiescente y aumenta los triglicéridos y las proteínas relacionados con la reversión del fenotipo como C/EBP α , PPAR- γ , RXR α y RAR β (139). Además, el polifenol presenta diferentes mecanismos por los cuales puede aumentar la actividad del PPAR γ en las CEHs activadas (116, 117, 139-142, 144).

En general, los efectos de la CUR al activar el PPAR- γ resultan en: 1) la inhibición de la proliferación de las CEHs ya que se favorece la expresión de proteínas de detención del ciclo celular como p21^{WAF1} y p^{27Kip1}, pero disminuyen las ciclinas D1, D2 y E que promueven el ciclo celular. 2) disminución de la unión del NF- κ B al ADN, 3) la inhibición de la vía del TGF- β por la disminución de los niveles de mRNA y proteína de los receptores T β RI y T β RII y la reducción de la síntesis de α -SMA por parte de las CEHs y 4) la inducción de la enzima glutamato-cisteína ligasa (GCL), que participa en el paso limitante

de la síntesis de novo del GSH y 5) la conversión del fenotipo activado hacia el fenotipo iCEHs (116,117, 139-144).

Un tercer mecanismo por el que la NAR y la CUR pueden reducir el número de células positivas a α -SMA y, por lo tanto, revertir la fibrosis es la inducción de la senescencia (100, 145).

Si bien no se cuentan con estudios del efecto de la NAR sobre la senescencia en la fibrosis hepática ni en otro sistema, se tiene información de la CUR en la inducción de senescencia en las CEHs. La CUR promueve la expresión de marcadores de senescencia como p16, p21, Hmga1 y SA- β -gal en CEHs activadas; también las detiene en el punto G0/G1 del ciclo celular ya que disminuye la actividad de la telomerasa y disminuye los complejos D1/CDK4 y E1/CDK6 que promueven la transición G0-S del ciclo celular; además la CUR induce senescencia de las CEHs activadas mediante la inducción del p53, el mayor mediador de la detención del ciclo celular y la senescencia y esto es mediado por PPAR- γ (146).

Además de inducir senescencia en las CEHs, la CUR también propicia el reclutamiento de células Natural Killer (NK) hacia la proximidad de estas células senescentes dentro del tejido fibrótico, provocando su eliminación a través de la exocitosis de gránulos que se ve favorecida tras el tratamiento con CUR (147).

Como se puede observar, el mecanismo por el que la NAR y la CUR disminuyen las células CEHs transdiferenciadas y positivas hacia α -SMA puede ser cualquiera de los aquí descritos, lo que significa que estos compuestos tienen múltiples frentes para revertir la fibrosis hepática. La reducción o eliminación de las CEHs es indispensable para detener la producción de proteínas de la MEC como la Col-1 y es un hecho claramente identificado durante la reversión espontánea.

7.2.3 La NAR y la CUR inducen la remodelación y la eliminación de la matriz extracelular durante la reversión hepática previamente establecida.

Si bien la desaparición de las CEHs impide la síntesis y acumulación descontrolada de nueva MEC, esto no explica la eliminación de la MEC formada hasta antes de la administración de la NAR y la CUR. Además, el mantenimiento de la cantidad de MEC es un proceso dinámico, entonces si la síntesis de MEC disminuye y se mantiene constante la degradación, el resultado final es la disminución de la fibrosis. Es por ello que se deben estudiar proteínas como las MMPs, el CTGF y la colágena, proteínas relacionadas con la síntesis y la degradación de la MEC.

En el estudio presente, se encontró que la administración de CCl₄ por 12 semanas, causó un aumento significativo de las proteínas MMP13 y CTGF, así como de la actividad de las MMP2 y MMP9, de la síntesis de colágena total y de la Col-1. Efectivamente, la administración de la NAR y la CUR regresó a la normalidad estos parámetros de remodelación de la MEC.

Se conoce que, durante el daño hepático, la actividad colagenolítica de las MMPs es bloqueada por los TIMPs que son expresados por las CEHs activadas en humanos y en modelos murinos de fibrosis, por lo tanto, la colágena se acumula en el tejido hepático. Sin embargo, durante la reversión espontánea tras el retiro del agente dañino, los niveles de los TIMPs disminuyen considerablemente y las MMPs pueden ejercer su efecto retirando la colágena acumulada (92, 95-97, 101, 103-106).

En este estudio, aunque la MMP13 aumentó aumentada durante el daño inducido por 12 semanas con CCl₄, se presume que ésta no pudo ejercer su efecto colagenolítico debido a la inhibición de los TIMPs. Ya que los inhibidores son producidos por las CEHs y como la NAR y la CUR disminuyeron estas células, se especula que los TIMPs disminuyeron y la MMP13 pudo entonces ayudar en la remodelación de la MEC durante la reversión de la

fibrosis. Sin embargo, estas hipótesis deben ser confirmadas para esclarecer el efecto de la NAR y la CUR sobre la MMP13.

Durante el daño hepático, las CEHs generan MMP2 y MMP9 que degradan a la MEC basal, facilitando el remplazo de esta MEC original por una matriz intersticial de alta densidad, además promueven la liberación de TGF- β de la MEC (63, 103). En nuestro modelo, la actividad de estas dos MMPs se vio incrementada tras 12 semanas de la administración de CCl₄, confirmando lo observado en otros reportes (92, 96).

Se tiene conocimiento que durante los primeros 28 días de reversión espontánea, la actividad de estas MMPs permanece aumentada, aunque se haya retirado el agente hepatotóxico y que tras 84 días de reversión se sigue observando su actividad, no es sino hasta 366 días después que ésta desaparece (96). El aumento de la actividad de estas MMPs durante el daño hepático, mantenimiento en las primeras fases de reversión y posterior disminución es ampliamente reportado por otros grupos de trabajo (148-151). Esto sugiere que la degradación de la mayor parte de la MEC durante la reversión de la fibrosis está dada por las MMP9 y MMP2 y al final del proceso de reversión y degradación de la MEC, éstas regresan a un estado de actividad colagenolítica normal (96, 149, 151).

Como se mencionó, se puede explicar que posterior a la administración de la CUR y la NAR se observó una actividad normal de la MMP9 y la MMP2; esto correlaciona con lo que pasa al final de la reversión espontánea. Aunque en el presente experimento no se generó una reversión espontánea sino una reversión aun con la presencia del agente hepatotóxico, el efecto de la NAR y la CUR sobre las MMPs es similar al observado tras una reversión espontánea y en menor tiempo.

Otro resultado obtenido en este trabajo fue que la NAR y la CUR disminuyeron a niveles basales el CTGF, proteína que fue altamente inducida durante el daño hepático con CCl₄.

El CTGF es secretado por las CEHs posterior a su activación y funciona como un mediador río abajo del TGF- β estimulando la producción de proteínas de la MEC como fibronectina, Col-1, laminina y glicosaminoglicanos. El CTGF también estimula la vía canónica del TGF- β al mejorar la unión de éste a su receptor, regulando negativamente a la Smad7 (inhibitoria del TGF- β) e impedir que el antagonista natural del TGF- β , la proteína BMP, se una a su receptor (152, 153). En el estudio presente, la NAR y la CUR fueron capaces de revertir el aumento del CTGF, la disminución de Smad7 y la acumulación de la MEC presentes en la cirrosis inducida por CCl₄.

Debido a que no se tienen estudios sobre los efectos de la NAR sobre el CTGF, es pertinente realizar estudios posteriores para elucidar el mecanismo preciso por el que la NAR reduce los niveles del CTGF durante la reversión de la fibrosis hepática.

Respecto a la CUR, se ha reportado que ésta reduce los niveles de mRNA y la proteína del CTGF en el daño hepático inducido por el CCl₄ (46). Estudios en las CEHs transdiferenciadas demuestran que la CUR de forma dependiente de la dosis causa reducción del mRNA, de los niveles la proteína y de su secreción, así como la reducción de la actividad del promotor en el gen del CTGF (154).

El hecho de que la NAR y la CUR fueron capaces de revertir los efectos del CTGF, tiene un efecto muy importante sobre la síntesis de proteínas de la MEC y esto pudo ayudar a la reversión de la cirrosis previamente establecida ya que se promovió el retorno hacia el equilibrio entre la síntesis y la degradación de la MEC, balance que se ve alterado durante un proceso fibrótico, derivando en cirrosis.

Hablando de los niveles de la colágena total y la Col-1 registrados durante este experimento, se observó que estos parámetros se elevaron considerablemente tras la administración de CCl₄ por 12 semanas. Sin embargo, los productos naturales estudiados, NAR y CUR, pudieron revertir la síntesis y la acumulación de esta proteína de matriz, ya que éstos promovieron: 1) la eliminación de las CEHs, principales productoras de MEC y

2) la reducción de CTGF, implicado en la síntesis de MEC. Estos efectos en conjunto llevaron a la casi total remoción de las fibras de colágena existentes.

Que la NAR y la CUR sean capaces de restablecer el equilibrio entre la síntesis y la degradación, es una característica muy importante que debe ser estudiada para conocer el mecanismo por el cual se lleva a cabo este efecto, así, este estudio deja abiertas muchas posibilidades de investigación en torno a los efectos de la NAR y la CUR en la reversión de la cirrosis previamente establecida.

Con base en los datos anteriores se puede concluir que la NAR y la CUR promueven la remodelación de la MEC durante la reversión del daño hepático experimental inducido por CCl₄.

7.2.4 Efecto de la NAR y la CUR sobre la vía canónica y no canónica del TGF- β -Smads.

Se conoce que el TGF- β es una proteína implicada en la transdiferenciación de las CEHs de forma parácrina y luego autócrina cuando éstas empiezan a secretarlo. El TGF- β ejerce sus efectos profibrogénicos y de proliferación a través de la vía canónica que implica la fosforilación de las Smads en su carboxilo terminal, induciendo la Col-1, el CTGF, los TIMPs y la α -SMA. Por otro lado, la vía no canónica es activada por las MAPKs que fosforilan a las Smads, pero en el dominio “linker” aumentando la expresión de los agentes proliferativos y de supervivencia como c-myc y PAI-1 (11-18).

En términos generales, el CCl₄ aumentó considerablemente la activación de estas dos vías ya que los niveles del TGF- β , la α -SMA y la Smad3 fueron incrementados, así como la fosforilación de la Smad3 en el “linker” y por lo tanto, su activación. Por otro lado, la NAR y la CUR tuvieron la capacidad de reducir estos marcadores. En el caso de la α -SMA y la Smad3 también fueron disminuidos sus mRNAs.

En otros tejidos, la NAR tiene efectos sobre la vía del TGF- β como: 1) la reducción en los niveles de TGF- β tisular (mRNA y proteína); 2) la disminución del mRNA y/o la proteína de la Smad3, con la consecuente reducción de su fosforilación, evitando así la translocación nuclear de la pSmad3C y 3) reducción de la unión del TGF- β a su receptor específico T β RII, que conduce a la inhibición de la fosforilación de la Smad3, esto en cultivo de CEHs y en diferentes tejidos como páncreas, pulmón y piel, pero no se han estudiado los efectos del flavonoide en un modelo de reversión de la cirrosis como es el que aquí se presentó (36, 72, 78-81).

En cuanto a la CUR, sus efectos sobre el TGF- β se pueden resumir como sigue: 1) reducción de mRNA y la proteína de los receptores a T β R-I y T β R-II por activación del PPAR γ , 2) disminución de los niveles de mRNA y de proteína del TGF- β , 3) inhibición del aumento del mRNA y de la proteína de las Smad2 y Smad3, así como su fosforilación en la vía canónica y 4) reducción del mRNA y la proteína de la Col-1, la α -SMA, el CTGF y la fibronectina, en modelos de prevención de daño hepático y reversión en la ligadura del conducto biliar común, pero no en un modelo de reversión de cirrosis (41, 42, 45, 154-157).

El efecto inducido sobre la vía no canónica por parte de los productos naturales tiene como resultado la disminución de la activación de JNK y de la fosforilación en el “linker” de la Smad3 por parte de la MAPK. Numerosos estudios indican que la NAR tiene la capacidad de disminuir la actividad/fosforilación de JNK y de otras MAPK implicadas en la vía no canónica (75, 128, 158, 159), esto corrobora lo obtenido en este estudio respecto a que la NAR redujo los niveles de pJNK durante la reversión de la fibrosis hepática. Este efecto sobre JNK puede ser debido a que la NAR inhibe al PDGF, citocina ampliamente conocida por activar a JNK mediante su receptor en las CEHs (160-162). Así, la NAR es capaz de reducir la fosforilación en el “linker” de la Smad3, adicionalmente, el compuesto redujo el mRNA de la *Smad3*, disminuyendo la proteína disponible para ser fosforilada.

La activación de JNK también se vio reducida por la CUR y esto pudo ser debido a que el polifenol tiene los siguientes efectos sobre la vía PDGF-JNK e hígado in vivo e in vitro: 1)

disminuye los niveles de PDGF a nivel de mensajero y de proteína, 2) reduce la expresión del receptor a PDGF, el PDGF- β R, 3) inhibe la fosforilación de la tirosina cinasa del PDGF- β R que presenta cuando está activo y 4) bloquea la fosforilación de JNK (41,141, 163).

Con relación a lo anterior, la CUR pudo tener influencia sobre la inhibición de la vía no canónica del TGF- β -Smads y reducir también la fosforilación en el “linker” de la Smad3. Sin embargo, la CUR no solo reduce la fosforilación en el “linker” de Smad3, también al mensajero y la proteína de esta Smad, aumentando su efecto inhibitorio sobre dicha vía. Estos mecanismos explican el potente efecto antifibrótico de este polifenol.

7.2.5 Estimulación de la Smad7 por la NAR y la CUR puede inhibir la vía canónica del TGF- β .

Como se mencionó anteriormente, la Smad7 tiene un efecto inhibitorio de la vía del TGF- β ya que ubiquitina al receptor T β RI para ser después degradado en el proteosoma. Tras la inducción de cirrosis con CCl₄ por 12 semanas, los niveles de la Smad7 se reducen considerablemente, por lo que, puede que exista una desregulación y elevación de la vía del TGF- β sin tener ningún sistema de freno; esto es un factor muy importante para el desbalance de la síntesis y degradación de la MEC durante el proceso fibrótico. Interesantemente, el tratamiento con NAR o CUR logra elevar los niveles de esta proteína, hecho que puede ayudar al desarrollo de la reversión del daño hepático y pueda explicar en gran medida los resultados obtenidos en este trabajo, ya que la Smad7 es un factor muy importante en la homeostasis de la vía del TGF- β .

Algunos efectos derivados de la inhibición de la vía canónica del TGF- β por la Smad7 son la reducción de los niveles del mismo TGF- β , así como la disminución de la α -SMA, la Col-1 y el CTGF. Estos efectos pueden conducir a la desactivación de las CEHs ya que se reduce la autoestimulación por el TGF- β .

Si bien se cuenta con algunos reportes sobre el efecto benéfico de estos productos naturales sobre el daño hepático (45,72, 155), es indispensable incrementar las investigaciones sobre el efecto que produce la inducción de la Smad7 ya que podría ser un importante blanco terapéutico para propiciar la reversión de la cirrosis hepática.

7.2.6 Efecto antioxidante de la NAR y la CUR.

El efecto antioxidante de la NAR y de la CUR ha sido ampliamente estudiado, sin embargo, estos compuestos también pueden funcionar induciendo antioxidantes endógenos como el GSH; éste fue reducido durante el desarrollo de la fibrosis hepática, pero fue restablecido tras la reversión del daño.

La NAR puede mejorar los niveles de GSH ya que: 1) aumenta los niveles de la enzima GCL, implicada en el paso limitante de la síntesis de GSH y 2) por la regulación positiva de la enzima GR que regresa a su forma reducida al GSH oxidado (9). Por otro lado, la CUR también tiene efectos sobre el GSH porque 1) incrementa la actividad de la GCL y 2) induce la expresión de las dos subunidades de la GCL (GCLc y GCLm) en CEHs (157).

7.2.7 La NAR y la CUR normalizan los marcadores bioquímicos de daño hepático y el glucógeno.

Como resultado de la administración crónica de CCl₄, los marcadores bioquímicos de daño hepático ALT, FA y γ -GTP fueron elevados considerablemente, denotando colestasis y necrosis en el hígado cirrótico. Además, el glucógeno fue reducido varias veces con respecto al grupo control, por lo que, se contaba con un órgano poco funcional. La administración de NAR o CUR pudo revertir estos resultados indicando que, como resultado final de la reversión inducida por los productos naturales, se obtuvo un hígado sano y funcional.

8 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo en el que se evaluó el mecanismo de acción de la NAR en la prevención de un daño hepático experimental y los efectos de la NAR y la CUR en la reversión de la cirrosis previamente establecida, llevan a las siguientes conclusiones:

Modelo de prevención

- 1.- La NAR previno el daño hepático crónico experimental debido a que es un antioxidante y fue capaz de combatir el estrés oxidativo en dicho modelo.
- 2.- La NAR no solo tiene propiedades antioxidantes, también es un inmunomodulador ya que previno la inflamación causada por el CCl₄.
- 3.- El flavonoide es capaz de prevenir el desarrollo de la fibrosis por inhibir vías profibrogénicas como la del TGF- β -Smad3 y la de JNK-Smad3.
- 4.- La NAR puede ser una opción terapéutica en la prevención de la cirrosis en humanos, previos estudios pertinentes de la toxicidad de la misma.

Modelo de reversión

- 1.- La NAR y la CUR fueron capaces de revertir la necrosis y la colestasis.
- 2.- El estrés oxidativo fue revertido ya que la NAR y la CUR lograron revertir el aumento de la PL y la disminución del GSH.
- 3.- Los productos naturales NAR y CUR revirtieron la pérdida de la función biosintética del hígado.
- 4.- La fibrosis fue revertida por la NAR y la CUR debido a que restablecen los niveles normales de marcadores fibróticos.
- 5.- La NAR y la CUR tuvieron efectos antiinflamatorios en el modelo de reversión de la cirrosis previamente establecida.
- 6.- La NAR y la CUR inhibieron y revirtieron el efecto profibrogénico de las vías TGF- β -Smad3 y la de JNK-Smad3.

7.- La NAR y la CUR pueden ser utilizadas en tratamientos de reversión de la cirrosis previos estudios de seguridad.

9 PERSPECTIVAS

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, quedan algunas incógnitas sobre los efectos de la NAR y la CUR en la prevención de la cirrosis previamente establecida, es por ello que se plantea:

- 1.- Elucidar la forma por la cual la NAR y la CUR reducen la marca positiva para la α -SMA en las CEHs.
- 2.- Estudiar el posible efecto proapoptótico de estos productos naturales sobre las CEHs y el mecanismo por el que se desarrolla.
- 3.- Conocer si la NAR y la CUR inducen la senescencia en las CEHs como un mecanismo de la reversión de la cirrosis hepática in vivo.
- 4.- Investigar la posible implicación de la NAR y la CUR en la reversión del fenotipo de las CEHs activadas hacia un fenotipo intermedio y si esto interviene en el efecto de estos polifenoles en la reversión de la cirrosis.
- 5.- Conocer el efecto de la NAR y la CUR sobre los TIMPs y cómo esto induce a la reversión de la cirrosis hepática.
- 6.- Conocer el mecanismo por el que la NAR y la CUR promueven la reestructuración de la MEC.

10 REFERENCIAS

1. Tortora, G. y Derrickson, B. (2011). El aparato digestivo. En *Principios de Anatomía y Fisiología* (11ª edición). Editorial Médica Panamericana. España. 924-927.
2. Ganong, W.F. (2006). Regulación de la función gastrointestinal. En *Fisiología Médica* (18ª edición). Editorial El Manual Moderno. Madrid, España. 544-545.
3. Pellicoro, A., Ramachandran, P. e Iredale J.P. (2012). Reversibility of liver fibrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair*. **5** (Suppl 1): 26-29.
4. Bataller, R. y Brenner, D.A. (2005). Liver fibrosis. *Science in Medicine*. **115**: 209-218.
5. Muriel, P. (2017). The liver: general aspects and epidemiology. En *Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants*. Muriel, P. Elsevier, Waltham MA. 3-16.
6. Kisseleva, T. y Brenner, D.A. (2007). Role of hepatic stellate cells in fibrogenesis and the reversal. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. **22** (Suppl 1): 73-78.
7. Casas-Grajales, S. y Muriel, P. (2017). Antioxidant, antiinflammatory, and antifibrotic properties of quercetin in the liver. En *Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants*. Muriel, P. Elsevier, Waltham MA. 653-674.
8. Fukui, H. (2017). Cytokines in hepatic injury. En *Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants*. Muriel, P. Elsevier, Waltham MA. 341-350.
9. Friedman, L.S. (2003). Liver fibrosis from bench to bedside. *Journal of Hepatology*. **38**: 38-57.

10. Muriel, P., Fernández-Martínez, E. y Montes, S, (2017). Complications of cirrhosis: introduction. En *Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants*. Muriel, P. Elsevier, Waltham MA. 653-674.
11. Pollard, T. D., y Earnshaw, W. C. (2008). Signaling Mechanisms. En *Cell Biology*. Elsevier, China. 433-507.
12. Hernández-Aquino, E. y Muriel, P. (2017). Naringenin and the liver. En *Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants*. Muriel, P. Elsevier, Waltham MA. 633-651.
13. Hill, S. C. (1999). Molecules in focus: the Smads. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. **31**: 1249-1254.
14. Miyazawa, K., Shinozaki, M., Hara, T. *et al.* (2002). Two major Smad pathways in TGF- β superfamily signaling. *Genes to Cell*. **7**: 1191-1204.
15. Guo, X. y Shi-You, Chen. (2012). Transforming growth factor- β and smooth muscle differentiation. *World Journal of Biological Chemistry*. **3**: 41-52.
16. Matsuzaki, K. (2012). Smad phosphoisoform signals in acute and chronic liver injury: similarities and differences between epithelial and mesenchymal cells. *Cell and Tissue Research*. **347**: 225-243.
17. Matsuzaki, K. (2011). Smad phosphoisoform signaling specificity: the right place at the right time. *Carcinogenesis*. **11**: 1578-588.
18. Yoshida, K. y Matzuzaki, K. (2012). Differential regulation of TGF- β /Smad signaling in hepatic stellate cells between acute and chronic liver injuries. *Frontiers in Physiology*. **3**: 1-7.

- 19.** Muriel, P., Ramos-Tovar, E., Montes-Páez, E., *et al.* (2017). Experimental models of liver damage mediated by oxidative stress. En *Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants*. Muriel, P. Elsevier, Waltham MA. 529-542.
- 20.** Pérez-Tamayo, R. (1983). Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ and adequate model of human cirrhosis? *Hepatology*. **1**: 112-120.
- 21.** Weber, L. W. D., Meinrad, B. y Stampfl, A. (2003). Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Critical Reviews in Toxicology*. **33**: 105-136.
- 22.** Manibusan, M. K., Odin, M. y Eastmond, D. A. (2007). Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review. *Journal of Environmental Science and Health Part C*. **3**: 185-209.
- 23.** Brattin, W. J., Glende, E. A. Jr. y Recknagel, R. O. (1985). Pathological mechanisms in carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Journal of Free Radicals in Biology*. **1**: 27-38.
- 24.** Muriel, P. (2007). Some experimental models of liver damage. En *Hepatotoxicity: from Genomics to in Vitro and in Vivo Models*. Sahu, S.C. John Wiley and Sons. Inglaterra. 119-123.
- 25.** Feng-Lin, Y., Tzu-Hui, W., Liang-Tzung, L. *et al.* (2009). Naringenin-loaded nanoparticles improve the physicochemical properties and the hepatoprotective effects of naringenin in orally-administered rats with CCl₄-induced acute liver failure. *Pharmaceutical Research*. **26**: 893-902.
- 26.** Erlund, I. (2004). Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*. **24**: 851-874.

27. Hernández-Aquino E. (2013). Evaluación de los posibles efectos hepatoprotectores de la naringenina en un daño hepático experimental. Tesis de maestría. Departamento de Farmacología, CINVESTAV-IPN. México, D.F. México. 67 p.
28. Lee, M.H., Yoon, S. y Moon, J.O. (2004). The flavonoid naringenin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **27**: 72-76.
29. Yen, F.L., Wu, T.H., Lin, L.T. *et al.* (2009). Naringenin loaded nanoparticles improve the physicochemical properties and the hepatoprotective effects of naringenin in orally-administered rats with CCl₄-induced acute liver failure. *Pharmaceutical Research*. **26**: 893-902.
30. Jayaraman, J. y Veerappan, M. (2009). Potential beneficial effect of naringenin on lipid peroxidation and antioxidant status in rats with ethanol-induced hepatotoxicity. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **61**: 1383-1390.
31. Prabu, S.M., Shagirtha, K. y Renugadevi, J. (2011). Naringenin in combination with vitamins C and E potentially protects oxidative stressmediated hepatic injury in cadmium-intoxicated rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. **57**: 177-185.
32. Pari, L. y Amudha, K. (2011). Hepatoprotective role of naringin on nickelinduced toxicity in male Wistar rats. *European Journal of Pharmacology*. **650**: 364-370.
33. Wang, J., Yang, Z., Lin, L. *et al.* (2012). Protective effect of naringenin against lead-induced oxidative stress in rats. *Biological Trace Element Research*. **146**: 354-359.
34. Jayaraman, J., Antony, V., Jesudoss, S. *et al.* (2012). Antiinflammatory role of naringenin in rats with ethanol induced liver injury. *Toxicology Mechanisms and Methods*. **22**: 568-576.

- 35.** Hermenean, A., Ardelean, A., Stan, M. *et al.* (2014). Antioxidant and hepatoprotective effects of naringenin and its β -cyclodextrin formulation in mice intoxicated with carbon tetrachloride: a comparative study. *Journal of Medicinal Food*. **17**: 670-677
- 36.** Liu, X., Wang, W., Hu, H., *et al.* (2006). Smad3 specific inhibitor, naringenin, decreases the expression of extracellular matrix induced by TGF-beta1 in cultured rat hepatic stellate cells. *Pharmaceutical Research*. **23**: 82-89.
- 37.** Reyes-Gordillo, K., Shah, R., Lakshman, MR. *et al.* (2017). Hepatoprotective properties of curcumin. En *Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants*. Muriel, P. Elsevier, Waltham MA. 633-651
- 38.** Jiang, S., Han, J., Li, T. *et al.* (2017). Curcumin as a potential protective compound against cardiac diseases. *Pharmacological Research*. **119**: 373-383.
- 29.** Hope-Roberts, M. y Horobin, R. W. (2017). A review of curcumin as a biological stain and as a self-visualizing pharmaceutical agent. *Biotech Histochem*. **16**:1-9.
- 40.** Reyes-Gordillo, K., Segovia, J., Shibayama, M. *et al* (2007). Curcumin protects against acute liver damage in the rat by inhibiting NF-kappa B, proinflammatory cytokines production and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta*. **6**: 989-996.
- 41.** Fu, Y., Zheng, S., Lin, J. *et al.* (2008). Curcumin protects the rat liver from CCl₄-caused injury and fibrogenesis by attenuating oxidative stress and suppressing inflammation. *Molecular Pharmacology*. **2**: 399-409.
- 42.** Reyes-Gordillo, K., Segovia, J. *et al.* (2008). Curcumin prevents and reverses cirrhosis induced by bile duct obstruction or CCl₄ in rats: role of TGF- β modulation and oxidative stress. *Fundamental & Clinical Pharmacology*. **4**: 417-427.

43. Lin, Y.L., Lin, C.Y., Chi, C.W. *et al.* (2009). Study on antifibrotic effects of curcumin in rat hepatic stellate cells. *Phytotherapy Research: PTR*. **7**: 927-932.
44. Wang, M.E., Chen, Y.C., Chen, I.S. *et al.* (2012). Curcumin protects against thioacetamide-induced hepatic fibrosis by attenuating the inflammatory response and inducing apoptosis of damaged hepatocytes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. **10**: 1352-1366.
45. Yao, Q.Y., Xu, B.L., Wang, J.Y. *et al.* (2012). Inhibition by curcumin of multiple sites of the transforming growth factor-beta1 signalling pathway ameliorates the progression of liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*.**12**: 156.
46. Lee, H.Y., Kim, S.W., Lee, G.H. *et al.* (2016). Turmeric extract and its active compound, curcumin, protect against chronic CCl₄-induced liver damage by enhancing antioxidation. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. **1**:316.
47. Wu, P., Huang, R., Xiong, Y.L. *et al.* (2016). Protective effects of curcumin against liver fibrosis through modulating ADN methylation. *Chinese Journal of Natural Medicines*. **4**: 255-264.
48. Bruck, R., Ashkenazi, M., Weiss, S. *et al.* (2017). Prevention of liver cirrhosis in rats by curcumin. *Liver International*. **3**: 373-83.
49. Muriel, P., Alba, N., Pérez-Álvarez, M. *et al.* (2001). Kupffer cells inhibition prevents hepatic lipid peroxidation and damage induced by carbon tetrachloride. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **130**: 219-226.

- 50.** Chávez, E., Reyes-Gordillo, K., Segovia, J. *et al.* (2008). Resveratrol prevents fibrosis, NF- κ B activation and TGF- β increases induced by chronic CCl₄ treatment in rats. *Journal of Applied Toxicology*. **28**: 35-43.
- 51.** Reitman, S. y Frankl, A. (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic pyruvic and glutamic pyruvic transaminases. *American Journal of Clinical Pathology*. **28**: 56-63.
- 52.** Berger, L. y Rudolph, G.G. (1963). Alkaline phosphatase. En *Standards Method of Clinical Chemistry*. Academic Press, New York. 211-221.
- 53.** Glossmann, M. y Neville, D. M. (1972). Gamma- glutamyl transferase in kidney brush border membranes. *FEBS Letters*. **19**: 340-344.
- 54.** Buege, J.A. y Aust, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. **52**: 302-310.
- 55.** Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**: 248-254.
- 56.** Sedlak, J. y Lindsay, R.H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*. **25**: 192-205.
- 57.** Lawrence, R.A. y Burk, R.E. (1976). Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **71**: 952-958.
- 58.** Seifter, S., Seymour, B., Novic, B. *et al.* (1950). The estimation of glycogen whit the anthrone reagent. *Archives of Biochemistry*. **25**: 191-199.

- 59.** Rojkind, M. y González, E. (1974). An improved method for determining special radioactivities of proline and hidroxiprolina. *Analytical Biochemistry*. **57**: 1-7.
- 60.** Gordillo, K. (2008). Evaluación de la capacidad de la curcumina para prevenir o revertir el daño hepático experimental inducido con CCl₄ o mediante la obstrucción biliar prolongada en la rata. Tesis de Doctorado, Departamento de Farmacología, CINVESTAV-IPN. México, D.F. México. 119 p.
- 61.** Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods: a Companion to Methods in Enzymology*. **4**:402-408.
- 62.** Hemmann, S., Graf, J. y Roderfeld, M. (2007). Expression of MMPs and TIMPss in liver fibrosis: a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *Journal of Hepatology*. **46**: 955-975.
- 63.** Rosen, H.R. y Keefe, E.B. (2000). Evaluation of abnormal liver enzymes, use of liver test, and the serology of viral hepatitis. En: *Liver Disease Diagnosis and Management*. Churchill. Philadelphia: 24-35.
- 64.** Ohkawa, H., Ohishi, N. y Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. **95**: 351-358
- 65.** Arauz, J., Ramos-Tovar, E. y Muriel P. (2016). Redox state and methods to evaluate oxidative stress in liver damage: From bench to bedside. *Annals of Hepatology*. **5**: 160-173.
- (66).** Kawai, T. y Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death and Differentiation*. **5**:816-825.

- 67.** Dou, W., Zhang, J. y Sun, A. (2013). Protective effect of naringenin against experimental colitis via suppression of Toll-like receptor 4/NF- κ B signalling. *The British Journal of Nutrition*. **110**: 599-608.
- 68.** Yilma, A.N., Singh, S.R., Morici, L. *et al.* (2013). Flavonoid naringenin: a potential immunomodulator for *Chlamydia trachomatis* inflammation. *Mediators of Inflammation*. **2013**: 102457.
- 69.** Yoshida, H., Watanabe, W., Oomagari, H. *et al.* (2013). Citrus flavonoid naringenin inhibits TLR2 expression in adipocytes. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. **24**: 1276-1284.
- 70.** Olaso, E., Ikeda, K., Eng, F.J. *et al.* (2001). DDR2 receptor promotes MMPs-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells. *The Journal of Clinical Investigation*. **108**: 1369-1378.
- 71.** Hayashi, H. y Sakai T. (2012). Biological significance of local TGF- β activation in liver diseases. *Frontiers in Physiology*. **3**: 12.
- 72.** Lou, C., Zhang, F., Yang, M. *et al.* (2012). Naringenin decreases invasiveness and metastasis by inhibiting TGF- β -induced epithelial to mesenchymal transition in pancreatic cancer cells. *PLoS One*. **7**: e50956.
- 73.** Yen, H.R., Liu, C.J. y Yeh, C.C. (2015). Naringenin suppresses TPA-induced tumor invasion by suppressing multiple signal transduction pathways in human hepatocellular carcinoma cells. *Chemico-Biological Interactions*. **235**: 1-9.
- 74.** Sun, Y. y Gu, J. (2015). Study on effect of naringenin in inhibiting migration and invasion of breast cancer cells and its molecular mechanism. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. **40**: 1144-1150.

- 75.** Arauz, J., Moreno, M.G., Cortés-Reynosa, P. *et al.* (2013). Coffee attenuates fibrosis by decreasing the expression of TGF- β and CTGF in a murine model of liver damage. *Journal of Applied Toxicology*. **33**: 970-979.
- 76.** Inagaki, Y., Mamura, M., Kanamaru, Y. *et al.* (2001). Constitutive phosphorylation and nuclear localization of Smad3 are correlated with increased collagen gene transcription in activated hepatic stellate cells. *Journal of Cellular Physiology*. **187**: 117-123.
- 77.** Holmes, A., Abraham, D.J., Sa, S. *et al.* (2001). CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. **276**: 10594-10601.
- 78.** Du, G., Jin, L., Han, X. *et al.* (2009). Naringenin: a potential immunomodulator for inhibiting lung fibrosis and metastasis. *Cancer Research*. **69**: 3205-3212.
- 79.** Martinez, R.M., Pinho-Ribeiro, F.A., Steffen, V.S. *et al.* (2015). Naringenin inhibits UVB irradiation-induced inflammation and oxidative stress in the skin of hairless mice. *Journal of Natural Products*. **78**: 1647-1655.
- 80.** Meng, X.M., Zhang, Y., Huang, X.R. *et al.* (2015). Treatment of renal fibrosis by rebalancing TGF- β /Smad signaling with the combination of asiatic acid and naringenin. *Oncotarget*. **6**: 36984-36997.
- 81.** Yang, Y., Xu, Y., Xia, T. *et al.* (2011). A single-molecule study of the inhibition effect of Naringenin on transforming growth factor- β ligand-receptor binding. *Chemical Communications: Chem Comm/The Royal Society of Chemistry*. **47**: 5440-5442.

- 82.** Jung, J.W., Park, I.H., Cho, J.S. *et al.* (2013). Naringenin inhibits extracellular matrix production via extracellular signal-regulated kinase pathways in nasal polyp-derived fibroblasts. *Phytotherapy Research*. **27**: 463-467.
- 83.** Imamura, T., Oshima, Y. y Hikita, A. (2013) Regulation of TGF- β family signalling by ubiquitination and deubiquitination. *Journal of Biochemistry*. **154**: 481-489.
- 84.** Bai, G., Yan, G., Wang, G. *et al.* (2016). Anti-hepatic fibrosis effects of a novel turtle shell decoction by inhibiting hepatic stellate cell proliferation and blocking TGF- β 1/Smad signaling pathway in rats. *Oncology Reports*. **36**: 2902-2910.
- 85.** Wu, F.R., Jiang, L., He, X.L. *et al.* (2015). Effect of hesperidin on TGF-beta1/Smad signaling pathway in HSC. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. **40**: 2639-2643.
- 86.** Vincenti, M.P. y Brinckerhoff, C.E (2002). Transcriptional regulation of collagenase (MMPs-1, MMPs-13) genes in arthritis: integration of complex signaling pathways for the recruitment of gene-specific transcription factors. *Arthritis Research & Therapy*. **4**: 157-164.
- 87.** Matsuzaki, K. (2013). Smad phospho-isoforms direct context-dependent TGF- β signaling. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. **24**: 385-399.
- 88.** Yoshida, K., Matsuzaki, K., Mori, S. *et al.* (2005). Transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor signal via c-Jun N-terminal kinase-dependent Smad2/3 phosphorylation in rat hepatic stellate cells after acute liver injury. *The American Journal of Pathology*. **166**: 1029-1039.
- 89.** Cameron G.R. y Karunaratne, W.A.E. (1936). Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration. *The Journal of Pathology and Bacteriology*. **42**: 1-21.

- 90.** Gu, K., Zhao, J.D., Ren, Z.G. (2011). A natural process of cirrhosis resolution and deceleration of liver regeneration after thioacetamide withdrawal in a rat model. *Molecular Biology Reports*. **3**: 1687-1696.
- 91.** Kisseleva, T., Cong, M., Paik, Y. *et al.* (2012). Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **24**: 9448-9453
- 92.** Iredale JP1, Benyon RC, Pickering J. *et al.* (1998). Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *The Journal of Clinical Investigation*. **3**: 538-5349.
- 93.** Issa, R., Williams, E., Trim, N. *et al.* (2001). Apoptosis of hepatic stellate cells: involvement in resolution of biliary fibrosis and regulation by soluble growth factors. *Gut*. **48**: 548-557.
- 94.** Kershenovich, D. y Gutiérrez- Reyes, D.G. (2017). Is human cirrhosis a reversible disease? En: *Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants*. Muriel, P. Elsevier, Waltham MA. 259-264.
- 95.** Iredale, J. P. (2007). Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *The Journal of Clinical Investigation*. **3**: 539-48.
- 96.** Issa, R., Zhou, X., Constandinou, C.M. *et al.* (2004). Spontaneous recovery from micronodular cirrhosis: evidence for incomplete resolution associated with matrix cross-linking. *Gastroenterology*. **126**: 1795-1808.
- 97.** Murphy, F.R., Issa, R., Zhou, X. *et al.* (2002). Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects

on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. *The Journal of Biological Chemistry*. **13**: 11069-76.

98. El Taghdouini, A., Najimi, M., Sancho-Bru, P. *et al.* (2015). In vitro reversion of activated primary human hepatic stellate cells. *Fibrogenesis & Tissue Repair*. **8**: 14.

99. Troeger, J.S., Mederacke, I., Gwak, G.Y. *et al.* (2012). Deactivation of hepatic stellate cells during liver fibrosis resolution in mice. *Gastroenterology*. **4**: 1073-1083.

100. Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R.A. *et al.* (2008). Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*. **4**: 657-667.

101. Huang, Y., Deng, X., Liang, J. *et al.* (2017). Modulation of hepatic stellate cells and reversibility of hepatic fibrosis. *Experimental Cell Research*. **2**: 420-426.

102. Kong, D., Zhang, F., Zhang Z. *et al.* (2013). Clearance of activated stellate cells for hepatic fibrosis regression: Molecular basis and translational. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **3**: 246-250.

103. Muddu, A.K., Guha, I.N., Elsharkawy, A.M. *et al.* (2007). Resolving fibrosis in the diseased liver: Translating the scientific promise to the clinic. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **39**: 695-714.

104. Elsharkawy, A.M., Oakley, F. y Mann, D. A.(2005). The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. *Apoptosis*. **10**: 927-939.

105. Kisseleva, T. y Brenner, D. A. (2006). Hepatic stellate cells and the reversal of fibrosis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. **21** Suppl 3: S84-7.

- 106.** Kisseleva, T. y Brenner, D. A. (2011). Anti-fibrogenic Strategies and the regression of fibrosis. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*. **2**: 305-317.
- 107.** Park, H.J., Choi, Y.J., Lee, J.H. et al. (2017). Naringenin causes ASK1-induced apoptosis via reactive oxygen species in human pancreatic cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*. **99**: 1-8.
- 108.** Lim, W., Park, S., Bazer, F.W. et al. (2017). Naringenin-induced apoptotic cell death in prostate cancer cells is mediated via the PI3K/AKT and MAPK signaling pathways. *Journal of Cellular Biochemistry*. **5**: 1118-1131.
- 109.** Morikawa, K., Nonaka, M., Mochizuki, H. et al. (2008). Naringenin and hesperetin induce growth arrest, apoptosis, and cytoplasmic fat deposit in human preadipocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **22**: 11030-11037.
- 110.** Fang, F., Tang, Y., Gao, Z. et al. (2010). A novel regulatory mechanism of naringenin through inhibition of T lymphocyte function in contact hypersensitivity suppression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **2**: 163-9
- 111.** Zuo, X.L., Zhou, Y., Li, R.F. et al. (2008). Relation of apoptosis of K562 cells induced by naringenin in vitro to enzyme activity changes of caspase-3 and caspase-8 and expression of FAS/FASL proteins. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. **2**: 286-9.
- 112.** Jin, C.Y., Park, C., Hwang, H.J. et al. (2011). Naringenin up-regulates the expression of death receptor 5 and enhances TRAIL-induced apoptosis in human lung cancer A549 cells. *Molecular Nutrition & Food Research*. **2**: 300-309.

- 113.** Shu, J.C., He, Y.J., Lv, X. *et al.* (2009). Effect of curcumin on the proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*.**12**: 173-178.
- 114.** Shu, J.C., He, Y.J., Lv, X. *et al.* (2009). Curcumin prevents liver fibrosis by inducing apoptosis and suppressing activation of hepatic stellate cells. *Journal of Natural Medicines*. **4**: 415-20
- 115.** He, Y.J., Kuchta, K., Lv, X. *et al.* (2015). Curcumin, the main active constituent of turmeric (*Curcuma longa* L.), induces apoptosis in hepatic stellate cells by modulating the abundance of apoptosis-related growth factors. *Zeitschrift für Naturforschung*. **11-12c**: 281–285.
- 116.** Xu, J., Fu, Y., Chen, A. (2003). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma contributes to the inhibitory effects of curcumin on rat hepatic stellate cell growth. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. **1**: G20-30.
- 117.** Zheng, S. y Chen, A. (2004). Activation of PPAR γ is required for curcumin to induce apoptosis and to inhibit the expression of extracellular matrix genes in hepatic stellate cells in vitro. *The Biochemical Journal*. (Pt 1):149-157.
- 118.** Herr, I. y Debatin, K.M. (2001). Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood*. **9**: 2603-2614.
- 119.** Lang, A., Schoonhoven, R., Tuvia, S. *et al.* (2000). Nuclear factor kappaB in proliferation, activation and apoptosis in rat hepatic stellate cells. *Journal of Hepatology*. **1**: 49-58.

- 120.** Oakley, F., Meso, M., Iredale, J.P. *et al.* (2005). Inhibition of I κ B kinases stimulates hepatic stellate cell apoptosis and accelerates recovery from liver fibrosis. *Gastroenterology*. **128**: 108-120.
- 121.** Chtourou, Y., Fetoui, H., Jemai, R. *et al.* (2015). Naringen inreduces cholesterol-induced hepatic inflammation in rats by modulating matrix metalloproteinases-2, 9 via inhibition of nuclear factor κ B pathway. *European Journal of Pharmacology*. **746**: 96-105.
- 122.** Bodduluru, L.N., Kasala, E.R., Madhana, R.M. *et al.* (2016). Naringenin ameliorates inflammation and cell proliferation in benzo (a) pyrene induced pulmonary carcinogenesis by modulating CYP1A1, NF κ B and PCNA expression. *International Immunopharmacology*. **30**: 102-110.
- 123.** Chtourou, Y., Kamoun, Z., Zarrouk, W. *et al.* (2016). Naringenin ameliorates renal and platelet purinergic signalling alterations in high-cholesterol fed rats through the suppression of ROS and NF- κ B signaling pathways. *Food & Function*. **1**: 183-93
- 124.** Li, Y.R., Chen, D.Y., Chu, C.L. *et al.* (2015). Naringenin inhibits dendritic cell maturation and has therapeutic effects in a murine model of collagen-induced arthritis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. **12**: 1467-1478.
- 125.** Martinez, R.M., Pinho-Ribeiro, F.A., Steffen, V.S. *et al.* (2016). Topical formulation containing naringenin: efficacy against ultraviolet B irradiation-induced skin inflammation and oxidative stress in mice. *PLoS One*. **1**: e0146296.
- 126.** He, Y.J., Kuchta, K., Deng, Y.M. *et al.* (2017). Curcumin promotes apoptosis of activated hepatic stellate cells by inhibiting protein expression of the MyD88 pathway. *Planta Medica*. [Epub ahead of print].

- 127.** Shu, J.C., Kuchta, K., He, Y.J. *et al.* (2015). Curcumin induces apoptosis in hepatic stellate cells via inhibition of the MyD88 pathway. *Planta Medica*. **81**: PW_67.
- 128.** Tu, C.T., Yao, Q.Y., Xu, B.L. *et al.* (2012). Protective effects of curcumin against hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride: Modulation of high-mobility group box 1, Toll-like receptor 4 and 2 expression. *Food and Chemical Toxicology: an International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*. **9**: 3343-3351.
- 129.** Aggarwal, S., Ichikawa, H., Takada, Y. *et al.* (2006). Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of I κ B kinase and Akt activation. *Molecular Pharmacology*. **1**: 195-206.
- 130.** She, H., Xiong, S., Hazra, S. *et al.* (2005). Adipogenic transcriptional regulation of hepatic stellate cells. *The Journal of Biological Chemistry*. **6**: 4959-67.
- 131.** Tsukamoto, H. (2005). Adipogenic phenotype of hepatic stellate cells. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* .**11** Suppl: 132S-133S.
- 132.** Miyahara, T., Schrum, L., Rippe, R. *et al.* (2000). Peroxisome proliferator-activated receptors and hepatic stellate cell activation. *The Journal of Biological Chemistry*. **46**: 35715-35722.
- 133.** Hazra, S., Xiong, S., Wang, J., *et al.* (2004). Peroxisome proliferator-activated receptor α induces a phenotypic switch from activated to quiescent hepatic stellate cells. *The Journal of Biological Chemistry* .**12**: 11392-11401.
- 134.** Fiorucci, S., Rizzo, G., Antonelli, E. *et al.* (2005). Cross-talk between farnesoid-x-receptor (fxr) and peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to the

antifibrotic activity of fxr ligands in rodent models of liver cirrhosis. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. **1**: 58-68.

135. Zhang, F., Lu, Y. y Zheng, S. (2012). Peroxisome proliferator-activated receptor- γ cross-regulation of signaling events implicated in liver fibrogenesis. *Cell Signal*. **3**: 596-605

136. Qi, Z., Xu, Y., Liang, Z. *et al.* (2015). Naringin ameliorates cognitive deficits via oxidative stress, proinflammatory factors and the PPAR γ signaling pathway in a type 2 diabetic rat model. *Molecular Medicine Reports*. **5**: 7093-7101.

137. Goldwasser, J., Cohen, P.T., Yang E., *et al.* (2010). Transcriptional regulation of human and rat hepatic lipid metabolism by the grapefruit flavonoid naringenin: role of PPAR α , PPAR γ and LXRA. *PLoS One*. **8**: e12399.

138. Christensen, K.B., Petersen, R.K., Kristiansen, K. *et al.* (2010). Identification of bioactive compounds from flowers of black elder (*Sambucus nigra* L.) that Activate the Human Peroxisome Proliferator-activated Receptor (PPAR) γ . *Phytotherapy Research: PTR*. Suppl **2**: S129-132.

139. Lu, C., Xu, W. y Zheng. S. (2017). Nrf2 activation is required for curcumin to induce lipocyte phenotype in hepatic stellate cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **95**: 1-10.

140. Zheng, S. y Chen, A. (2007). Disruption of transforming growth factor-beta signaling by curcumin induces gene expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in rat Hepatic stellate cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. **1**: 113-123.

141. Zhou, Y., Zheng, S., Lin, J. *et al.* (2007). The interruption of the PDGF and EGF signaling pathways by curcumin stimulates gene expression of PPAR gamma in rat

activated hepatic stellate cell in vitro. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*. **5**: 488-98

142. Lin. J. y Chen. A. (2008). Activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ by curcumin blocks the signaling pathways for PDGF and EGF in hepatic stellate cells. *Laboratory Investigation*. **5** :529-540

143. Zhai. X., Qiao, H., Guan, W. *et al.* (2015). Curcumin regulates peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α expression by AMPK pathway in hepatic stellate cells in vitro. *European Journal of Pharmacology*. **5**: 56-62.

144. Cheng, Y., Ping, J. y Xu, L.M. (2007). Effects of curcumin on peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and nuclear translocation/redistribution in culture-activated rat hepatic stellate cells. *Chinese Medical Journal*. **9**: 794-801.

145. Schrader, J., Fallowfield, J. e Iredale J. P. (2009). Senescence of activated stellate cells: not just early retirement. *Hepatology*. **3**: 1045-1047.

146. Jin, H., Lian, N., Zhang, F. *et al.* (2016). Activation of PPAR γ /P53 signaling is required for curcumin to induce hepatic stellate cell senescence. *Cell Death & Disease*. **7**: e2189.

147. Jin, H., Jia, Y., Yao, Z. *et al.* (2017). Hepatic stellate cell interferes with NK cell regulation of fibrogenesis via curcumin induced senescence of hepatic stellate cell. *Cell Signal*. **33** :79-85.

148. Okazaki, I., Watanabe, T., Hozawa, S. *et al.* (2000). Molecular mechanism of the reversibility of hepatic fibrosis: with special reference to the role of matrix metalloproteinases. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. **15**: Suppl D26-32.

149. Benyon, R.C., y Arthur, M.J. (2001). Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Seminars in Liver Disease*. **3**: 373-384.

.

150. Watanabe, T., Niioka, M., Ishikawa, A. *et al.* (2001). Dynamic change of cells expressing MMPs-2 mRNA and MT1-MMPs mRNA in the recovery from liver fibrosis in the rat. *Journal of Hepatology*. **4**: 465-473.

151. Watanabe, T., Niioka, M., Hozawa, S. *et al.* (2000). Gene expression of interstitial collagenase in both progressive and recovery phase of rat liver fibrosis induced by carbon tetrachloride. *Journal of Hepatology*. **33**: 224-235.

152. Grotendorst, G. R. (1997). Connective tissue growth factor: a mediator of TGF- β Action on fibroblasts. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. **3**: 171-179.

153. Gressner, O. A. y Gressner, A.M. (2008). Connective tissue growthfactor: a fibrogenic master switch in fibrotic liver diseases. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* .**8**: 1065-1079.

154. Zheng, S. y Chen, A. (2006). Curcumin suppresses the expression of extracellular matrix genes in activated hepatic stellate cells by inhibiting gene expression of connective tissue growth factor. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. **5**: 883-893.

155. Chen, N., Geng, Q., Zheng, J. *et al.* (20014). Suppression of the TGF- β /Smad signaling pathway and inhibition of hepatic stellate cell proliferation play a role in the hepatoprotective effects of curcumin against alcohol-induced hepatic fibrosis. *International Journal of Molecular Medicine*. **4**: 1110-1116.

156. Kong, D., Zhang, F., Shao, J. *et al.* (2015). Curcumin inhibits cobalt chloride-induced epithelial-to-mesenchymal transition associated with interference with TGF- β /Smad

signaling in hepatocytes. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*. **11**: 1234-45.

157. Zheng, S., Yumei, F y Chen, A. (2007). De novo synthesis of glutathione is a prerequisite for curcumin to inhibit hepatic stellate cell (HSC) activation. *Free Radical Biology & Medicine*. **3**: 444-453.

158. Nie, Y.C., Wu, H., Li, P.B. *et al.* (2012) Naringin attenuates EGF-induced MUC5AC secretion in A549 cells by suppressing the cooperative activities of MAPKs-AP-1 and IKKs-IkB-NF-kB signaling pathways. *European Journal of Pharmacology*. **1-3**: 207-213.

159. Zhang, N., Yang, Z., Yuan, Y. *et al.* (2015). Naringenin attenuates pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Experimental and Therapeutic Medicine*. **6**: 2206-2212.

160. Lee, J.J., Yi, H., Kim, I.S. *et al* (2012). (2S)-naringenin from *Typha angustata* inhibits vascular smooth muscle cell proliferation via a G0/G1 arrest. *Journal of Ethnopharmacology*. **3**: 873-878.

161. Nhiem, N.X., Kiem, P.V., Minh, C.V . *et al.* (2010). A potential inhibitor of rat aortic vascular smooth muscle cell proliferation from the pollen of *Typha angustata*. *Archives of Pharmacal Research* .**12**: 1937-1942.

162. Cayci,C., Wahlquist, T.C., Seckin, S.I. *et al.* (2010). Naringenin inhibits neointimal hyperplasia following arterial reconstruction with interpositional vein graft. *Annals of Plastic Surgery*. **1**: 105-113.

163. Zhang, F., Zhang, Z., Chen, L., *et al.* (2014). Curcumin attenuates angiogenesis in liver fibrosis and inhibits angiogenic properties of hepatic stellate cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. **7**: 1392-406.