

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

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“Evaluación del efecto de la hesperidina y la L-teanina en el daño
hepático experimental en la rata”**

T E S I S

Que presenta:

M. en C. JUANA ELIUTH PÉREZ VARGAS

Para obtener el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE
FARMACOLOGÍA

Director de la tesis:

DR. PABLO MURIEL DE LA TORRE

México, D.F.

MAYO, 2015

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-crédito del CONACyT para estudios de posgrado con clave de registro: 225157

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme dado una segunda oportunidad de vida, y enviarme este precioso regalo; mi hijo Emmanuel Edmundo; quien me impulsa en todo momento a seguir adelante y cumplir mis sueños siendo cada día una mejor persona, a pesar de las duras pruebas de la vida, Gracias Dios.

Al Dr. Pablo Muriel de la Torre, por otorgarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo. Dr. Pablo, gracias por ser un ejemplo de exigencia, por compartir conmigo su experiencia y conocimientos durante el tiempo en el que desarrollé este trabajo, a usted Doctor mi gratitud.

Agradezco a mis sinodales: Dra. Liliana Favari Perozzi, Dr. José Segovia Vila, Dr. Víctor K. Tsutsumi Fujiyoshi y Dr. Eduardo Fernández Martínez quienes al expresar sus atinados comentarios y sugerencias acrecentaron la calidad de este trabajo. Gracias por su tiempo y ayuda.

Al B.E. Mario Gil Moreno, y Q.F.B. Paula Vergara, por su excelente asistencia técnica en la realización de este trabajo. Mario, gracias por brindarme no solo tu ayuda, sino tu amistad sincera, y sabios consejos de vida, que me han mejorado mucho como persona, a ti, mi estima, agradecimiento, admiración y sobre todo mi amistad.

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.

DEDICATORIAS

Dedico este valioso trabajo a:

A ti, Emmanuel Edmundo mi pequeño ángel, mi motor de vida que me devolvió las ganas de realizar mis sueños y quien ha sido mi mayor felicidad.

A ti, Jorge, mi esposo, mi gran amor, mi compañero de vida y amigo por tu apoyo incondicional y sabios consejos para no dejarme derrotar.

A ti, Dra. Vargas, mi Mamá, porque una vez más sin ti no hubiese logrado una de las más grandes metas, con el más profundo amor, respeto y la más grande admiración por ser la mejor madre del mundo.

A ti Joaquín Vargas, mi primo y hermano, por tu apoyo incondicional con mi trabajo y con mi niño gracias, fuiste parte fundamental en este logro.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABLAS.....	11
RESUMEN	12
SUMMARY	13
I.INTRODUCCIÓN.....	14
<i>I.1. Antecedentes.....</i>	14
<i>I.2. El hígado</i>	15
<i>I.3. El lobulillo hepático.....</i>	19
<i>I.4. Los tipos celulares del hígado.....</i>	19
I.4.1. Los hepatocitos	20
I.4.2. Las células de Kupffer.....	20
I.4.3. Las células de Pit.....	20
I.4.4. Las células estelares.....	21
I.4.5. Las células endoteliales.....	21
<i>I.5. La circulación hepática.....</i>	22
<i>I.6. Las funciones del hígado.....</i>	24
I.6.1. El almacenamiento de vitaminas.....	24
I.6.2. La elaboración de la bilis.....	24
I.6.3. El metabolismo de los carbohidratos.....	25
I.6.4. El metabolismo de las grasas.....	25
I.6.5. El metabolismo de las proteínas.....	26
I.6.6. La detoxificación de los xenobióticos y los fármacos.....	26
<i>I.7. El daño hepático.....</i>	26
I.7.1. El daño agudo.....	26
I.7.2. El daño crónico.....	27
<i>I.8. Mediadores moleculares del daño hepático.....</i>	27
I.8.1. Factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB).....	28
I.8.2. El TGF-β.....	29
I.8.3. Las interleucinas IL-1β, IL-6, IL-10.....	30
I.8.4. Las metaloproteinasas (MMP's).....	32

I.8.5. El CTGF.....	34
I.9. Modelos de daño hepático.....	35
I.9.1. Daño hepático inducido con CCl ₄ en rata.....	35
I.10. La hesperidina.....	35
I.10.1. Las propiedades físico-químicas de la hesperidina.....	36
I.10.2. Las propiedades farmacológicas.....	37
I.10.3. Las propiedades farmacocinéticas de la hesperidina	37
I.11. La L-teanina.....	38
I.11.1. Las propiedades físico-químicas de la L-teanina.....	39
I.11.2. Las propiedades farmacológicas.....	40
I.11.3. Las propiedades farmacocinéticas.....	40
II. JUSTIFICACIÓN	42
III. HIPÓTESIS.....	43
IV. OBJETIVOS.....	43
IV.1. General.....	43
IV.2. Específicos.....	43
V. METODOLOGÍA.....	44
V.1. Modelo de prevención con hesperidina.....	44
V.2. Modelo de prevención con L-teanina.....	44
VI. DETERMINACIONES EXPERIMENTALES	45
VI.1. Determinación sérica de la actividad de la enzima γ -glutamil transpeptidasa (γ -GTP).....	48
VI.2. Determinación sérica de la enzima alanina aminotransferasa (ALT).....	50
VI.3. Determinación del contenido de glucógeno hepático.....	52
VI.4. Determinación del grado de peroxidación lipídica.....	53
VI.5. Determinación de proteínas por el método de Bradford.....	54
VI.6. Determinación del contenido de colágena (hidroxiprolina).....	55
VI.7. Determinación de los niveles de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) en el hígado.....	58
VI.8. Histología.....	60

VII. ENSAYOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	62
VII.1. Obtención de proteínas totales por el método de Trizol®.....	62
VII.2. Obtención de proteínas totales por el método de RIPA®.....	64
VII.3. Cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinconínico.....	65
VII.4. Técnica de electroforesis de proteínas.....	66
VII.5. Técnica de western blot.....	68
VII.5.1. Técnica de revelado.....	68
VII.6. Técnica de stripping.....	69
VII.7. Tratamiento estadístico.....	70
VIII. RESULTADOS.....	71
VIII.1. Modelo de prevención con hesperidina.....	71
VIII.1.1. Marcadores séricos de daño hepático.....	71
VIII.1.2. El efecto antioxidante de la hesperidina.....	72
VIII.1.3. Contenido de glucógeno.....	74
VIII.1.4. Contenido de colágena.....	75
VIII.1.5. Análisis histopatológico.....	76
VIII.1.6. Capacidad inmuno-moduladora de la hesperidina.....	79
VIII.1.6.1. Expresión proteica del NF-κB.....	79
VIII.1.6.2. Expresión proteica de la citocina pro-inflamatoria IL-1β.....	80
VIII.1.6.3. Expresión proteica de la citocina anti-inflamatoria IL-10.....	81
VIII.1.6.4. Expresión proteica de las citocinas pro-fibróticas TGF-β y CTGF.....	82
VIII.1.6.5. mRNA de citocinas profibrogénicas.....	83
VIII.2. Modelo de prevención con L-teanina.....	84
VIII.2.1. Actividades enzimáticas de la ALT y la γ-GTP.....	84
VIII.2.2. Contenido de colágena.....	85
VIII.2.2. Ensayo histopatológico.....	86
VIII.2.3. Estrés Oxidativo.....	89
VIII.2.4. Capacidad inmuno-moduladora de la L-teanina.....	91
VIII.2.4.1. Expresión proteica del NF-κB.....	91

VIII.2.4.2. Expresión proteica de las citocinas proinflamatorias y anti-inflamatoria.....	92
VIII.2.4.3. Expresión de las citocinas pro-fibrogénicas.....	95
VIII.2.4.4. Expresión de la MMP-13.....	97
VIII.2.4.5. m-RNA de citocinas pro-fibrogénicas.....	98
IX. DISCUSIÓN.....	99
<i>IX.1. La hesperidina previene la cirrosis experimental.....</i>	<i>99</i>
<i>IX.2. La L-teanina previene la cirrosis experimental.....</i>	<i>102</i>
<i>IX.3.Efecto hepatoprotector común de la hesperidina y la L-teanina.....</i>	<i>105</i>
<i>IX.4.Efecto de la hesperidina y la L-teanina en los niveles basales.....</i>	<i>106</i>
X.CONCLUSIONES.....	107
XI. PERSPECTIVAS.....	108
XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
XIII. ANEXO 1.....	118

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía del hígado humano.....	16
Figura 2. Vascularización del hígado.....	18
Figura 3. Estructura básica del lobulillo hepático.....	19
Figura 4. Distribución de los vasos hepáticos y los conductos biliares.....	22
Figura 5. Circulación hepática.....	23
Figura 6. Vía de activación del factor transcripcional NF-κB.....	29
Figura 7. Estructura química de la hesperidina.....	36
Figura 8. Estructura química de la L-teanina.....	39
Figura 9. Diagrama de bloques de la metodología.....	46
Figura 10. Determinaciones experimentales.....	47
Figura 11. Peroxidación lipídica.....	72
Figura 12. Glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), razón GSH/GSSG y glutatión total (GSH + GSSG).....	73
Figura 13. Contenido de glucógeno.....	74
Figura 14. Contenido de colágena.....	75
Figura 15. Histología de la tinción de hematoxilina y eosina.....	77
Figura 16. Histología de la tinción tricrómica de Masson.....	78
Figura 17. Expresión del NF-κ B (p-65).....	79
Figura 18. Expresión de la interleucina 1β (IL-1β).....	80
Figura 19. Expresión de la interleucina 10 (IL-10).....	81
Figura 20. Expresión del TGF-β y del CTGF.....	82
Figura 21. Niveles de mRNA para los genes TGF-β y CTGF.....	83
Figura 22. Contenido de colágena.....	85
Figura 23 Histología de la tinción de hematoxilina y eosina.....	87
Figura 24 Histología de la tinción tricrómica de Masson.....	88
Figura 25 Peroxidación lipídica.....	89
Figura 26. Glutatión reducido (GSH), glutatión oxidado (GSSG), razón GSH/GSSG y glutatión total (GSH + GSSG).....	90
Figura 27. Expresión del NF-κB (p65).....	91
Figura 28. Expresión de la interleucina 1β (IL-1β).....	92

Figura 29. Expresión de la interleucina 6 (IL-6).....	93
Figura 30. Expresión de la interleucina 10 (IL-10).....	94
Figura 31. Expresión del TGF- β	95
Figura 32. Expresión del CTGF.....	96
Figura 33. Expresión de la MMP-13.....	97
Figura 34. Niveles de mRNA para los genes de TGF- β y CTGF.....	98

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades físicas de la hesperidina.....	36
Tabla 2. Propiedades farmacocinéticas de la hesperidina.....	38
Tabla 3. Propiedades físicas de la L-teanina.....	40
Tabla 4. Propiedades farmacocinéticas de la L-teanina.....	41
Tabla 5. Cantidades utilizadas para preparar la curva de la γ -glutamil transpeptidasa.....	49
Tabla 6. Cantidades de reactivos requeridas para la determinación de la actividad de la ALT.....	50
Tabla 7. Curva estándar para la alanina aminotransferasa.....	51
Tabla 8. Cantidades de reactivos para preparar el reactivo de Bradford.....	54
Tabla 9. Curva estándar de la hidroxiprolina.....	57
Tabla 10. Diagrama para la determinación de los niveles de glutatión reducido y glutatión oxidado en el hígado.....	58
Tabla 11a. Curva estándar de GSH fluorométrico.....	59
Tabla 11b. Curva estándar de GSSG fluorométrico.....	59
Tabla 12. Cantidades de reactivos para preparar la solución de RIPA.....	64
Tabla 13. Solución de monómeros de acrilamida.....	66
Tabla 14. Solución buffer de corrida, pH 8.3.....	66
Tabla 15. Solución buffer de transferencia.....	66
Tabla 16. Solución para lavados TBS 1X tween, pH 7.6.	66
Tabla 17. Buffer de muestra 2X pH 6.8.....	67
Tabla 18. Cantidades para preparar los geles de corrida y concentrador.	67
Tabla 19. Efecto de la administración crónica de CCl_4 y hesperidina sobre las actividades de la ALT y la γ -GTP.....	71
Tabla 20. Efecto de la administración crónica de CCl_4 y L-teanina sobre las actividades de la ALT y la γ -GTP.....	84

RESUMEN

En este trabajo se evaluaron los efectos antioxidantes y las propiedades antifibróticas y anti necróticas de la hesperidina y la L-teanina; además se investigó el papel del factor de transcripción κ B (NF- κ B), la regulación del factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) y del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) sobre la cirrosis inducida con CCl_4 . El daño hepático se produjo por la administración intraperitoneal de CCl_4 en ratas (0.4 g/kg) i.p, tres veces por semana, durante ocho semanas). Las dosis de tratamiento para cada compuesto fueron: la hesperidina (200 mg/kg) se administró vía intragástrica y la L-teanina (8,0 mg/kg) se añadió al agua de bebida durante 8 semanas. Se evaluó la expresión del NF- κ B, TGF- β , CTGF, IL-10, IL-1 β e IL-6 utilizando la técnica de western blot. Se determinaron las actividades enzimáticas de la ALT y la γ -GTP, así como, el contenido de glucógeno, la razón GSH/GSSG, el grado de peroxidación lipídica, y la fibrosis (cuantificando el contenido de hidroxiprolina y el análisis histopatológico). Los resultados mostraron que el CCl_4 incrementó las actividades enzimáticas de ALT y γ -GTP, la peroxidación lipídica del hígado, el contenido de hidroxiprolina; por otro lado, los niveles proteicos de NF- κ B, TGF- β , CTGF, IL-1 β , IL-10, IL-6 y MMP-13 se incrementaron; mientras que el contenido de glucógeno y la relación GSH/GSSG se redujeron. La hesperidina disminuyó significativamente las alteraciones producidas por el CCl_4 , excepto en el caso de IL-10, la cual se aumentó benéficamente. El grupo que recibió hesperidina solamente mostró disminuciones en la peroxidación lipídica, NF- κ B, IL-1 β , CTGF, y un aumento en la IL-10. Por su parte, la L-teanina previno significativamente el incremento de las actividades enzimáticas así como la expresión de NF- κ B y de las citocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6) y pro-fibrogénicas (TGF- β , CTGF); la L-teanina aumentó la expresión de IL-10, y de la enzima fibrolítica: MMP-13. Para ambos compuestos se observó una disminución de los niveles de mRNA de los genes TGF- β y CTGF. El contenido de hidroxiprolina del hígado y los resultados del análisis histopatológico fueron congruentes con los hallazgos bioquímicos y moleculares. Este estudio muestra que tanto la hesperidina como la L-teanina previnieron la cirrosis inducida por CCl_4 en ratas. El mecanismo de acción de estos compuestos probablemente esté asociado a su capacidad para reducir el estrés oxidativo y modular las señales proinflamatorias y profibróticas.

SUMMARY

The anti-oxidant, immunomodulatory, anti-necrotic and anti-fibrotic effects of hesperidin and L-theanine were evaluated in this work as well as the role of NF- κ B activation and regulation of TGF- β and CTGF were investigated on CCl₄-induced cirrhosis. Liver damage was produced by giving CCl₄ injections (0.4g/Kg, i.p., three times per week, for eight weeks) to rats. Hesperidin (200 mg/Kg) was administered by using gavage and L-theanine (8.0 mg/Kg) was added to the drinking, water, both during 8 weeks. The expression of NF- κ B, TGF- β , CTGF, IL-10 and IL-1 β were assessed through western blotting. Alanine amino transferase (ALT) and γ -glutamyltranspeptidase (γ -GTP) serum activities, also liver glycogen content, reduced/oxidized glutathione (GSH/GSSG) ratio, lipid peroxidation degree, and fibrosis (using hydroxyproline content and a histopathological analysis) were measured. The results showed that CCl₄ increased the enzymatic activities of ALT and γ -GTP, liver lipid peroxidation, hydroxyproline content. Additionally NF- κ B, TGF- β , CTGF, IL-1 β , and IL-10 levels were increased; while the glycogen content and GSH/GSSG ratio were decreased.

Hesperidin significantly decreased the negativemodifications produced by CCl₄, except as the case of anti-inflammatory IL-10, which was further increased by the flavone. The group that received hesperidin alone showed decreases in lipid peroxidation, NF- κ B, IL-1 β CTGF, and IL-1 β and an again increase in IL-10. A decrement of mRNA levels of these proteins agreed with the expression levels of profibrogenic cytokines. The results of the histopathological analysis were in agreement with the biochemical and molecular findings.

L-theanine prevented the increment of enzymatic activities as well as NF- κ B expression. Pro-inflammatory (IL-1 β , IL-6) and pro-fibrotic (TGF- β , CTGF) cytokines were down-regulated by L-theanine. A decrement of mRNA levels of these proteins agreed with the expression levels. L-theanine increased the expression of the anti-inflammatory cytokine: IL-10, and the fibrolytic enzyme: metalloproteinase-13. The liver hydroxyproline content and the histopathological analysis demonstrated the anti-fibrotic effect of L-theanine.

In summary, this study showed that hesperidin and L-theanine prevented CCl₄-induced cirrhosis in rats. The action mechanism of these compounds are associated with their ability to reduce oxidative stress and modulate proinflammatory and profibrotic signals.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Antecedentes

Las enfermedades hepáticas constituyen uno de los grandes problemas en el mundo entero y en los últimos años ha sido una de las diez primeras causas más frecuentes de muerte tanto en países desarrollados como en el tercer mundo¹. Las patologías del hígado son un grupo de trastornos que producen alteraciones en las principales funciones de este órgano como son: la producción de bilis, el almacenamiento de energía, la coagulación, el crecimiento, etc². El daño al hígado puede ser agudo o crónico. La consecuencia del daño crónico más importante de las enfermedades hepáticas es la cirrosis, enfermedad progresiva y fatal, en la que la fibrosis del hígado es secundaria a una reacción inflamatoria crónica, y conduce a graves alteraciones en su función metabólica y circulación sanguínea. En estado avanzado, el daño es considerado irreversible, el órgano intercambia las células normales por tejido fibrótico o cicatricial y en consecuencia pierde sus funciones³.

Las principales causas de la cirrosis son: el alcoholismo, el virus de la hepatitis C y B, la hepatitis autoinmune, el bloqueo de las vías biliares, la exposición prolongada a fármacos o sustancias tóxicas y las infecciones parasitarias que también pueden culminar en un daño crónico⁴.

En la actualidad, no existe tratamiento efectivo para combatir las enfermedades hepáticas crónicas, por lo que el objetivo a largo plazo de la investigación es prevenir o revertir el daño hepático. Sin embargo, existe una concordancia general en que el número de fármacos útiles para las enfermedades hepáticas no es suficiente. En contraste, existen muchos compuestos de origen herbolario, que han sido estudiados por sus propiedades para prevenir o curar el daño hepático⁵. Sin embargo, muchos de esos compuestos no han sido bien caracterizados o requieren de más estudios básicos y clínicos; y algunos otros son de reciente descubrimiento⁵, por lo que es necesario demostrar su beneficio potencial y real en las enfermedades hepáticas.

La industria farmacéutica actual, se ha basado en los conocimientos pretéritos y tradicionales del uso de plantas como recurso terapéutico natural, para la síntesis y el desarrollo de fármacos. Sin embargo, los procesos de verificación científica de estos productos tradicionales continúan hoy con el descubrimiento constante de nuevas

aplicaciones y que se postulan como alternativas en el tratamiento de diversas patologías, lo cual hace necesario el conocimiento de las propiedades terapéuticas de estos compuestos.

Los compuestos extraídos de plantas o frutos son denominados principios bioactivos que constituyen muchas veces los ingredientes primarios utilizados por laboratorios farmacéuticos. Algunos compuestos son un punto de partida en el desarrollo de formas comerciales que serán patentadas para su uso terapéutico. Se estima que un 25% de los fármacos prescritos en el mundo entero son derivados de plantas y alrededor de 121 extractos son utilizados como principios activos⁶. Los recursos vegetales con propiedades terapéuticas para la preparación de extractos estandarizados de las plantas, de sus órganos o partes de sus órganos son denominados fitofármacos⁶. Los fitofármacos alcanzan un papel relevante en la terapéutica moderna y pueden ser utilizados con fines preventivos o de tratamiento de las más diversas patologías⁶. Día a día se suman importantes investigaciones clínicas y se descubren o confirman numerosos efectos benéficos, muchos de ellos ya conocidos por culturas milenarias.

En México, una gran proporción de la población confía fuertemente en las prácticas tradicionales y en las plantas medicinales para tratar sus necesidades de salud⁶. Las enfermedades hepáticas crónicas, aumentan día a día en nuestro país y en el mundo entero; ante el crecimiento descontrolado de este tipo de enfermedades, surge la necesidad de buscar y estudiar nuevas alternativas de tratamiento basadas en compuestos de origen herbolario, dos compuestos de este tipo son la hesperidina y la L-teanina.

1.2. El hígado

El hígado es el órgano más voluminoso del cuerpo, constituye aproximadamente del 2 al 5% del peso corporal en el adulto y el 5% en el neonato, se encuentra ubicado en la parte más alta de la cavidad abdominal, específicamente en el hipocondrio derecho^{2,7}.

En su parte superior, el hígado colinda con el diafragma y la duplicación peritoneal diafragmática constituye el ligamento coronario. A partir de la parte media del ligamento coronario se origina otro repliegue peritoneal, el llamado ligamento falciforme, que se extiende desde el hígado hasta la pared abdominal anterior. Su inserción en el hígado lo divide en el lóbulo derecho y el izquierdo según la anatomía clásica y dos lóbulos accesorios, el cuadrado y el caudado de acuerdo a los pliegues peritoneales y fisuras de la superficie⁵ (figura 1).

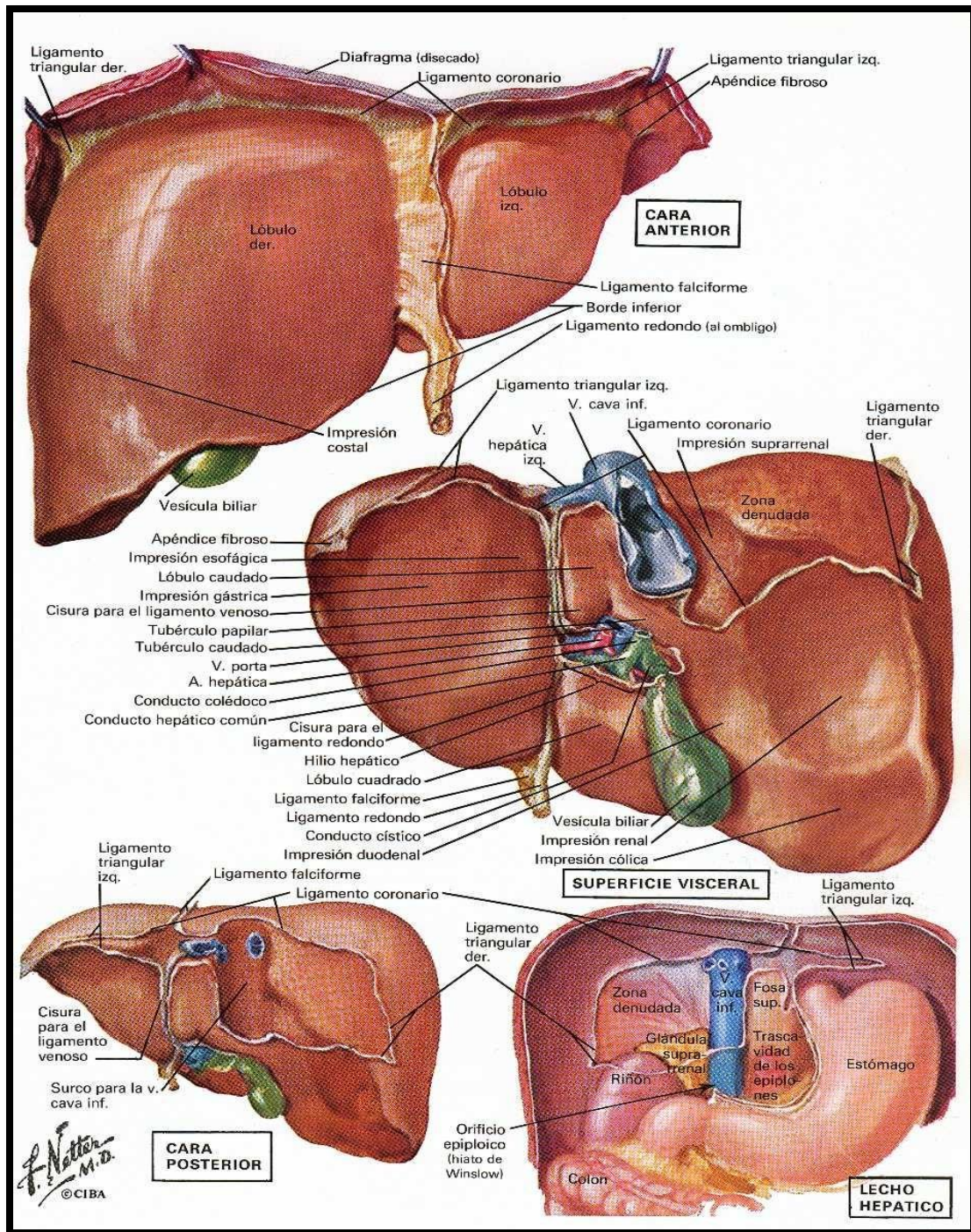


Figura 1. Anatomía del hígado humano.

El hígado se divide en dos sectores y ocho segmentos con suministro sanguíneo aferente y eferente independientes y canales biliares sin circulación colateral entre los segmentos⁷. Estos últimos están numerados en el sentido del reloj del 2 al 8, con el lóbulo caudado como una parte autónoma o segmento. La organización estructural del hígado refleja sus importantes funciones. Este órgano es único en el cuerpo, está dotado de funciones específicas, entre el tracto digestivo y el resto del cuerpo. La razón de esta interposición es porque el hígado está provisto con un suministro sanguíneo dual, es el primer órgano que tiene contacto con la sangre del intestino; recibe la sangre de la vena porta rica en nutrientes y pobre en oxígeno en adición a su vascularización por la arteria hepática⁵ (figura 2). Las funciones que desempeña este órgano, son vitales por lo que sus patologías cobran vital importancia en el campo de la investigación, para el entendimiento tanto de la enfermedad como su desarrollo.

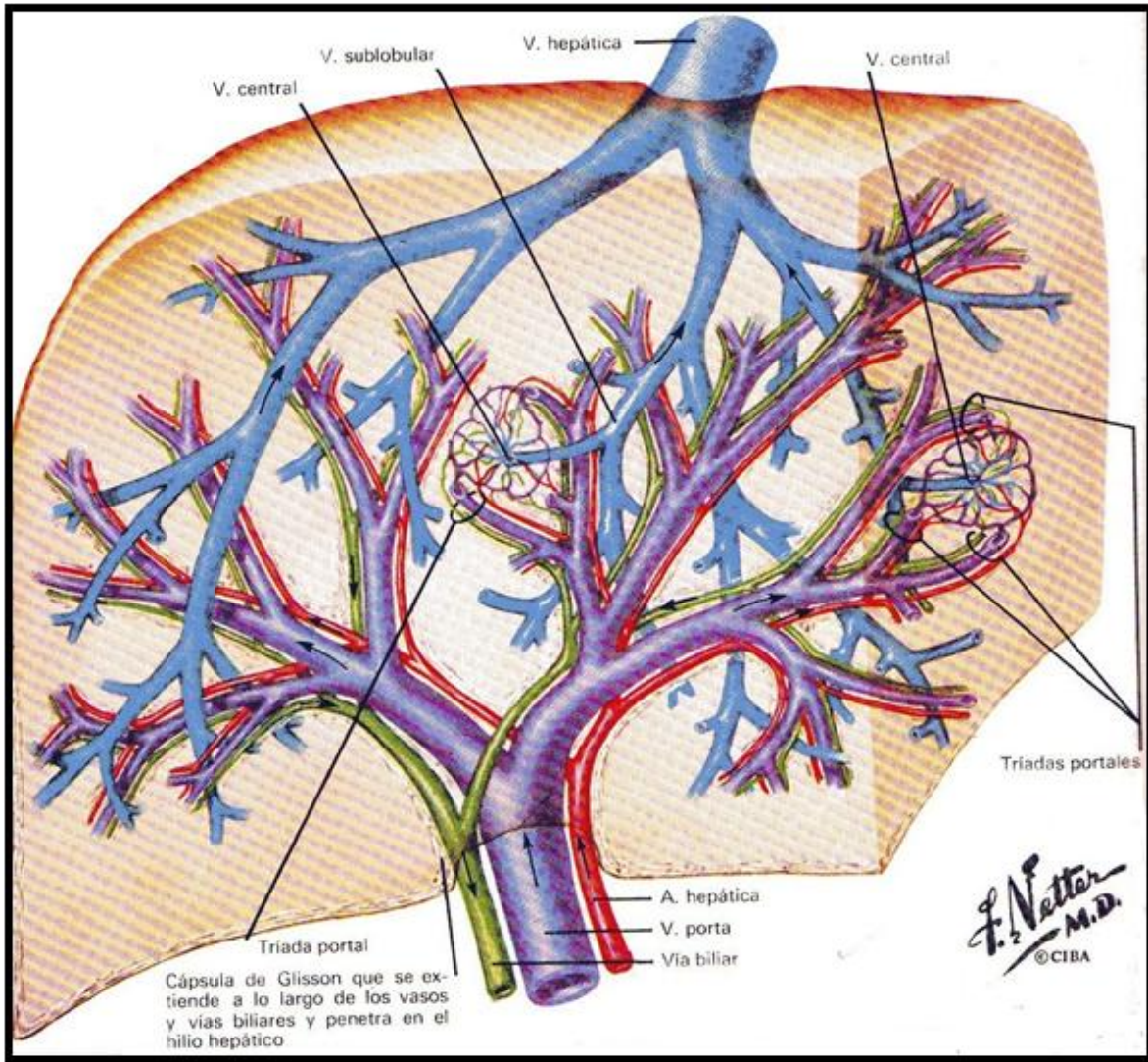


Figura 2. Vascularización del hígado.

1.3. El lobulillo hepático.

La unidad funcional básica del hígado es el lobulillo hepático, una estructura hexagonal de varios milímetros de longitud y de 0.8 a 2 milímetros de diámetro. El hígado humano contiene entre 50, 000 y 100, 000 lobulillos.⁷ El lobulillo hepático, el cual se ilustra en la figura 3, se constituye alrededor de una vena central que desemboca en las venas hepáticas y luego, en la vena cava. El propio lobulillo se compone en esencia, de múltiples placas celulares hepáticas, que se alejan de la vena central como los radios de una rueda. Cada placa hepática suele estar formada por dos células y entre las células adyacentes se encuentran pequeños canalículos biliares que drenan en los conductos biliares, en los tabiques fibrosos que separan los lobulillos hepáticos adyacentes⁸.

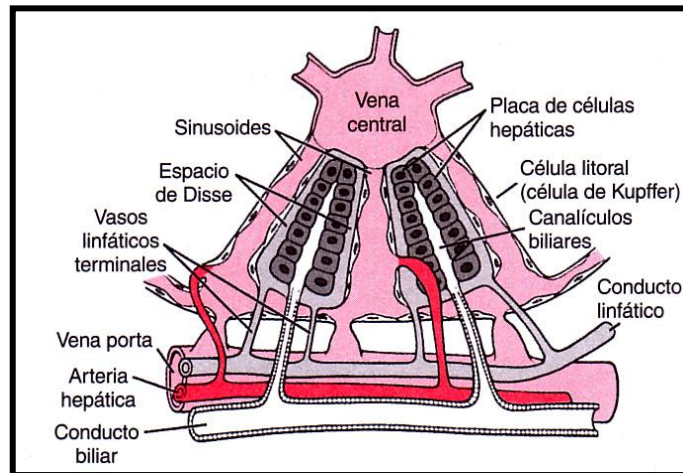


Figura 3. Estructura básica del lobulillo hepático.

1.4. Los tipos celulares del hígado.

El hígado se compone de cinco diferentes tipos celulares que abarcan cerca del 80% de su volumen, el 20% restante lo ocupan los espacios extracelulares y los componentes de la matriz extracelular. Los hepatocitos son las células más grandes y las más abundantes ya que constituyen el 60 o el 70% de la masa hepática, es decir, casi alrededor de las dos terceras partes del mismo; los otros cuatro tipos celulares se conocen como células no parenquimatosas o sinusoidales y son menores en tamaño, estas son: las células de Kupffer, las células de Pit, las células de Ito o estelares y las células endoteliales⁹.

I.4.1. Los hepatocitos.

Los hepatocitos son células poligonales de 20-30µm de diámetro, se disponen laminarmente, de una o dos células de espesor. Según su localización dentro del lobulillo, manifiestan diferentes propiedades estructurales, histoquímicas y bioquímicas. Además, no sólo hacen contacto entre ellas, sino que bordean un espacio (el espacio de Disse) y por esto se dice que el mismo hepatocito tiene distintos dominios dentro de su citoplasma. La función de los hepatocitos es de reserva de metabolitos, almacenan lípidos, glucógeno, aminoácidos, vitaminas, etc. Son células de secreción endógena y exógena, ya que secretan bilis hacia la vesícula biliar y muchas otras sustancias a la circulación sanguínea. Viven alrededor de 150 días⁷. En roedores, la capacidad regenerativa del hígado después del daño (ya sea por fármacos hepatotóxicos o resección hepática) es alrededor del 75%. Esta capacidad en humanos es mucho menor⁷.

I.4.2. Las células de Kupffer.

Las células de Kupffer son los macrófagos residentes del hígado y se cree que son migratorias ya que no establecen uniones intercelulares con las células vecinas. Se relacionan con las células del revestimiento sinusoidal. Su función consiste en fagocitar parásitos, virus, bacterias y macromoléculas (como inmunocomplejos y endotoxinas bacterianas) por endocitosis mediada por receptores. Por lo tanto, estas células constituyen una poderosa e importante barrera fagocítica para las toxinas y los microorganismos provenientes del intestino. Una vez activadas, estas células secretan numerosos productos con potentes efectos biológicos, incluidas proteasas y citocinas con influencia sobre el parénquima y otras líneas celulares sinusoidales⁴.

I.4.3 Las células de Pit.

Se sitúan en la pared sinusoidal y por su polaridad están en relación, principalmente con las células endoteliales, pero también se encuentran, a veces, entre una célula endotelial y una célula de Kupffer. Son células con pseudópodos citoplasmáticos que penetran en el revestimiento endotelial y que interdigitan con las microvellosidades de los hepatocitos¹⁰. Pertenecen a los grandes linfocitos granulares con actividad de células asesinas naturales.

Parecen tener, por su localización, un rol defensivo contra infecciones virales y metástasis tumoral⁴.

I.4.4 Las células estelares.

Las células estelares (HSC ó células de Ito) fueron identificadas originalmente por Wilhelm Kupffer en el año de 1870¹¹, redescubiertas por Ito y Remoto, en 1952, y confirmadas por microscopía electrónica por Yamagishi, en 1959. Estas células ocupan una localización perisinusoidal, es decir, se encuentran alrededor del sinusoides y constituyen un tercio de las células no parenquimatosas del hígado. Son las principales almacenadoras de vitamina A en el organismo; en el hígado normal, no son proliferativas, y en condiciones normales se encuentran en estado quiescente pero ante cualquier estímulo inflamatorio, sufren una transdiferenciación y se convierten en las principales productoras de las proteínas proinflamatorias y profibróticas, liberadas por el daño a los hepatocitos y pueden modular la inflamación crónica a través de la secreción de citocinas⁴. Las HSC juegan un papel en el mantenimiento de la matriz extracelular por la síntesis y la secreción de sus componentes normales y su degradación por las proteasas. Así, las HSC tienen cuatro funciones principales en el hígado normal^{4, 8}:

- 1) Producción y mantenimiento de la matriz extracelular,
- 2) Control del tono microvascular,
- 3) Almacenamiento de retinoides,
- 4) Control de la regeneración en el hígado normal y en la respuesta a la necrosis.

I.4.5. Las células endoteliales.

Las células endoteliales son células de superficie lisa que recubren el endotelio vascular intrahepático y desempeñan diversas funciones en varias reacciones biológicas, incluyendo el transporte activo, la coagulación, la fibrinólisis, la inflamación, y la respuesta inmune, la regulación de la presión sanguínea, la angiogénesis, el metabolismo de lípidos, y la síntesis de componentes estromales; son similares a las células del endotelio vascular en general^{4, 8}.

1.5. La circulación hepática.

La circulación sanguínea del hígado es de naturaleza dual. Sirve para la distribución intrahepática de la sangre, se compone de la arteria hepática, a presión elevada, y de la vena porta, a baja presión, que están perfectamente armonizadas. Los sinusoides hepáticos difieren de los otros capilares en que tienen una permeabilidad mayor para las proteínas². Aproximadamente, el 80% de la sangre que entra al hígado es pobre en oxígeno y rica en nutrientes, proveniente de la vena porta. Por otro lado, la sangre proveniente de la arteria hepática es altamente oxigenada. Una vez en el hígado, la sangre de estos dos vasos se mezcla y recorre el hígado a través de los sinusoides hepáticos para alcanzar las venas centrolobulillares, las que drenan hacia venas sublobulillares que por medio de las venas hepáticas o supra hepáticas, se vacían en la vena cava inferior, y de ahí a la circulación sistémica y pulmonar. Tanto la vena porta como la arteria hepática, convergen en el hilio hepático junto con los ductos biliares⁹. (figuras 4 y 5).

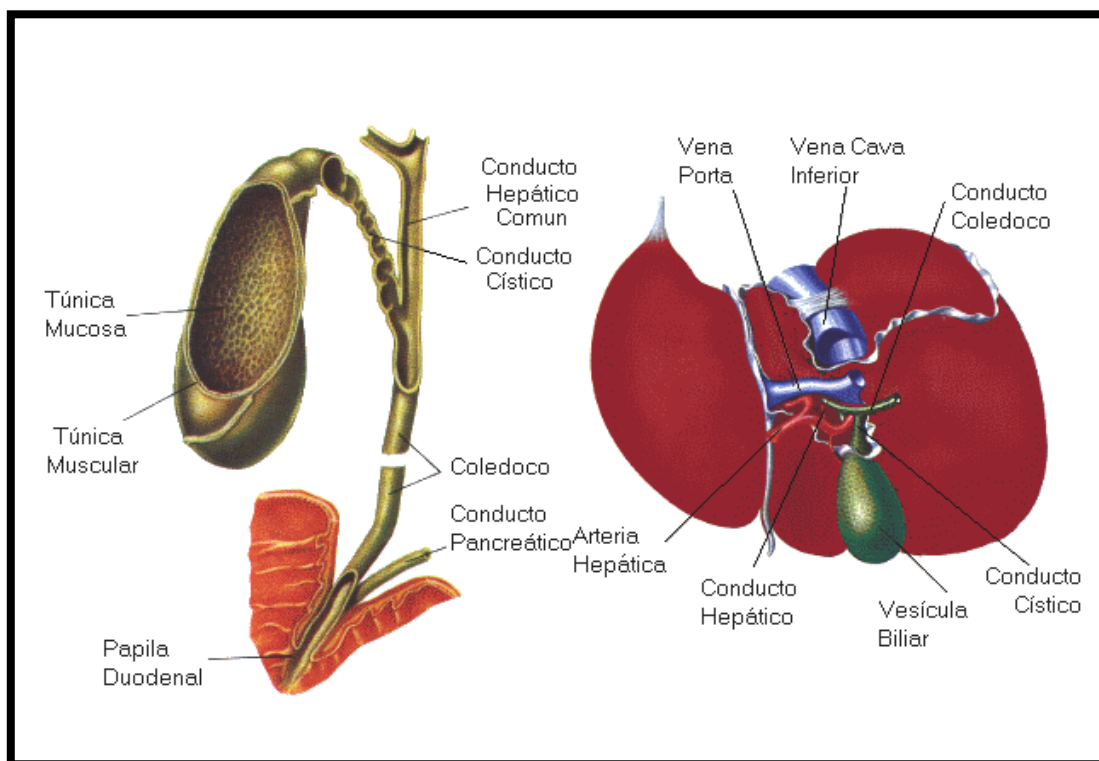


Figura 4. Distribución de los vasos hepáticos y los conductos biliares.

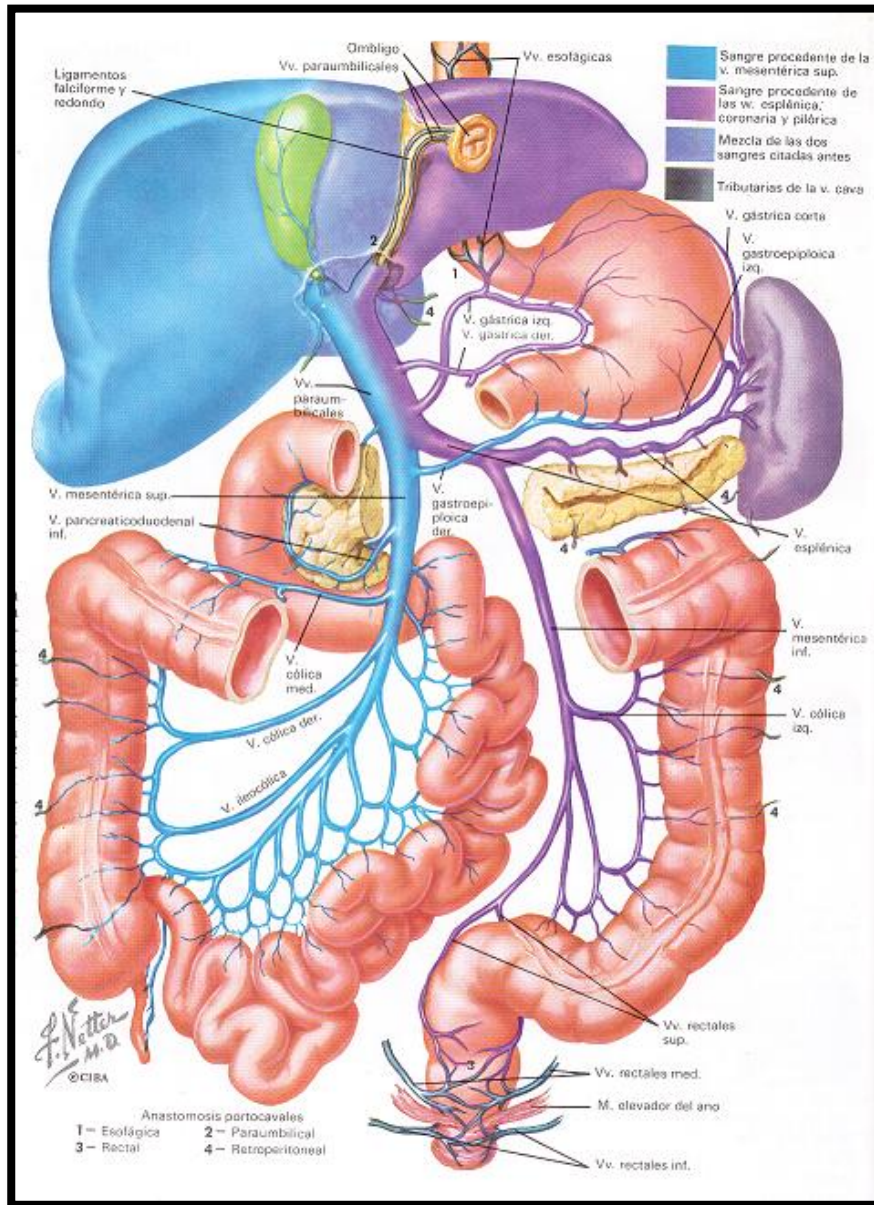


Figura 5. Circulación hepática.

I.6. Las funciones del hígado.

El hígado es una glándula mixta exocrina y endocrina, cuyas funciones son efectuadas en gran parte por los hepatocitos. El hígado es un órgano muy versátil, debido a que mantiene una posición estratégica entre la circulación intestinal y la general, y de acuerdo con sus dimensiones alberga una gran cantidad de sangre y líquido extracelular, el hígado ejerce una influencia principal sobre el volumen y los constituyentes de la sangre circulante. El hígado actúa como una esponja que puede llenarse o congestionarse o vaciarse y causar una sobrecarga a la circulación pulmonar². La acción de filtro del hígado se deriva también de su peculiar localización anatómica, ya que todos los elementos nutritivos, así como las materias nocivas absorbidas por los intestinos son aportados al hígado a través del sistema portal². La función exocrina del hígado es la de producir la bilis. Por otro lado, la función endocrina consiste en la regulación de los niveles de glucosa en sangre en presencia de insulina y en la síntesis de una gran variedad de productos (la albúmina, el fibrinógeno, la mayor parte de las globulinas, las proteínas de la coagulación, las lipoproteínas plasmáticas, etc.).

I.6.1. El almacenamiento de las vitaminas.

En los seres humanos, el hígado actúa como el principal depósito de vitamina A, tanto que podría prevenir su deficiencia por 10 meses. El retinol (vitamina A preformada) se transporta del hígado a otros sitios del cuerpo mediante una proteína específica, la proteína fijadora de retinol (PFR). La carencia de esta proteína puede influir en el almacenamiento de vitamina A y reducir la síntesis de la PFR.⁷ También almacena (aunque en cantidades menores) vitamina B12 y vitamina D, pudiendo prevenir su deficiencia por 12 y 4 meses, respectivamente⁷.

I.6.2. La elaboración de la bilis.

La función excretora de este órgano consiste en la elaboración y la eliminación de la bilis por las vías biliares, la bilis es elaborada también por las células epiteliales hepáticas y contiene los pigmentos biliares característicos, las sales de los ácidos biliares, el colesterol y otros numerosos componentes. Se excreta en los capilares biliares y abandona el hígado a

través del sistema de conductos biliares intrahepáticos y alcanza el duodeno a través de los conductos biliares extrahepáticos⁷ (figura 4).

I.6.3. El metabolismo de los carbohidratos.

Dentro del metabolismo de los carbohidratos, el hígado es especialmente importante para el mantenimiento de la glucemia dentro de los límites normales. El almacenamiento de glucógeno permite al hígado extraer el exceso de glucosa en sangre, almacenarlo y luego devolverlo a la sangre cuando la glucemia empieza a descender de manera peligrosa. La gluconeogénesis hepática se ocupa, por su parte, del mantenimiento de la glucemia dentro de la normalidad, puesto que sólo se activa de forma importante cuando la concentración de glucosa desciende por debajo de los valores normales. Entonces, grandes cantidades de aminoácidos y de glicerol de los triglicéridos se convierten en glucosa y contribuyen a mantener la glucemia dentro de límites normales⁷.

I.6.4 El metabolismo de las grasas.

Aunque el metabolismo de las grasas puede ocurrir en casi todas las células de la economía, algunos aspectos del mismo se producen con mayor rapidez en el hígado que en las demás células. Las funciones específicas del hígado en el metabolismo de los lípidos son las siguientes:

- Un porcentaje elevado de la beta-oxidación de los ácidos grasos y la formación de ácido acetoacético.
- Formación de la mayor parte de las lipoproteínas.
- Formación de cantidades considerables de colesterol y fosfolípidos.
- Conversión de grandes cantidades de carbohidratos y proteínas en grasas.

Cerca del 80% del colesterol que se sintetiza en el hígado se convierte en sales biliares que se segregan a la bilis; el resto se transporta con las lipoproteínas por la sangre hacia las células de los tejidos. Los fosfolípidos también se sintetizan en el hígado y se transportan sobre todo con las lipoproteínas. Las células utilizan el colesterol y los fosfolípidos para

formar las membranas, las estructuras intracelulares y numerosas sustancias químicas esenciales para el funcionamiento celular.⁴

I.6.5. El metabolismo de las proteínas.

La síntesis hepática de urea elimina el amoníaco de los líquidos corporales. Mediante la desaminación se producen grandes cantidades de amoníaco. Así pues, si falla el hígado para sintetizar urea, la concentración plasmática de amoníaco se eleva con rapidez y provoca un coma hepático y la muerte^{4, 7}. En principio, casi todas las proteínas del plasma, con excepción de algunas gammaglobulinas, se forman en las células del hígado, es decir, alrededor del 90% de todas las proteínas plasmáticas. Por otro lado, las sustancias formadas en el hígado para la coagulación son el fibrinógeno, la protrombina, la globulina aceleradora, el factor VII y algunos otros factores.

I.6.6. La detoxificación de los xenobióticos y los fármacos.

La función de detoxificación del hígado es realizada por una variedad de reacciones químicas tales como la oxidación, la metilación, la acetilación, la esterificación y la conjugación con ácido glucorónico y glicina, de las cuales, especialmente la última ha sido utilizada en el diagnóstico funcional de las enfermedades del hígado².

I.7. El daño hepático.

Las funciones del hígado pueden alterarse y producir enfermedades hepáticas. Las alteraciones de la funcionalidad hepática pueden darse de manera aguda (hepatitis) o crónica (fibrosis, cirrosis) dependiendo del agente etiológico y del tiempo de exposición a dicho agente¹².

I.7.1 El daño agudo.

El daño hepático agudo ocurre cuando se produce un daño masivo al hígado, lo que produce la pérdida súbita de masa hepática funcional hasta en un 70%. La necrosis del tejido hepático es característica de este tipo de daño¹².

La hepatitis es una enfermedad inflamatoria que afecta al hígado. Su causa puede ser infecciosa (viral, bacteriana, etc.), inmunitaria (por autoanticuerpos, hepatitis autoinmune) o tóxica (por ejemplo por alcohol, venenos o fármacos). Hay virus específicos para la hepatitis (virus hepatotropos), es decir, aquellos que sólo provocan hepatitis. Existen muchos tipos de virus pero los más importantes son los virus A, B, C y, en menor medida, el D y el E; F y G son los últimos descritos y los menos estudiados^{11,12}.

I.7.2. El daño crónico.

El daño crónico está caracterizado por un daño moderado a los hepatocitos de manera periódica, lo que conduce al desarrollo de la fibrosis, que progresa a cirrosis, si persiste el agente que produce el daño¹².

La cirrosis es un padecimiento crónico caracterizado por un daño generalizado, formación de nódulos de regeneración y fibrosis que distorsionan la arquitectura del hígado. Secundarios a las alteraciones anatómicas, hay disturbios funcionales y hemodinámicos.¹²

En la cirrosis se acepta que la regeneración nodular del parénquima hepático y la aparición de tabiques fibrosos de tejido conectivo producen trastornos de la circulación hepática, con reducción de la masa de hepatocitos, inflamación y necrosis en diferentes grados¹³.

La cirrosis resulta de la alteración de la homeostasis del hígado por uno o más de los muchos agentes biológicos o químicos conocidos como causantes del daño hepático definido como una alteración funcional en cualesquiera de las células que componen el sistema hepático sin tener en cuenta si producen muerte celular¹³.

I.8. Mediadores moleculares del daño hepático.

La patogénesis del daño hepático y la fibrosis involucran complicadas interacciones entre las diferentes poblaciones de células presentes en el hígado, factores solubles como citocinas y la matriz extracelular. Diversas citocinas como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), así como las interleucinas 1 β , 6, 10 (IL-1 β , IL-6 e IL-10) participan en el daño de los hepatocitos y de las células endoteliales del sinusoides. El factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) y el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) se consideran citocinas fibrogénicas que contribuyen a la activación de las HSC que son el tipo de células responsables de aumentar la producción de la matriz extracelular durante el

proceso fibrogénico¹³. Las células de Kupffer parecen ser las responsables de mediar la segunda fase de la necrosis hepatocelular. La producción de citocinas en el hígado depende frecuentemente de su liberación de las células de Kupffer como una respuesta temprana a un estímulo inicial¹⁴.

I.8.1. Factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB).

El factor transcripcional κB (NF-κB) juega un papel central en la homeostasis del hígado, en la patofisiología y en la regulación de eje inflamación-fibrosis-cáncer¹⁵. Desde su descubrimiento en 1986, el NF-κB ha recibido mucha atención debido a su activación por diversos estímulos y los diversos roles que desempeña en la homeostasis del tejido, así como control del desarrollo de la enfermedad, y en la regulación de la supervivencia celular y en la activación de las respuestas inmunoadaptativas e innatas^{13, 15}. El NF-κB está constituido por dos subunidades: una de 50 kDa, (subunidad p50) y una de 65 KDa, (subunidad p65), también conocida como RelA¹⁶. El NF-κB es un heterodímero que se encuentra inactivado en el citoplasma al estar unido a la subunidad inhibitoria IκB. La fosforilación, iniciada por eventos tales como la unión de TNF-α a su receptor, seguida por la degradación de IκB por proteosomas, desencadena la activación del NF-κB. Después de la degradación de IκB, el dímero p50/p65 se activa y se transloca al núcleo y se une a la secuencia motivo consenso de DNA de sus muchos genes inducibles^{15, 17} (figura 6).

El NF-κB regula la transcripción de genes que participan en la mayoría de las respuestas inflamatorias. Este factor regula la expresión de varias citocinas proinflamatorias, entre las que se encuentran el propio TNF-α y la IL-1β, lo que amplifica la respuesta inflamatoria.¹⁵

Diversos reportes sugieren que el factor NF-κB puede ser un candidato que vincula el daño hepático celular y el estrés oxidativo con un incremento en la producción de citocinas citotóxicas^{15, 17}.

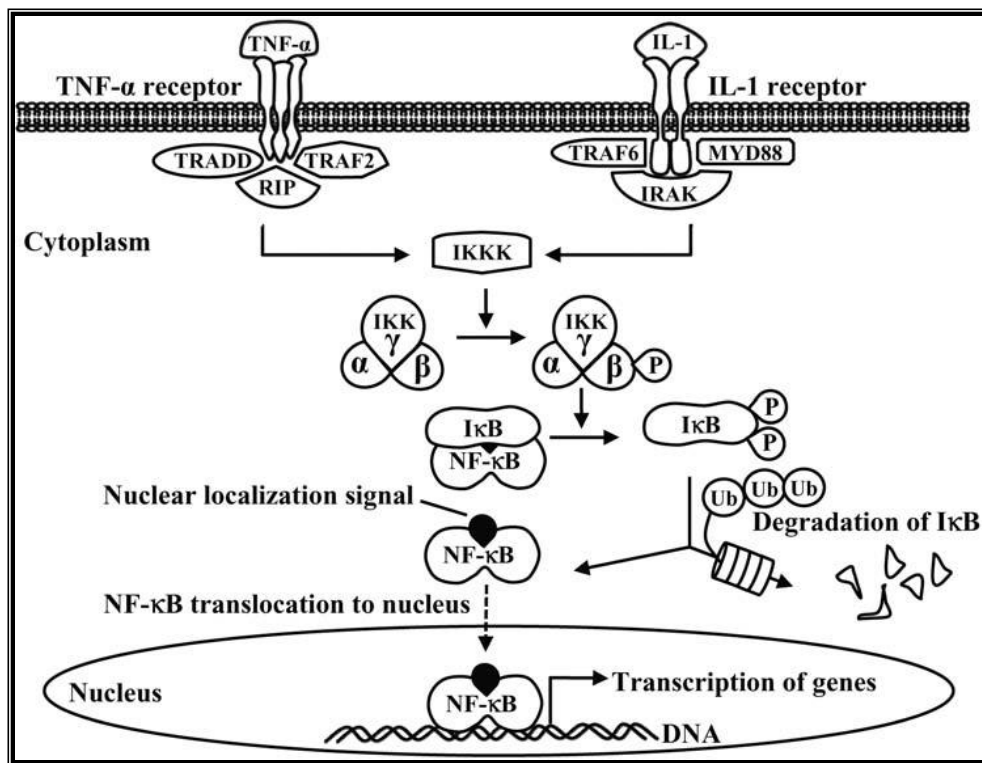


Figura 6. Vía de activación del factor transcripcional NF-κB.

I.8.2. El TGF-β.

El TGF-β es el miembro mejor estudiado de una familia de factores de crecimiento celular, ubicuos, multifuncionales y esenciales para la supervivencia, que tienen un papel importante para el desarrollo embrionario, la proliferación celular, la inflamación, la reparación de los tejidos y la respuesta inmunitaria^{18, 19}. Durante los años ochenta, fue descubierto por Anita Roberts y Michael Sporn como un factor que hacía crecer células normales en cultivo. Existen 5 isoformas de TGF-β en diferentes organismos. El TGF-β pertenece a una superfamilia de factores de crecimiento que incluye tres isoformas para TGF-β (1,2,3) y otros factores variados, como la BMP, las activinas, las inhibinas y la hormona antimülleriana²⁰⁻²². La molécula mayormente estudiada es TGF-β1 y es la que se utiliza como factor de referencia²³.

EL TGF- β es una proteína homodimérica producida por una gran variedad de células, como plaquetas, células endoteliales, linfocitos y macrófagos. Se sintetiza como un precursor inactivo, que debe ser escindido proteolíticamente para generar la proteína activa. Esta se une a dos receptores celulares (tipo I y II) con actividad serina-treonina cinasa, y desencadena la fosforilación de factores citoplasmáticos denominados smads, de los que existen diferentes formas (1,2,3,5,8). El TGF- β tiene diversos efectos, a veces opuestos, en función del tipo de tejido afectado y el tipo de daño. Se encuentra en todos los tejidos, pero de manera particular y abundante en hueso, pulmón, riñón, y placenta; es producido por muchos de los tipos celulares parenquimales, linfocitos, monocitos, macrófagos y plaquetas. Además, el TGF- β tiene potentes efectos sobre la acumulación de los componentes de la matriz extracelular, de tal forma que puede así desempeñar ciertos roles en la regulación del crecimiento y el metabolismo de las células del hígado y en el desarrollo de la fibrosis. El TGF- β ejerce su acción sobre las células diana a través de la unión a receptores de la superficie celular²⁴. En general, la liberación y activación de esta citocina estimula la producción de varias proteínas de matriz extracelular e inhibe la degradación de esas proteínas, aunque existen excepciones a la regla. Por ejemplo, puede contribuir a la reparación del tejido bajo ciertas condiciones. En algunos casos, el TGF- β se encuentra sobreexpresado, tal es el caso de la hepatectomía y en enfermedades hepáticas²⁴, lo que contribuye al exceso patológico de tejido fibrótico y en consecuencia la función normal del órgano se encuentra comprometida.

I.8.3. Las interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-10.

Las citocinas o interleucinas son proteínas que regulan la función de las células que las producen u otros tipos celulares. Son los agentes responsables de la comunicación intercelular, inducen la activación de receptores específicos de membrana, funciones de proliferación y la diferenciación celular, la quimiotaxis, el crecimiento y la modulación de la secreción de inmunoglobulinas.

El nombre genérico “interleucina” fue propuesto en 1979 para factores producidos y liberados por linfocitos T activados que actúan sobre otros linfocitos para producir efectos biológicos. De hecho, el grupo de interleucinas también incluye especies producidas primariamente por células de otros linajes hematopoyéticos, tales como los monocitos²⁵.

Existen dos formas para la IL-1: la IL-1 α y la IL-1 β , ambas son sintetizadas como proteínas precursoras más grandes de las cuales las moléculas activas se derivan por ruptura proteolítica. La IL-1 β tiene una masa molecular nativa de 17.3 kDa y es producida por monocitos y muchos otros tipos celulares. Hay dos tipos de receptores para IL-1 β , de alta y de baja afinidad y se hallan presentes en una amplia variedad de tipos celulares, proveyendo a esta citocina un papel universal en la regulación de las actividades celulares, en general, la IL-1 β media dos clases de efectos, la estimulación de las respuestas inmunes (incluyendo la inducción de la síntesis de otras citocinas) y la producción de las respuestas inflamatorias como la de las prostaglandinas²⁶. La IL-1 β se correlaciona fuertemente con TNF- α y se dice que comparten varias similitudes en sus efectos²⁷. La IL-6 tiene una masa molecular de 21 kDa, es sintetizada por linfocitos T, monocitos y muchos otros tipos celulares, lo que la convierte en una de las citocinas más ubicuas y activas. Muchos agentes aparentemente no relacionados, incluyendo virus, LPS bacteriano, IL-1 y ésteres de forbol, pueden conducir a la síntesis y secreción de IL-6. Esta citocina tiene un receptor ampliamente distribuido y su activación promueve actividades biológicas tan variadas que es difícil predecir cuáles son de mayor importancia; por ejemplo, cabe mencionar que la IL-6 es el mayor inductor de proteínas de fase aguda en el hígado en respuesta a un daño o a la inflamación y que este evento crucial está regulado por el TNF- α ¹⁹. En los pacientes cirróticos y hepáticos se observan niveles séricos altos de citocinas proinflamatorias importantes como las interleucinas IL-6 e IL-1 β , producidas por células no parenquimatosas del hígado²⁷. Ambas citocinas, la IL-6 y la IL-1 β , se elevan en sangre durante el daño séptico inducido por un reto con endotoxina (o lipopolisacárido, LPS) en ratas cirróticas, las que son más susceptibles a tal agente tóxico^{28, 29}. IL-6 e IL-1 β median la aparición endógena de promotores e inhibidores del estrés oxidativo en hígado²⁹. Importantly, ambas interleucinas modulan a las células estelares que producen la colágena y a otras citocinas durante los procesos fibrogénicos en la cirrosis³⁰.

La IL-10 es una citocina antiinflamatoria por excelencia y es quizás la más potente e importante. Esta citocina fue identificada en 1989 como un inhibidor de la síntesis de citocinas producido por un subgrupo de linfocitos T murinos denominados células T-helper-2 (Th2). Tiene una masa molecular de 18.5 kDa y es una citocina con una amplia actividad inmunoreguladora. Es producida por muchos tipos celulares incluyendo

monocitos, macrófagos, linfocitos T, células B, células dendríticas, células troncales y varias líneas celulares tumorales. Sus principales funciones biológicas son limitar y terminar las respuestas inflamatorias, bloquear la secreción de citocinas proinflamatorias y regular la diferenciación y proliferación de muchas células inmunológicas como las T y B, naturales asesinas, entre otras. La IL-10 actúa sobre receptores específicos; en el humano la IL-10 se enlaza a un complejo tetramérico de dos receptores. Los receptores generan su señal por medio de la cinasa Janus-1 y el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (JAK1-STAT3) y activa al supresor de señalización de citocinas-3 (SOCS-3) para inhibir finalmente a la misma vía que le dio origen. Se sabe que algunos de los efectos de la IL-10 pueden ser explicados por las acciones inhibitorias sobre el factor de transcripción NF- κ B³¹. La producción de IL-10 ha sido demostrada dentro de los hepatocitos, las células sinusoidales, las células de Kupffer, las células estelares y los linfocitos asociados al hígado³². La IL-10 regula a la baja la producción de citocinas proinflamatorias como el TNF- α , entre otras^{25, 33}. Esta citocina posee las más amplias propiedades desactivantes sobre los macrófagos y los monocitos³³, actúa sobre: la producción de citocinas y quimosinas, la inducción de óxido nítrico (ON) y especies reactivas de oxígeno (ROS), inhibe la síntesis de eicosanoides y calmodulinas (CAM's); además, posee marcadas propiedades hepatoprotectoras.³³ Se ha demostrado que el efecto terapéutico de la IL-10 en la fibrosis hepática está relacionado con la remoción de los depósitos de fibras de colágena, así como, con la disminución del grado de inflamación³⁵.

I.8.4. Las metaloproteinasas (MMP's).

La MEC es el principal sostén de la arquitectura del parénquima hepático y permite diversas funciones. Para que las funciones se desempeñen de manera satisfactoria, es indispensable un equilibrio constante entre la síntesis y la degradación de dichas proteínas. Esta actividad es realizada por las MMP's, que tienen la capacidad de degradar cada uno de los componentes de la MEC²¹. Entre las MMP's más importantes están las colagenasas MMP-1, 8 y 13 las cuales inician la degradación del colágeno I, II y III, permitiendo que continúe su degradación por otras MMP's y enzimas proteolíticas no MMP's. Estas enzimas para ejercer su acción dependen de cofactores como el calcio y zinc. Las colagenasas intersticiales operan clivando el colágeno en fragmentos $\frac{3}{4}$ y $\frac{1}{4}$ de colágena,

que, por sí solos son fácilmente desnaturalizados y transformados en gelatina. La metaloproteinasa-1 (MMP-1), que es expresada en bajas cantidades por una gran variedad de células como las endoteliales, las epiteliales y los macrófagos. La MMP-1 realiza la proteólisis de la colágena intersticial directamente sobre la triple hélice de la colágena, aproximadamente en el tercer cuarto de la molécula. Su activación depende de la metaloproteinasa-3 (MMP-3)^{36, 37}. La MMP-1 tiene un peso molecular de 55 kDa como zimógeno y 45 kDa como una forma activa y su gen se encuentra localizado en el locus 11q22.2³⁶. Su estructura se encuentra agrupada en el dominio simple de hemopexina³⁷. La metaloproteinasa-9 (MMP-9), es un ávido proteolítico de las gelatinas y por su estructura, se clasifica dentro del grupo de región de unión a gelatinas^{37, 39}. Sus principales productoras son las células de Kupffer³⁷. Es considerada como una de las enzimas más activas durante el curso de la enfermedad. También se conoce como gelatinasa B y su locus está en el gen 20q13.12³⁹. Su tamaño es de 92 kDa/ 86 kDa y es activada por la MMP-3³⁷. La metaloproteinasa-3 (MMP-3) es una de las pocas MMP's que no tiene especificidad hacia un solo sustrato, cuenta con un amplio margen de degradación como laminina, fibronectina, proteoglicanos y en menor grado algunos tipos de colágena y gelatina. La principal fuente celular de esta enzima son las HSC.³⁷ Tiene la capacidad de activar a la MMP-1 y MMP-9, las cuales son muy importantes para la degradación de proteínas de MEC durante la fibrosis.⁴⁰ Se sintetiza como una proenzima latente con un peso molecular de 57 kDa y de 45 kDa activa. Pertenece a la familia de las estromelinas y estructuralmente al grupo de dominio simple de hemopexina⁴¹. La fibrosis hepática involucra múltiples eventos celulares y moleculares que inducen un excesivo depósito de proteínas de matriz extracelular que distorsionan la arquitectura del parénquima hepático, cuya etapa final es conocida como cirrosis. El daño proviene de una variedad de causas como abuso de drogas y enfermedades virales, autoinmunes, metabólicas y colestásicas. La degradación de estas proteínas de matriz ocurre predominantemente como una consecuencia de la acción de metaloproteinasas (MMP's) que degradan sustratos colágenos y no colágenos. La degradación de la matriz en el hígado se lleva a cabo principalmente por la acción de cuatro de estas enzimas: MMP-1, MMP-5, MMP-9 y MMP-13⁴¹.

I.8.5. EL CTGF.

El CTGF es un péptido rico en residuos de cisteína, con un peso molecular de 38 kDa, esta proteína, conocida originalmente como 3CH61, fue aislada a partir de los fibroblastos de ratón estimulados con suero y PDGF por Lau y Nathans en 1985⁴², en el medio condicionado de células endoteliales de vena del cordón umbilical. El péptido secretado está implicado en diversas enfermedades, como desordenes proliferativos, lesiones fibróticas, afecciones de la piel, aterosclerosis, fibrosis pulmonar y diversas patologías renales, donde se ha demostrado que se presentan niveles elevados de CTGF tisular, localizado principalmente en áreas fibróticas, así como en la aterosclerosis y otros trastornos fibróticos⁴³. La proteína secretada rica en cisteína Cyr61 fue el primer miembro de la familia de genes que fueron identificados. El CTGF es una glicoproteína multifuncional que posee un dominio para heparina; de manera normal se expresa en bajos niveles en diversos tipos celulares, sin embargo, en condiciones de fibrosis su expresión aumenta considerablemente⁴⁴.

El CTGF promueve el desarrollo de la fibrosis en conjunto con el TGF- β , aunque su mecanismo no se encuentra bien elucidado. El CTGF es inducido por el TGF- β y media los efectos mitogénicos del TGF- β en los fibroblastos⁴⁵, mientras que Cyr61 aumenta los efectos proliferativos del factor de crecimiento de fibroblastos en las células endoteliales⁴⁶,⁴⁷. Estudios celulares muestran que el CTGF regula múltiples procesos que contribuyen a la fibrogénesis, incluyendo la proliferación celular, la migración, la adhesión, la supervivencia y la producción de MEC de manera similar al TGF- β .

El CTGF afecta a diversos tipos celulares que participan en el proceso de la fibrogénesis, como células mesenquimales, las células estelares hepáticas, los podocitos renales, las células mesangiales, las células epiteliales tubulares y las parietales, entre otras como, las células mesoteliales, los cardiomiocitos y los fibroblastos⁴⁴. Estudios en modelos animales de la enfermedad hepática humana soportan la importancia de este factor y sus interacciones con el TGF- β en el proceso de fibrogénesis⁴⁷.

1.9. Modelos de daño hepático.

Los modelos de daño hepático proveen herramientas útiles para el estudio de las patologías del órgano. Casi todas las lesiones agudas o crónicas del hígado pueden ser inducidas experimentalmente. Estas incluyen necrosis (local, masiva o difusa), esteatosis, lesión venular hepática, y cirrosis de diferentes tipos morfológicos. Lesiones específicas tales como los cuerpos acidofílicos “libres” sinusoidales (cuerpos apoptóticos) anormalidades nucleares y nucleolares, pueden ser producidos por diferentes modelos experimentales de daño hepático. El proceso de colestasis también puede ser producido experimentalmente⁴⁸.

I.9.1. Daño hepático inducido con CCl₄ en rata.

El CCl₄ ha sido utilizado extensamente como solvente. Hoy en día, el CCl₄ demuestra ser un modelo muy útil para el estudio de ciertos efectos hepatotóxicos⁴⁹⁻⁵¹. Este agente, consistentemente, produce daño hepático en muchas especies, incluyendo primates no humanos. La toxicidad inducida con CCl₄ es dependiente de la dosis y del tiempo de exposición. A dosis bajas prevalecen efectos transitorios, como la peroxidación lipídica⁴⁹, y la pérdida de la homeostasis del calcio⁵⁰; así como la liberación de citocinas tanto nocivas como benéficas⁴⁹ y los eventos apoptóticos seguidos por una regeneración.

1.10. La hesperidina.

La hesperidina es un bioflavonoide cuyo nombre deriva del griego Hespérides que significa ninfas en la mitología griega⁵²; y se encuentra de manera abundante en las frutas cítricas. La hesperidina se extrae de la cáscara de naranja a diferentes concentraciones de acuerdo a las diversas variedades de cítricos, que pertenecen a la familia *Rutaceae*, y en plantas del género *Fabaceae*, *Betulaceae* y *Luminuseae*⁵². La hesperidina es ya conocida desde la antigüedad por sus propiedades terapéuticas, como son: el tratamiento de la retinopatía causada por la diabetes, disminución de la agregación plaquetaria y del flujo sanguíneo, como coadyuvante en casos de fragilidad capilar ya que contribuye a mantener la integridad de los vasos sanguíneos. De manera importante, la hesperidina destaca por sus propiedades antioxidantes, aunque posee también propiedades analgésicas, hipolipidémicas, antihipertensivas y diuréticas⁵³.

I.10.1. Las propiedades físico-químicas de la hesperidina.

La estructura química de la hesperidina corresponde a la de un glucósido flavonoide, el hesperetin 7-rhamnoglucósido. Tiene en su estructura grupos funcionales que le confieren la capacidad antioxidante, por lo que puede mostrar un efecto importante como hepatoprotector, también posee grupos fenil que le dan propiedades aromáticas⁵³ (figura 9). La hesperidina es una sustancia sólida (polvo), de color café claro (tabla 1); es estable en solución acuosa sin decremento en el contenido durante 2 meses a diferentes pH, excepto a pH 9⁵².

Tabla 1. Propiedades físicas de la hesperidina.

Solubilidad en agua	4.93 ± 0.99 µg/mL
Punto de fusión	258°-262 °C
Punto de ebullición	930 °C
Densidad	1.65 g/cm ³
Índice de refracción	1.695

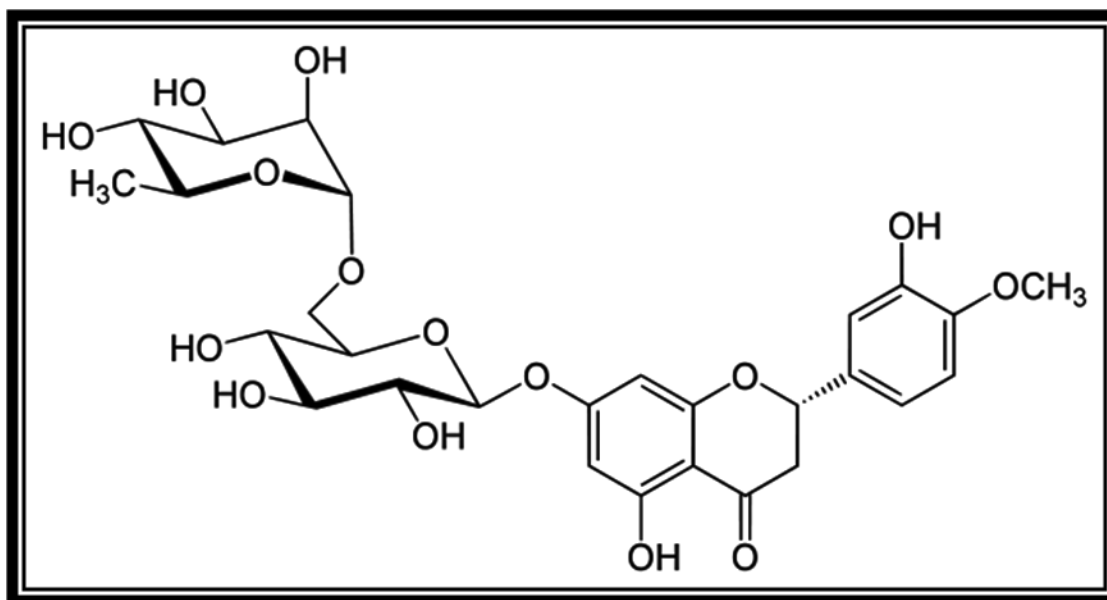


Figura 7 . Estructura química de la hesperidina.

I.10.2. Las propiedades farmacológicas.

Existen diversos estudios que se han realizado con la hesperidina para descubrir y/o confirmar las propiedades benéficas de este compuesto. En estudios recientes se ha reportado que la hesperidina reduce la presión sanguínea, teniendo un buen efecto como vasoprotector gracias a la inhibición de la enzima hialuronidasa, la cual ha sido reportada que regula la permeabilidad de las paredes capilares y los tejidos⁵⁴. La hesperidina exhibe también una significativa actividad antiinflamatoria al modular la síntesis de prostaglandinas y mediante la regulación de la actividad de la ciclooxygenasa inducible (COX-2)⁵⁵.

I.10.3. Las propiedades farmacocinéticas de la hesperidina.

Actualmente, el mercado de los flavonoides es muy extenso, ya que varios estudios nutricionales realizados recientemente demuestran que el consumo regular de flavonoides en frutas y vegetales va en aumento cada día, esto se debe a que el ser humano empieza a consumir productos que benefician su salud, y que ayudan a prevenir enfermedades, con el fin de mantener una vida saludable. Recientemente, los efectos benéficos en la salud han sido atribuidos a los flavonoides cítricos, los cuales han atraído la atención de diversos grupos de investigadores. Dichos compuestos muestran propiedades benéficas para diversas enfermedades ya que han mostrado actividad biológica en experimentos con animales y ensayos “in vitro” asociada con desórdenes carcinogénicos, cardiovasculares, inflamatorios, alérgicos y sanguíneos. Los bioflavonoides juegan un rol importante en la fisiología y en la ecología, además de su interés comercial por sus múltiples aplicaciones en la industria alimenticia, destaca de manera importante en la farmacéutica⁵³.

En la tabla 2 se muestran las propiedades farmacocinéticas de la hesperidina.

Tabla 2. Propiedades farmacocinéticas de la hesperidina.

Parámetro	En humanos ⁵⁵	En ratas ⁵⁶ .
C_{max}	≈900 nM	≈1.3 μmol
$T_{1/2}$	4.5-6.8 h	9- 12 h
Absorción	Intestino grueso y en menor proporción en el estómago e intestino delgado.	Intestino grueso y delgado
Eliminación	Vía urinaria a las 48 h de 5.4 a 8.9 % del total de la ingesta.	Vía urinaria entre las 8 -11h después de la ingesta.
Metabolismo	Se metaboliza en el hígado por reacciones de fase II (glucuronidación, y conjugación con sulfatos)	En hígado e intestino, sufre conjugación con β-glucurónidos.

1.11. La L-Teanina.

La L-teanina (γ -glutamiletilamida) es un aminoácido específico único presente en la planta del té verde (*Camellia sinensis*). Aunque también se ha encontrado en otras tres especies; una especie de setas (*Xerocomus badius*) y otras dos especies del género *Camellia*⁵⁸. Su nombre en chino es: 茶花; pinyin: Cháhuā. Es una de las 50 hierbas fundamentales usadas en la medicina tradicional china⁵⁹. La L-teanina constituye del 1.0-2.0 % del peso de las hojas del té verde lo que significa que constituye aproximadamente el 50 por ciento de los aminoácidos del té, y sólo se presenta en forma de aminoácido libre (no forma parte de las proteínas)⁵⁹; también contribuye de manera importante en el sabor de la bebida. Esta planta contiene una gran variedad de compuestos, incluyendo polifenoles, proteínas, aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas, minerales y pigmentos. La L-teanina se sintetiza en la raíz de la planta y se concentra en las hojas, donde la luz del sol convierte a la L-teanina en polifenoles. Debido a esto, algunos cultivadores siembran sus plantas en lugares donde no llega luz del sol de forma directa para preservar el contenido de teanina y, de esta manera, conservar también el sabor⁵⁹. Sakato, en 1949 descubrió el té verde. En 1950 el laboratorio del té en Kyoto separó exitosamente la L-teanina a partir de la hoja de *Gyokuro*, un tipo de

té verde fino, cultivado en condiciones especiales, y que posee el contenido más alto de L-teanina a diferencia de otros tipos de té. Sin embargo, no fue hasta 1964, cuando el ministro Japonés de Salud y Bienestar Social aprobó el uso de la teanina para su consumo universal⁵⁸. Actualmente, el té verde es la bebida que más se consume en el mundo después del agua. Se calcula que cada día se toman 1500 millones de vasos o tazas de esta bebida. El consumo de polifenoles (un tipo de antioxidantes) se ha asociado con la disminución de la inflamación y del colesterol, efectos que mejoran la salud cardiovascular, con un menor crecimiento de algunos tumores, con mejorías en la degeneración macular, el envejecimiento de la piel, y las infecciones de las vías urinarias, entre otros⁶⁰. Recientemente, los efectos benéficos de los compuestos contenidos en el té verde han atraído la atención de diversos grupos de investigadores.

I.11.1 Las propiedades físicoquímicas de la L-teanina.

La L-teanina es un aminoácido análogo del ácido glutámico y glutamina; existen dos isómeros de este compuesto, específicamente es un enantiómero levorrotatorio. Su nombre sistemático según la IUPAC es ácido 2-amino-4-(etilcarbamoyl) butírico. Su estructura química se observa en la figura 8. Su estructura posee grupos funcionales que le confieren la capacidad antioxidante, por lo que puede mostrar un efecto importante como hepatoprotector⁵⁸. La L-teanina es una sustancia sólida (polvo), blanca, cristalina de sabor dulce e inodoro.

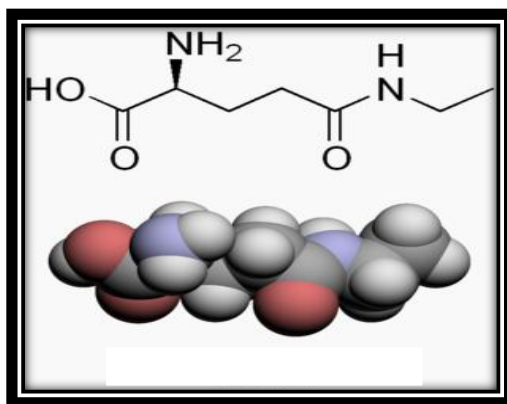


Figura 8. Estructura química de la L-teanina.

En la tabla 3 se observan las propiedades físicas de la L-teanina.

Tabla 3. Propiedades físicas de la L-teanina.

Solubilidad	Soluble en agua, insoluble en etanol y éter
Punto de fusión	204- 207 °C
Descomposición	214-215 °C
Temperatura de almacenamiento	0-5 °C

La L-teanina cruza la barrera hematoencefálica, vía el sistema transportador de aminoácidos neutros⁶².

I.11.2. Las propiedades farmacológicas.

En estudios recientes se ha reportado que la L-teanina tiene un efecto relajante por la inducción de la actividad de las ondas cerebrales alfa, que se relacionan con la percepción de un estado de relajación^{62, 63}. Tiene efecto antihipertensivo ya que reduce la presión sanguínea⁶⁴, además de ello, la L-teanina tiene un efecto aditivo junto con la quimioterapia al reducir el transporte del ácido glutámico hacia el interior de la célula, disminuyendo así los niveles de glutatión dentro de la célula, y aumentando la concentración del fármaco en las células tumorales por inhibición del flujo de la salida de diversos agentes quimioterapéuticos^{64, 65}.

I.11.3 Las propiedades farmacocinéticas de la L-teanina.

La L-teanina es un compuesto que se absorbe en el intestino delgado. En ratas, el pico de concentración plasmática se encontró 30 minutos después de la ingesta oral^{66, 67}. La teanina atraviesa la barrera hematoencefálica mediante el sistema de transporte de los aminoácidos grandes neutros (de preferencia por leucina). Se ha visto en ratas que cuando la teanina llega al cerebro, incrementa tanto la producción de serotonina como de dopamina⁶². La teanina se hidroliza en el riñón en ácido glutámico y etilamina, por la enzima glutaminasa⁶⁶.

En la tabla 4 se presentan las propiedades farmacocinéticas de la L-teanina.

Tabla 4. Propiedades farmacocinéticas de la L-teanina.

Parámetro	En humanos	En ratas
C_{max}	400µg/ml	400µg/ml
T_{1/2}	30 min.	9- 12 h
Absorción	Intestino delgado.	Intestino delgado
Eliminación	Vía urinaria a las 6 h	Vía urinaria a las 6 h.
Metabolismo	Hidrólisis en riñón a ácido glutámico y etilamina, por la glutaminasa	Hidrólisis en riñón a ácido glutámico y etilamina.

II. JUSTIFICACIÓN

La cirrosis es un problema de salud muy importante tanto en países desarrollados como en los llamados del tercer mundo. En México, según el Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS) en su última actualización reporta que la cirrosis y otras enfermedades hepáticas crónicas se encuentran dentro de las diez principales causas de mortalidad en mujeres y hombres en séptimo y tercer lugar, respectivamente. Sin embargo, estas cifras aumentan cuando se trata de mujeres y hombres en edad productiva (15-64 años) ocupando tan solo el tercer y segundo lugar según sea el caso.¹

Hay varias causas de la cirrosis, ésta es originada por infecciones bacterianas, virus, diversos agentes tóxicos, consumo elevado de etanol, y obstrucción de los conductos biliares, entre otros. Las alternativas para el tratamiento de estas patologías son reducidas y únicamente son útiles para disminuir los síntomas de la enfermedad y para incrementar el nivel de calidad de vida de los pacientes cirróticos. Debido a esto, surge la necesidad de ampliar el conocimiento sobre las enfermedades hepáticas, con la finalidad de diseñar y proponer nuevos medicamentos útiles para su tratamiento, a fin de prevenir y evitar que estas enfermedades progresen hasta una etapa avanzada donde el daño es irreversible y donde la única opción es el trasplante del órgano.

En este trabajo se pretende evaluar el efecto hepatoprotector de la hesperidina y de la L-teanina para prevenir el daño hepático agudo y crónico en nuestros modelos experimentales de daño en la rata, y evaluar si estos compuestos inhiben al factor de transcripción NF- κ B, y con ello modular la producción de citocinas profibrogénicas y proinflamatorias;^{68, 69} se sabe que la hesperidina puede regular la expresión de la MMP en ratas, a pesar de que no se conoce el mecanismo, se ha demostrado que esta regulación ocurre por la vía de factor de transcripción NF- κ B en células HepG2⁶⁸. Por otro lado, en estudios recientes se ha demostrado que la L-teanina inhibe al NF- κ B⁶⁹ aunado a su capacidad antioxidante. Dados estos antecedentes, se postula que la hesperidina y la L-teanina tendrán un efecto anti-necrótico aunado a un posible efecto antifibrogénico en la cirrosis experimental en rata, mediante la inhibición y/o inducción selectiva de la producción de algunas citocinas involucradas en el daño hepático que son reguladas por el mencionado factor NF- κ B, restableciendo así su equilibrio, esperando que estos compuestos surjan como una alternativa en el tratamiento del daño hepático causado por diversas etiologías.

III. HIPÓTESIS

La hesperidina y la L-teanina poseen propiedades antioxidantes, por lo tanto serán capaces de prevenir el daño hepático crónico inducido por CCl₄ en la rata. Sin embargo, el efecto de ambos compuestos será mayor debido a su capacidad inmunomoduladora sobre el NF-κB y las citocinas, mismas que durante el daño hepático pierden su balance entre las citocinas anti y proinflamatorias y las citocinas anti y pro-fibrogénicas, favoreciendo la instalación y perpetuación de la cirrosis. Por lo tanto, se espera que tanto la hesperidina como la L-teanina tengan un buen efecto hepatoprotector.

IV. OBJETIVOS

IV.1. General.

Evaluar el efecto de la hesperidina y de la L-teanina en el daño hepático experimental en la rata.

IV.2. Específicos.

- Evidenciar el efecto antioxidante de la hesperidina y la L-teanina en los modelos de daño hepático crónico experimental.
- Determinar la capacidad de la hesperidina y de la L-teanina en la prevención de la cirrosis hepática inducida con CCl₄ en la rata.
- Evaluar si la hesperidina y la L-teanina inhiben al NF-κB en nuestro sistema de prevención.
- Demostrar si la hesperidina y L-teanina poseen capacidad moduladora de las citocinas profibrogénicas, proinflamatorias y antiinflamatorias en los modelos de prevención de la cirrosis hepática inducida con CCl₄.

V. METODOLOGÍA

Para cumplir con los objetivos planteados se utilizaron ratas Wistar macho; las cuales siguieron el esquema de tratamiento descrito a continuación:

V.I Modelo de prevención con hesperidina

Daño Crónico: 8 semanas

Vía de administración: intraperitoneal (i.p) y fármacos vía oral (p.o)

Grupo 1. Control (petrolato líquido 0.5 ml / 100 g, i.p)
Grupo 2. Daño CCl ₄ (0.4 g / kg, i.p)
Grupo 3. Hesperidina (200 mg / kg, p.o)
Grupo 4. Hesperidina + CCl ₄

V.II Modelo de prevención con L-teanina

Vía de administración: intraperitoneal (i.p) y fármacos vía oral (p.o)

Grupo 1. Control (petrolato líquido 0.5 ml / 100 g, i.p)
Grupo 2. Daño CCl ₄ (0.4 g / kg, i.p)
Grupo 3. L-teanina (4.0 mg / kg, p.o)
Grupo 4. L-teanina + CCl ₄

VI. DETERMINACIONES EXPERIMENTALES

Después de concluir el tratamiento de cada grupo de los dos modelos de daño, los animales se anestesiaron para obtener una muestra de sangre por punción cardíaca y extraer el hígado. Se tomaron muestras de tejido hepático para realizar las determinaciones experimentales. Al finalizar dichas determinaciones se realizó un análisis estadístico de los datos obtenidos, y se comenzó la parte experimental para la determinación de la expresión de las proteínas. La metodología de inicio se detalla en un diagrama de bloques, (ver figura 9 y 10). Para obtener el plasma, la sangre se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos.

En el plasma se determinó:

- 1) La actividad de la enzima γ -glutamyl transpeptidasa (γ -GTP).
- 2) La actividad de la enzima alanina- aminotransferasa (ALT).

En el hígado se cuantificó:

- 1) El grado de peroxidación lipídica.
- 2) El contenido de glucógeno.
- 3) El contenido de hidroxiprolina.

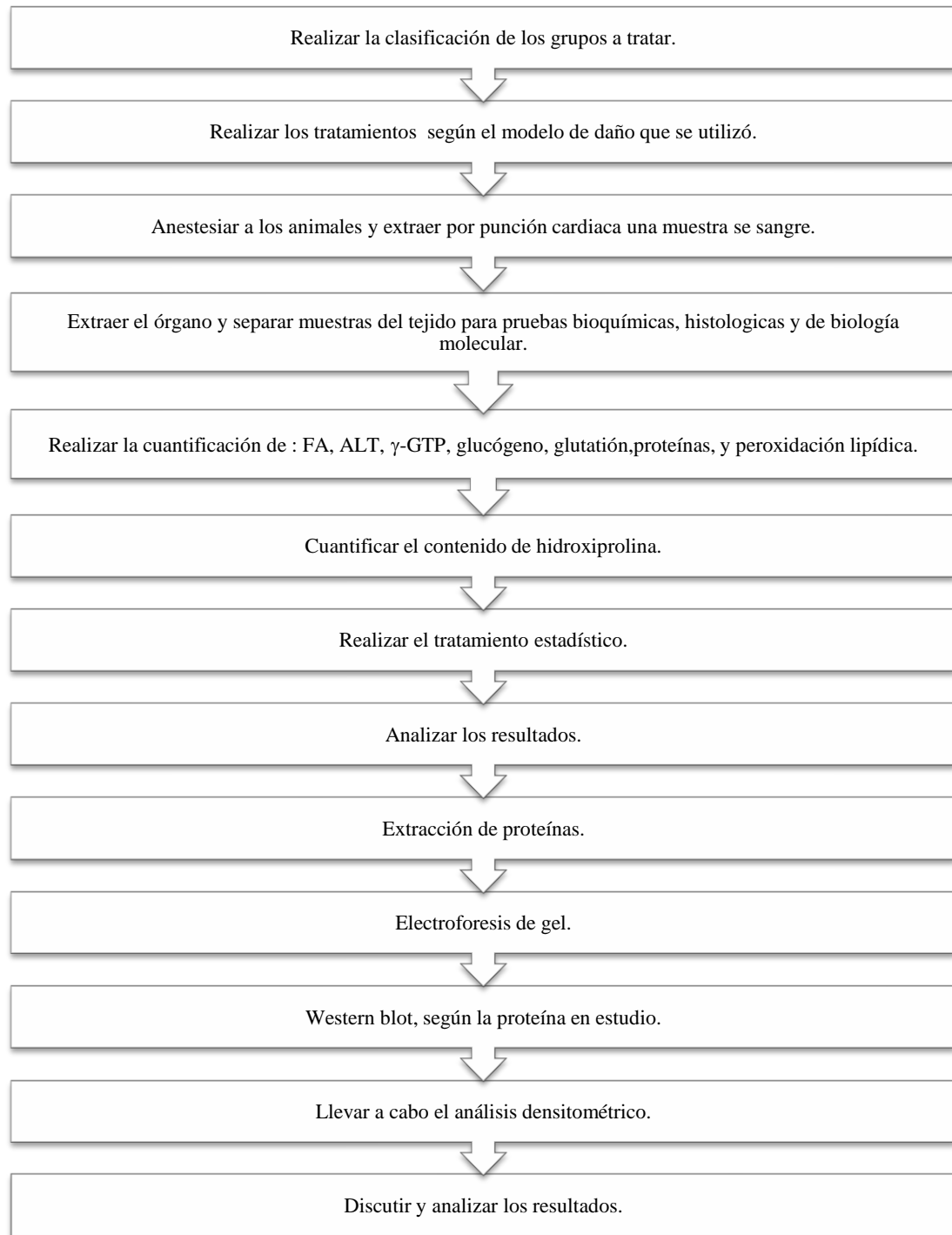


Figura 9. Diagrama de bloques de la metodología.

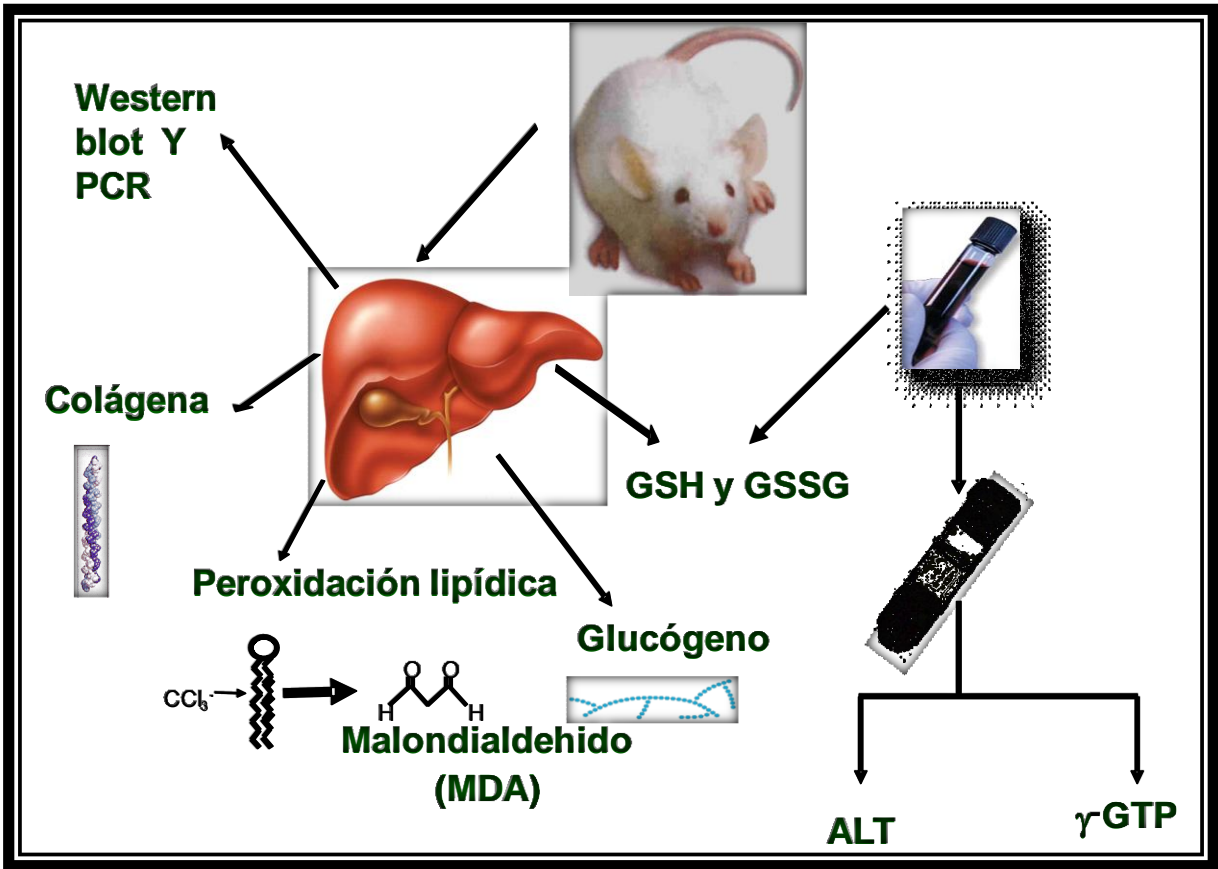


Figura 10. Determinaciones experimentales.

VI.1. Determinación sérica de la actividad de la enzima γ -glutamil transpeptidasa (γ -GTP).

La determinación de la actividad enzimática de la enzima γ -GTP se fundamenta en la reacción donde la γ -GTP cataliza la transferencia del grupo glutamilo desde el sustrato hasta la glicil-glicina formando la γ -glutamilglicilglicina y la *p*-nitroanilina. La velocidad de formación de *p*-nitroanilina es proporcional a la actividad de la γ -GTP presente en la muestra y se puede cuantificar con un espectrofotómetro a 410 nm.⁷⁰

Procedimiento:

En cada tubo se colocan:

- 400 μ L de Tris-HCl 200 mM, pH 8.2
- 100 μ L MgCl₂ 200 mM
- 100 μ L Glicil-glicina 40 mM, pH 8.2
- 200 μ L Gamma-glutamil-*p*-nitroanilida 10 mM.
- Previa incubación por 10 minutos a 37°C, se inicia la reacción con 200 μ L de suero.
- Se Incuba a 37°C por 30 min. y se detiene la reacción con 2 mL de ácido acético 1.5 M.
- Se lee a 410 nm y se cuantifica la *p*-nitroanilina producida mediante la curva estándar.
- Se hace un blanco sustituyendo los 200 μ L de suero por agua.

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

- Se realizó una curva de calibración (tabla 5).

Tabla 5. Cantidades utilizadas para preparar la curva de la γ -glutamyl transpeptidasa.

TUBO NO.	SOLUCIÓN 1 (μ l)	H ₂ O μ l)	nmoles/ml	μ moles/ml
1	50	1950	10	0.01
2	100	1900	20	0.02
3	150	1850	30	0.03
4	250	1750	50	0.05
5	375	1625	75	0.075
6	500	1500	100	0.1
7	750	1250	150	0.15
8	1000	1000	200	0.20

**Se Calibra, para esta determinación no se requiere
blanco.
Se lee la absorbancia a 410 nm.**

VI.2. Determinación sérica de la actividad de la enzima alanina aminotransferasa (ALT).

La actividad de la enzima alanina aminotransferasa se determina por el método de Reitman y Frankel⁷¹, en el que se mide el complejo colorido formado por el piruvato y la 2, 4 dinitrofenilhidrazina, que absorbe a 515 nm.

- Se rotulan los tubos blanco y problema para cada muestra.

La determinación se realiza de la siguiente manera (tabla 6):

Tabla 6. Cantidades de reactivos requeridos para la determinación de la actividad de la enzima ALT.

		BLANCO (mL)	PROBLEMA (μ L)
1.-	Solución de sustrato	0.25	0.25
2.-	Suero Problema	-----	0.05
3.-	Se mezcla y se agita suavemente, se incuba a 37 ° C durante 60 minutos.		
4.-	Reactivo cromógeno	0.25	0.25
5.-	Suero problema.	0.050	-----
6.-	Se incuba a 37 ° C durante 15 minutos		
7.-	NaOH 0.4 N.	2.5	2.5
8.-	Se leen los tubos a 515 nm.		

En la tabla 7 se muestra el procedimiento de la curva de calibración del piruvato.

CURVA ESTÁNDAR DE PIRUVATO

1. Se preparan las siguientes soluciones:

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

Solución de sustrato: Se disuelven 1.78 g de D/l alanina y 30 mg de ácido alfaoxoglutarico en solución buffer; se añade 0.5 ml de hidróxido de sodio 1 N y se completa hasta 100 ml con solución buffer. Se conservan a 4 °C.

Reactivo cromógeno: Se disuelven 200 mg de 2,4 dinitrofenilhidrazina en ácido clorhídrico 1 N caliente y se completa hasta un litro con HCl 1N y la solución preparada es 1 mM.

Solución estándar de piruvato: (1 $\mu\text{mol/ml}$). Se disuelven 11 mg de piruvato sódico en 100 ml de solución buffer. Se prepara el mismo día que se utiliza.

Tabla 7. Curva estándar para la alanina aminotransferasa.

Reactivos	TUBO NO.						
	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
Buffer 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
μmoles de piruvato	----	0.025	0.05	0.075	0.1	0.125	0.150

VI.3. Determinación del contenido de glucógeno hepático.

La determinación del glucógeno hepático se realizó con la técnica de la antrona⁷².

1) Se pesan 0.5g. de hígado en tubos de tapón esmerilado, a los cuales se les adiciona 1.5 mL de KOH al 30%, se tapan y se hierven en baño de agua durante 30 minutos.

2) Después de enfriarlos, se pasa la solución a un matraz volumétrico de 25 mL, y se afora con agua agitando muy bien.

3) Del matraz anterior se toman de 40 a 160 μ L con pipeta volumétrica, se lleva a 1.0 mL en tubos de 13x100 esmerilados, por duplicado, se prepara además un tubo blanco con 1 ml de H₂O y otros 2 estándares con 20 μ L de una solución de glucosa estándar (1 mg/mL) y se llevan a 1.0 mL con agua.

4) Se prepara una solución de antrona 0.2% en H₂SO₄ concentrado. Se añaden 2.0 mL a cada tubo agitando suavemente (con ayuda de una bureta) y se enfrían sobre hielo.

5) Se tapan los tubos fríos y se ponen en un baño de agua hirviendo por 15 minutos.

6) Se enfrían de inmediato sobre agua con hielo, y se leen a 620 nm.

CÁLCULOS

20 X A(mtra)

_____ = μ g de glucógeno en la alícuota

1.11 X A(std)

A(mtra) = Absorbancia de la muestra.

A(std) = Absorbancia del estándar.

Se expresaron los resultados como gramos de glucógeno/100 g de hígado.

VI.4. Determinación del grado de peroxidación lipídica.

Esta técnica es colorimétrica y se basa en el método del ácido tiobarbitúrico.⁷³

Reactivos:

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

Procedimiento:

- Se pesan 0.5 g de hígado.
- Se homogeneizan en 5 mL de agua.
- Se toman 300 μ L del homogenado al 10% y se agregan 700 μ L de Tris-HCl 150 mM para completar 1.0 mL.
- Se incuba a 37°C por 30 minutos.
- Se agregan 2.0 mL de TBA al 0.375% disuelto en TCA al 15 %.
- Se ponen los tubos a ebullición por 45 minutos.
- Se centrifugan a 3000 rpm por 10 minutos y se leen los sobrenadantes a 532 nm.

Cálculos:

$$C=A/\xi l$$

Donde:

- A Es la absorbancia de la muestra
- l Es la longitud de la celda (1 cm para el Shimadzu UV-1203)
- ξ Es el coeficiente de extinción del Malondialdehído (MDA)= 1.56×10^5 $\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$.

Se hace una dilución 1:10 del homogenado y se toman 20 μ L para determinar las proteínas. El resultado se expresa como nmoles de MDA/mg proteína.

VI.5. Determinación de las proteínas por el método de Bradford.

Esta determinación se efectúa por el método de Bradford⁷⁴, en el que las proteínas se unen al azul brillante de Coomasie. Este último presenta dos coloraciones, rojo y azul. La forma de color rojo se convierte en azul cuando se une a las proteínas.

Tabla 8. Cantidades de reactivos para preparar reactivo de Bradford.

Reactivos:	
• Ácido Fosfórico al 85 %	100 mL
• Alcohol Etilico	50 mL
• Azul de Coomasie G-250	100 mg
• Se afora con agua a un litro.	

Procedimiento:

1. Se toman 100 μ L de homogeneizado de hígado y se llevan a 1,000 μ L con agua tridestilada.
2. Se toman alícuotas para proteínas y se llevan a 100 μ L con agua (de la dilución anterior tomar 20 μ L + 80 μ L de agua tridestilada).
3. El blanco se prepara con 100 μ L de agua.
4. Se añaden 2.4 mL del reactivo de Bradford
5. Se lee la absorbancia a 595 nm.
6. Se prepara una curva de calibración utilizando albúmina bovina sérica (1mg/mL). Con: 0, 10, 15, 25, 30, 35, 40, 45, 50 μ L, de esta solución.
7. Se aforan los tubos con agua a 100 μ L.

VI.6. Determinación del contenido de colágena (hidroxiprolina).

La técnica se basa en el método descrito por Rojkind y González.⁷⁵

1. Se pesan 0.1 g de hígado de rata previamente secado con papel filtro y se colocan en una ampolleta.
2. Se agregan 2.0 mL de HCl 6N y se sellan las ampolletas con el mechero o soplete, posteriormente, se colocan a 100° C en el horno durante 24 h.
3. Una vez hidrolizada la muestra, se destapan las ampolletas y se colocan nuevamente en el horno a temperatura de 60° C, aproximadamente 24 h o hasta que sequen.
4. Las muestras ya secas se resuspenden con 2.0 mL de solución amortiguadora (sol.1); se agitan vigorosamente en el vórtex y se vacían en tubos de ensayo, se lavan las ampolletas con la adición de 1 ml de la misma solución.
5. Se centrifuga a 3000 rpm durante 15 minutos.
6. En un tubo conteniendo una pequeña porción de anorita, se deposita el sobrenadante y se agita durante un minuto, posteriormente se centrifuga a 3000 rpm por 15 minutos, si el sobrenadante no queda claro se repite este paso.
7. Se toma 1 mL del sobrenadante más 1.0 mL de H₂O y 1.0 mL de cloramina T (sol. 2). Se deja reposar exactamente 20 minutos a temperatura ambiente.
8. Se adicionan 0.5 ml de tiosulfato de sodio 2.0M, 1 mL de NaOH 1.0N y aproximadamente 2.0 g de NaCl. Se agita inmediatamente para detener la reacción.
9. Se agrega a cada tubo 6.0 mL de tolueno y se agita durante 1 minuto.
10. Se extrae la capa de tolueno y se desechan. Se tapa la capa acuosa y se coloca en un baño de agua hirviendo durante 20 minutos.
11. Se enfrían los tubos 15 minutos preferentemente en el refrigerador. Ya fríos, se adicionan 6.0 mL de tolueno y se agita durante 1 minuto.
12. De la fase de tolueno se toman alícuotas por duplicado de 1.0 mL, se agregan 4 ml del reactivo de Ehrlich, y se agita fuertemente.
13. Se deja reposar durante 30 minutos para que se lleve a cabo la reacción colorida.
14. Se lee a 560 nm.

Reactivos:

Solución 1. Amortiguadora de acetato de sodio – ácido cítrico. pH 6 (Relación para un litro):

- 50 g de ácido cítrico.
- 120 g de acetato de sodio ($3\text{H}_2\text{O}$).
- 34 g de hidróxido de sodio.
- 15 mL de ácido acético glacial.

La solución amortiguadora se mantiene en refrigeración y es estable durante varios meses.

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

- 0.141 g de cloramina T
- 2.0 mL de agua destilada
- 3.0 mL de etilenglicol
- 5.0 mL de solución amortiguadora.

Esta solución se debe preparar en el momento de usarse.

Solución 3. Reactivo de Ehrlich.

- a) Se toman 27.4 mL de H_2SO_4 concentrado y se agregan lentamente a 200 mL de etanol absoluto en un vaso sobre hielo.
- b) Se pesan 120g de p-dimetilaminobenzaldehído y se disuelven en 200 mL de alcohol absoluto.
- La mezcla ácido-etanol (a) se agregó lentamente y con agitación a la solución (b), en hielo, el recipiente se cubrió con papel aluminio (solución fotolábil). Se agitó durante 15 minutos, se sacó del hielo y se siguió agitando hasta que se disolvió.

La solución se puede almacenar en el refrigerador por varias semanas.

Los cristales que precipitan por el enfriamiento se disuelven calentando la solución en baño María, agitándola.

Solución 4. Solución de ninhidrina:

- 2.50 g de ninhidrina.
- 60.0 mL de ácido acético 6.0 N.

Para conocer la cantidad de hidroxiprolina se realizó la curva de calibración (tabla 9), en la cual se interpolaron los valores de absorbancia de las muestras problema.

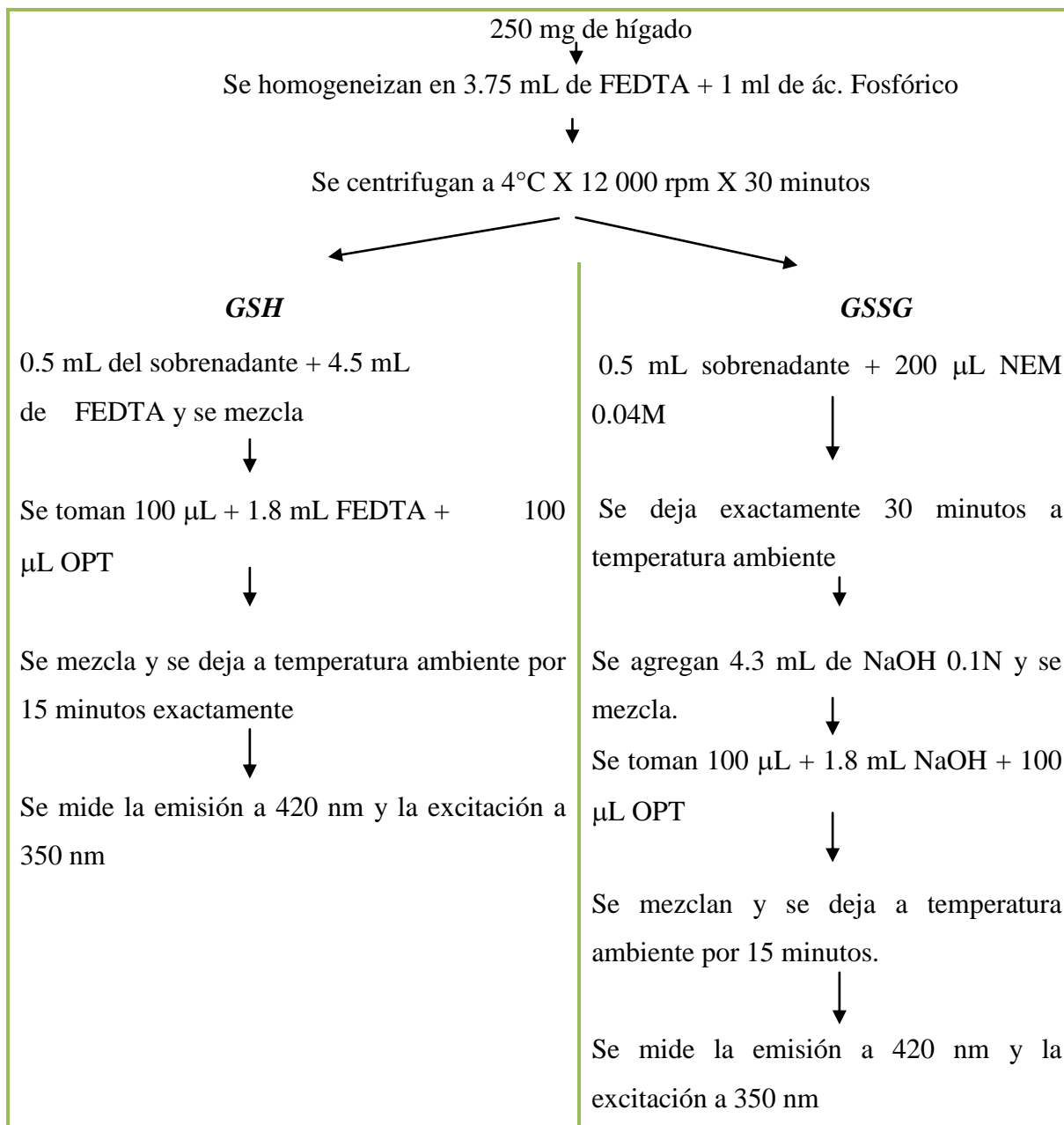
Tabla 9. Curva estándar de hidroxiprolina.

Tubo	HP (μ l)	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	----

VI.7. Determinación de los niveles de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) en el hígado.

Este parámetro fue evaluado como indicador de estrés oxidativo a nivel membranar. La determinación se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento mostrado en la tabla 10.

Tabla 10. Diagrama para la determinación de los niveles de glutatión reducido y glutatión oxidado en el hígado.



Para conocer la cantidad de GSH y GSSG se elaboraron dos curvas de calibración (tablas 11a y 11b) para interpolar los valores de absorbancia obtenidos de las muestras problema.

Tabla 11a. Curva estándar de GSH fluorométrico.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GSH(μg)	0	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4	0.45	0.5
GSH (μl)	0	5	7.5	10	12.5	15	17.5	20	22.5	25
FEDTA (ml)	1.90	1.895	1.8925	1.890	1.8875	1.885	1.8825	1.880	1.8775	1.875
OPT (μl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Se mezcla bien y se deja a temperatura ambiente por 15 minutos.										
Se obtiene la intensidad de fluorescencia a 350 nm de excitación y 420 nm de emisión										

Tabla 11b. Curva estándar de GSSG fluorométrico.

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GSSG (μg)	0	0.1	0.2	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.1
GSSG (μl)	0	5	10	20	25	30	35	40	45	55
NaOH (ml)	1.90	1.895	1.890	1.880	1.875	1.870	1.865	1.860	1.855	1.845
OPT (μl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Se mezcla bien y se deja a temperatura ambiente por 15 minutos.										
Se obtiene la intensidad de fluorescencia a 350 nm de excitación y 420 nm de emisión										

VI.8. Histología.

Las técnicas utilizadas fueron la tinción de Hematoxilina/Eosina (HE) para evidenciar el núcleo en color azul y el citoplasma de los hepatocitos teñido de color rosa y la segunda tinción fue la tricrómica de Masson (TM) donde se tiñen las bandas de colágena hepática en color azul, el núcleo celular en color negro y el citoplasma de color rojo. Se lleva a cabo el siguiente procedimiento común para ambas tinciones:

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

a) Tinción de HE.

1. Las rebanadas se desparafinan y rehidratan con xileno, alcohol absoluto y alcohol al 95%.
2. Se aplica la hematoxilina de Harris durante 15 min.
3. Se enjuaga en agua corriente por 2 minutos.
4. Se diferencia en alcohol ácido con 3 a 10 inmersiones.
5. Se verifica la diferenciación con microscopio, los núcleos deben distinguirse y el fondo debe ser de color muy tenue o incoloro.
6. Se sumergen en agua amoniacal o saturada de carbonato de litio hasta que las secciones fueron de color azul brillante.
8. Se lavan en agua corriente de 10 a 20 min.
9. Se tiñen con eosina de 15 s a 20 min dependiendo de la edad de la eosina y el grado de contraste deseado (contrateñido).
10. Se lavan con alcohol al 95%.
11. Se lavan con alcohol absoluto, al menos dos cambios de alcohol.
12. Se lavan con xileno 2 cambios de alcohol.
13. Se montan en el polímero Permound o bálsamo.

b) Tinción TM (Masson, 1948):

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

VII. ENSAYOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Para la determinación de la expresión proteica por medio del análisis de western blot de las proteínas: p-65, IL-1 β , IL-6, IL-10, MMP-13, TGF- β y CTGF fue necesario realizar extracciones proteicas totales del hígado.

VII.1. Obtención de proteínas totales por el método del Trizol®

Para obtener las proteínas totales del tejido hepático se utilizó el reactivo Trizol® (Invitrogen TM) y se siguió la técnica descrita a continuación con las medidas de seguridad e higiene necesarias (guantes y cubre bocas):

1. Se pesa 0.1 g de tejido hepático de la rata previamente congelado.
2. Se homogeniza con 1.0 ml de Trizol®.
3. Se mantiene el homogeneizado 5 minutos a temperatura ambiente y enseguida se adiciona 200 μ L de cloroformo y se agita durante 15 segundos.
4. De manera inmediata se centrifuga a 12 000 rpm por un periodo de 20 minutos a fin de obtener 3 capas.
5. Se adiciona a las proteínas 300 μ L de etanol absoluto al 96%.
6. Se agita manualmente de forma vigorosa.
7. Se deja reposar por un periodo de 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Se centrifuga por 10 minutos a 12 000 rpm y el sobrenadante se transfiere a un tubo eppendorf de 1.5 ml (se descarta el pellet)
9. Se adiciona de manera inmediata isopropanol hasta el volumen máximo del tubo.
10. Se deja reposar otro periodo de 20 minutos a temperatura ambiente
11. Se centrifuga a 12 000 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 4°C
12. Se descarta el sobrenadante.
13. Se adiciona al pellet obtenido hidrato de guanidina (0.3M en etanol al 95%), se agita y se recentrifuga por 10 minutos (se repite 2 veces).
14. Al concluir el tercer lavado, se desintegra el pellet con un homogeneizador, se utilizan 500 μ L de hidrato de guanidina.

-
15. Se adiciona hidrato de guanidina hasta el volumen máximo y se hace un lavado final.
 16. Se centrifuga a 12 000 rpm por un periodo de 15 minutos.
 17. Se desecha el sobrenadante, conservando el pellet.
 18. Se adiciona etanol al 96% hasta el volumen máximo del tubo y se agita vigorosamente utilizando vórtex
 19. Se deja reposar 10 minutos a temperatura ambiente.
 20. Se agita nuevamente en vórtex de manera vigorosa.
 21. Se centrifuga de 15 a 20 minutos a 12 000 rpm.
 22. Se elimina el sobrenadante.
 23. Se incuba el pellet a 58 °C por 2 minutos.
 24. Se adicionan 600 µL de SDS al 1% (dentro del baño) y se resuspenden las proteínas.
 25. Se dejan en el baño durante 5 minutos.
 26. Se centrifugan las proteínas obtenidas a 12 000 rpm por 35 minutos.
 27. Se deposita el sobrenadante en nuevos tubos eppendorf (se almacenan a -20°C, hasta su uso).
 28. Se cuantifican las proteínas utilizando el método del ácido bicinónico⁷⁶.

VII.2. Obtención de proteínas totales por el método de RIPA®

Antes de iniciar el procedimiento, se recomienda encender la centrífuga, y se preparan 10 mL de la siguiente solución (tabla 12):

Tabla 12. Cantidades de reactivos para preparar la solución de RIPA

Solución stock	Volumen (μL)	Concentración final
Trizma base pH 7.6	400	40 mM
NaCl	750	150 mM
EDTA pH 8.0	40	2.0 mM
Glicerol	1000	10%
Triton X100	100	1%
Deoxicolato de Na	500	0.5%
SDS	200	0.2%
H ₂ O	7010	-----

A la solución preparada se adicionan 800 μL de solución de una tableta de complete® en 2000 μL de H₂O milliQ.

Procedimiento:

1. Se pesan 100 mg de tejido hepático.
2. Se homogeneizan con 50 μL de solución RIPA.
3. Se adiciona nuevamente 50 μL de solución RIPA y se continua homogeneizando.
4. Se centrifuga a 10 000 rpm a 4°C durante 20 minutos .
5. Se separa el sobrenadante y se cuantifica el contenido de proteínas totales.

VII.3. Cuantificación de proteínas por el método del ácido bicinonínico.

Ya con las proteínas purificadas y conservadas a -20°C .

1. Se agita vigorosamente utilizando vortex
2. Se centrifugan las muestras de 10 000 a 12 000 rpm durante 16 minutos a -4°C (se observa un pequeño pellet y sobrenadante.)
3. Se separa el sobrenadante, evitando tocar el pellet, para guardarlo (para su uso en caso necesario)
4. Se pesa 0.2 g de ácido bicinonínico .
5. Se adicionan 5 mL de agua milliQ.
6. Se reserva la solución
7. Se realiza la curva de calibración utilizando como referencia albumina de bovino (BSA).
8. Se preparan las placas previamente lavadas y totalmente secas.
9. Se adicionan a los pocitos 1.0 μL de muestra y se completa a 100 μL con agua milli Q.
10. Se adicionan 200 μL de sulfato cúprico al 4.0% a la solución de ácido bicinonínico preparada previamente.
11. Se adiciona la solución anterior a cada pocito para completar 200 μL .

VII.4 Técnica de electroforesis de proteínas.

Para la realización de la electroforesis de proteínas se preparan las siguientes soluciones (tablas 13, 14, 15, 16, y 17):

Tabla 13. Solución de monómeros de acrilamida.

Acrilamida	60 gr
Bis-acrilamida	1.6 gr
H ₂ O	200 mL

Tabla 14. Solución buffer de corrida pH 8.3

Reactivo	Concentración	Cantidad
Tris Base	0.025 M	3.0 g
Glicina	0.192 M	14.4 g
SDS	1.0%	10 mL
H₂O milli Q	c.b.p	1000 mL

Tabla 15. Solución buffer de transferencia

Reactivo	Concentración	Cantidad
Tris Base	0.025 M	3.0 g
Glicina	0.192 M	14.4 g
H₂O milli Q	c.b.p	1000

Tabla 16. Solución para lavados TBS 1X tween pH 7.6

Reactivo	Cantidad
Tris- base	2.42 g
NaCl	8.7 g
H₂O c.b.p	1000
Tween 20	0.500

Tabla 17. Buffer de muestra 2X pH 6.8

Reactivo	Concentración final	Cantidad mL
Tris	0.1125 M	2.5
SDS	4%	4.0
Glicerol	20%	2.0
Mercaptoetanol	10%	1.0
H₂O	c.b.p	10.0
Azul de bromofenol	10%	0.01 g

1. Se realiza una electroforesis utilizando un gel de poliacrilamida al 12 % para separar las proteínas, y un gel concentrador al 4% preparados según la tabla 18:

Tabla 18. Cantidades para preparar los geles de corrida y concentrador

Gel 12 %		Reactivo	Gel 4%	
3.3	mL	H₂O	3.0	mL
4.0	mL	Bis-acrilamida	650	mL
2.5	mL (pH 8.3/1.5M)	Tris	1.25	mL (pH 6.8/0.5 M)
100	μL	SDS 10%	50	μL
100	μL	PSA 10%	25	μL
.004	μL	TEMED	5	μL

2. Se monta la cámara de electroforesis y se utiliza buffer de corrida.
3. Se hierven las muestras durante 5 minutos preparadas con el buffer de muestra 2X.
4. Se carga el gel con 50 μL de muestra y se utiliza 5.0 μL de marcador de peso molecular.
5. Se corre el gel de 90 a 100 V durante 2 horas.
6. Se activa la membrana con metanol durante 3 minutos.
7. Se realiza la transferencia del gel utilizando el buffer de transferencia descrito y utilizando una membrana de Immuno-Blot TM PVDF (Bio Rad, Hercules, CA, USA), a 300 mA durante 3 horas.

VII.5 Técnica de western blot.

1. Inmediatamente después de realizada la transferencia, se realiza un lavado rápido de la membrana con TBS 1X-tween , seguido de tres lavados de 5 minutos cada uno.
2. Después de ello, se bloquean las membranas con una solución de leche descremada al 5% (marca Sveltys) en una solución de tween-20 al 0.05% en TBS 1X, durante 1 hora a temperatura ambiente.
3. Se incuban las proteínas de manera independiente a 4 °C toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente: NF- κ B (p65), TGF- β , IL-1 β (MAB3026, MAB1032, AB1832, respectivamente de Millipore Corp., Billerica, MA, USA), IL-10 y CTGF (SC-57245 and SC14939, respectivamente de Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, CA).
4. Después de la incubación las membranas se lava y se exponen al anticuerpo secundario (anti- ratón monoclonal Zymed, San Francisco, CA, USA) en dilución 1:1500 para bloquear durante 1 hora a temperatura ambiente.
5. Se lavan las membranas y se revelan las proteínas.
6. Se utiliza el western lightningTM Plus-ECL Enhanced “Chemiluminescence detection system (NEN Life Sciences Products”, Elmer LAS inc., Boston, MA, USA.

VII.5.1 Técnica de revelado.

1. Se hace una mezcla suficiente vol/vol de los reactivos quimioluminiscentes.
2. Se agrega la mezcla a la membrana y se incuba durante 1 minuto.
3. Se pone la membrana en una placa de revelado con película auto adherente y se fija en la placa.
4. Se revela en el cuarto oscuro utilizando el revelador, agua y fijador sin mezclarse entre ellos.
5. Se abre la placa y se pone la película radiográfica en contacto con la membrana, por un tiempo adecuado.

-
6. Se saca la película y se pone en el revelador durante 1 minuto.
 7. Se saca la película del revelador y se enjuaga con agua
 8. Se pone la película en el fijador durante 1 minuto.
 9. Se enjuaga con agua y se seca.
 10. Se capturan las imágenes digitalmente con un equipo BioDoc-It Imaging System (UVP, Upland, CA)

Las membranas fueron incubadas con un anticuerpo anti ratón monoclonal contra β -actina⁷⁷, para ser utilizada como control de carga⁷⁸, se utilizó un western Lightning Plus-ECL Kit (PerkinElmer, Waltham, MA). Después de revelar y obtener las imágenes, a las membranas se les realizó un “stripping”, para ser reutilizadas con diferentes anticuerpos.

VII.6. Técnica de stripping.

El procedimiento del ensayo de stripping se describe a continuación:

1. Se lavan las membranas 4 veces con buffer de fosfatos a pH de 7.4 (0.015 M en NaCl al 0.9%).
2. Se sumergen las membranas en una solución buffer (2-mercaptoethanol 100 mM, en dodecyl sulfato de sodio al 2% y Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.7 por 30 min a 60° C
3. Se lavan las membranas 2 veces con agua corriente.
4. Se realizan 2 lavados más con agua bidestilada.
5. Finalmente se lavan las membranas 2 veces más por 15 minutos cada uno con buffer de fosfatos con tween al 0.05 %.

VII.7 Tratamiento estadístico.

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. De los resultados se obtuvo la media, la desviación estándar y el error estándar para cada uno de los diferentes indicadores medidos de los grupos tratados.

Para cada uno de los indicadores se aplicó un análisis de varianza de una sola variable con el fin de estimar diferencias significativas entre los diferentes grupos de tratamiento. Las medias de cada grupo se compararon por el método de Tukey, y se consideró que hubo una diferencia significativa cuando $p < 0.05$.

VIII. RESULTADOS

VIII.1 Modelo de prevención con hesperidina

VIII.1.1 Marcadores séricos de daño hepático.

El incremento en los niveles séricos de la ALT está asociado con la muerte de los hepatocitos, mientras que la elevación de los niveles séricos de la γ -GTP es un indicador de colestasis. El efecto hepatoprotector de la hesperidina en el hígado fue evaluado por la determinación de las actividades enzimáticas de la ALT y γ -GTP, las cuales mostraron un incremento en los animales tratados durante 8 semanas con CCl₄, comparado con el grupo control. El tratamiento con hesperidina previno parcialmente el incremento en las actividades enzimáticas en ALT y γ -GTP inducido por CCl₄. (Ver tabla 19)

Tabla 19. Efecto de la administración crónica de CCl₄ y hesperidina sobre las actividades de la ALT y la γ -GTP.

Parámetro	Control	CCl ₄	CCl ₄ - He	He
ALT (μ mol/Lmin)	27.07 \pm 2.77	79.52 \pm 2.29 ^a	59.43 \pm 4.64 ^{a,b}	17.70 \pm 0.96 ^a
γ -GTP (μ mol/Lmin)	9.48 \pm 1.45	11.29 \pm 0.70 ^a	9.58 \pm 0.51 ^b	9.40 \pm 1.57

Efecto de la administración crónica de CCl₄ sobre las actividades de la ALT, y γ -GTP en el grupo control, grupo de daño (CCl₄), ratas tratadas con CCl₄ más hesperidina (CCl₄-HE); y ratas administradas sólo con hesperidina (He). Cada resultado representa el valor medio de experimentos realizados en ensayos por triplicado \pm ES (n = 6). "a" Significativamente diferente del control, P <0,05. "b" significativamente diferente del grupo CCl₄, P <0,05.

VIII.1.2 El efecto antioxidante de la hesperidina.

En la figura 11 se muestra el incremento significativo inducido con CCl_4 con respecto al grupo control de los niveles de malondialdehído, lo cual indicó el grado de peroxidación lipídica. De manera importante, el tratamiento concomitante con hesperidina fue capaz de prevenir de manera total el grado de peroxidación lipídica, además de ello, la hesperidina por si sola disminuyó los niveles basales de MDA, lo que indica que esta flavona posee un potente efecto antioxidante. Por otro lado, se determinó el estrés oxidativo a nivel citosólico, al cuantificar el nivel de glutatión en el hígado. Como se muestra en la figura 12, los niveles de glutatión disulfóxido (GSH) en el grupo tratado con CCl_4 fue reducido comparado con el grupo control, mientras que los niveles de glutatión oxidado (GSSG) incrementaron significativamente en el grupo tratado con CCl_4 comparado con el grupo control. La relación entre GSH/GSSG fue significativamente reducida, mientras que en el grupo que recibió además hesperidina se observaron niveles altos de GSH, así como la razón (GSH/GSSG) y el contenido de glutatión total (GSH+GSSG) fue incrementado incluso por encima de los niveles normales.

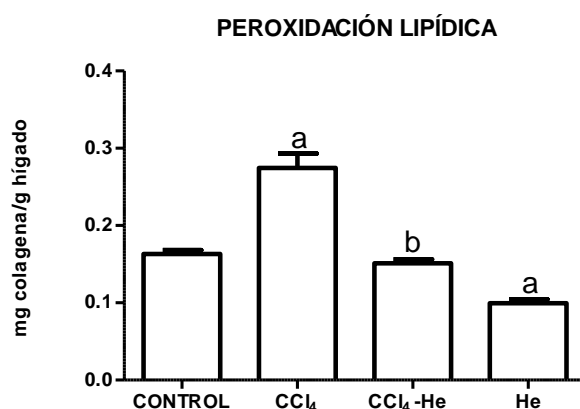


Figura 11. Peroxidación lipídica determinada en hígado de rata después de la administración crónica de CCl_4 , en el grupo control (control), ratas tratadas con CCl_4 (CCl_4), ratas tratadas con CCl_4 más hesperidina (CCl_4 -He); y ratas administradas solo con hesperidina (He). Cada barra representa el valor medio de experimentos realizados en 6 ratas \pm ES "a" diferencia significativa con grupo control, $p < 0,05$. "b" diferencia significativa del grupo CCl_4 , $p < 0,05$.

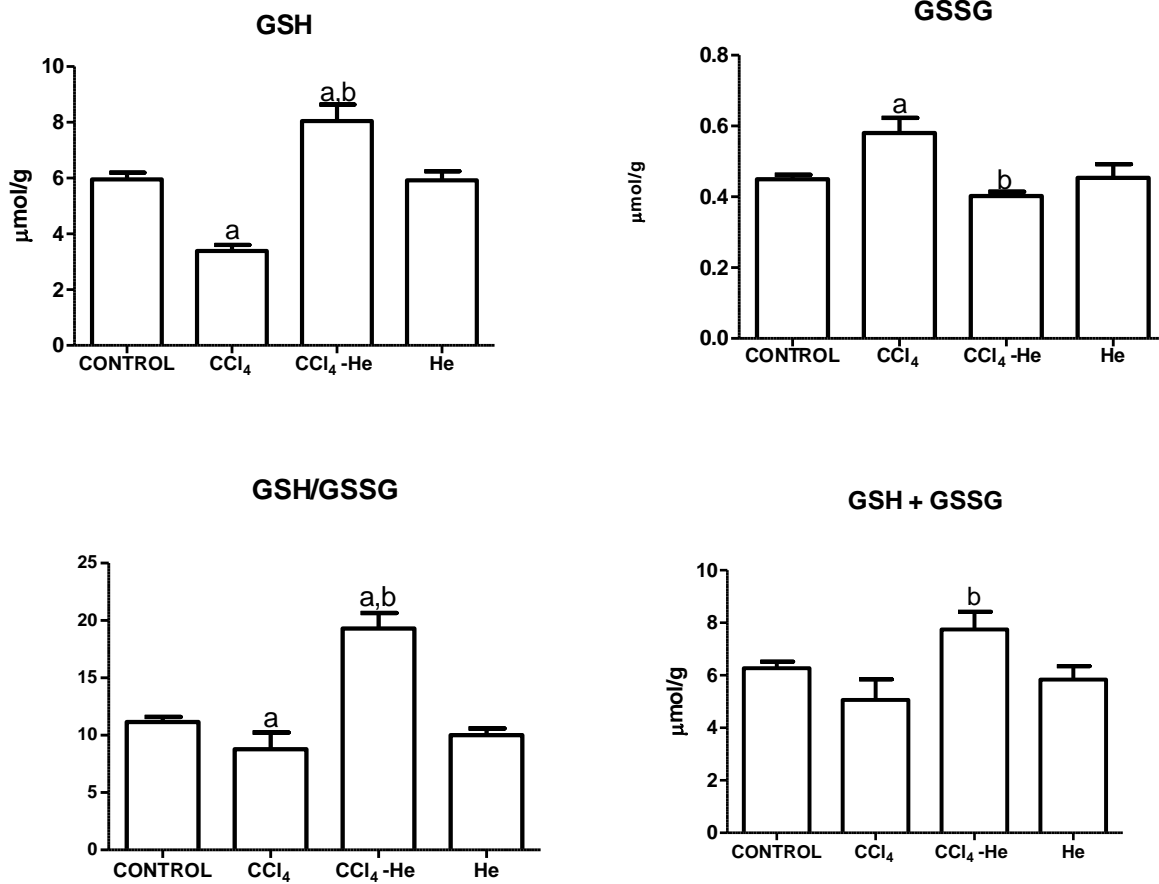


Figura 12. Glutación reducido (GSH), glutación oxidado (GSSG), razón GSH/GSSG y glutación total (GSH + GSSG) determinados en hígado de rata después de la administración crónica de CCl₄, en el grupo de control (control), ratas tratadas con CCl₄ (CCl₄), ratas tratadas con CCl₄ más hesperidina (CCl₄-He); y ratas administradas solo con hesperidina (He). Cada barra representa el valor medio de experimentos realizados en 6 ratas ± ES "a" diferencia significativa con grupo control, p <0,05. "b" diferencia significativa del grupo CCl₄, p <0,05.

VIII.1.3 Contenido de Glucógeno

El glucógeno es la principal forma de almacenamiento de glucosa en los animales y en los humanos, por lo tanto, es la principal fuente de energía. El contenido de glucógeno en el hígado fue reducido drásticamente tras la administración de CCl_4 . La administración concomitante de hesperidina previno considerablemente esta reducción, y la administración de hesperidina por si sola no muestra alteraciones en este parámetro (figura 13).

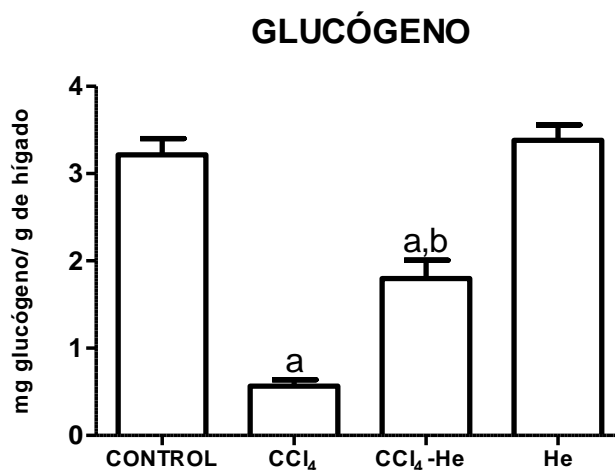


Figura 13. Contenido de glucógeno determinado en hígado de rata después de la administración crónica de CCl_4 , en los grupos control, ratas tratadas con CCl_4 (CCl_4), ratas tratadas con CCl_4 más hesperidina (CCl_4 -He); y ratas administradas solo con hesperidina (He). Cada barra representa el valor medio de experimentos realizados en 6 ratas \pm ES "a" diferencia significativa con grupo control, $p < 0,05$. "b" diferencia significativa del grupo CCl_4 , $p < 0,05$.

VIII.1.4 Contenido de colágena.

La característica más importante en la cirrosis es la fibrosis del hígado, siendo la colágena la proteína más abundante en el tejido fibrótico. El grado de fibrosis se determinó por la cuantificación de la cantidad de hidroxiprolina, expresada como contenido de colágena en hígado. La exposición crónica al agente hepatotóxico CCl_4 , incrementa el contenido de colágena aproximadamente 8 veces por encima del grupo control. La hesperidina tuvo un importante y significativo efecto preventivo sobre este parámetro (figura 14).

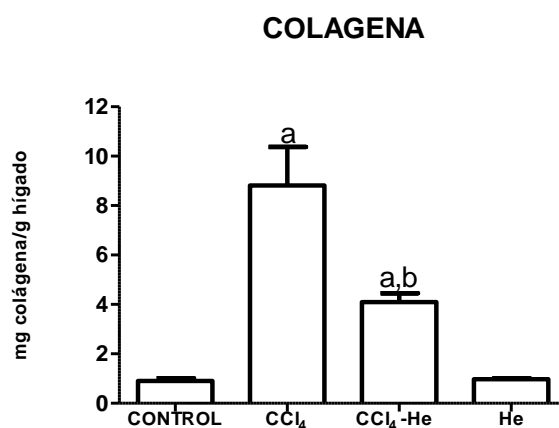


Figura 14. Contenido de colágena determinado en hígado de rata después de la administración crónica de CCl_4 en los grupos control, ratas tratadas con CCl_4 (CCl_4), ratas tratadas con CCl_4 más hesperidina (CCl_4 -He); y ratas administradas solo con hesperidina (He). Cada barra representa el valor medio de experimentos realizados en 6 ratas \pm ES "a" diferencia significativa con grupo control, $p < 0,05$. "b" diferencia significativa del grupo CCl_4 , $p < 0,05$.

VIII.1.5 Análisis histopatológico.

Para confirmar los resultados bioquímicos, se realizó el análisis histopatológico, con la finalidad de observar necrosis y contenido de colágena en el tejido. Los tejidos de los diferentes grupos, a las diferentes condiciones fueron tratados utilizando la técnica de hematoxilina y eosina (figura 15 A-D). Los tejidos de los animales sin tratamiento o control mostraron un parénquima hepático de apariencia normal, constituido por columnas geométricamente distribuidas alrededor de una vena central y delimitando periféricamente por un espacio portal, formando los lóbulos típicos del hígado (panel A). Los espacios sinusoidales se observaron ordenados entre columnas de lamelas de hepatocitos. Los animales tratados con CCl_4 mostraron un hígado con una intensa fibrosis nodular formado por depósitos abundantes de fibras de colágena rodeando irregularmente a los hepatocitos que están geométricamente ordenados, algunos de ellos muestran señales de daño celular y otros con pequeñas células eosinofílicas formando hepatocitos de neoformación (panel B). En el panel C, los hígados de los animales tratados con CCl_4 más hesperidina presentaron áreas con los depósitos de colágena disminuidos considerablemente con respecto al grupo control. Finalmente, se realizó la tinción tricrómica de Masson (figura 16); el grupo control (E) mostró depósitos de fibras de colágena solamente en las áreas portales del tejido. Por otro lado, el grupo tratado con CCl_4 (F) confirmó los depósitos abundantes de fibras de colágeno formando nódulos de regeneración. De manera similar, los tejidos de las ratas tratadas con CCl_4 y hesperidina concomitantemente (G), mostraron una disminución importante de dichos depósitos de colágena, finalmente el grupo tratado únicamente con hesperidina (H) mostraron tejidos de apariencia normal.

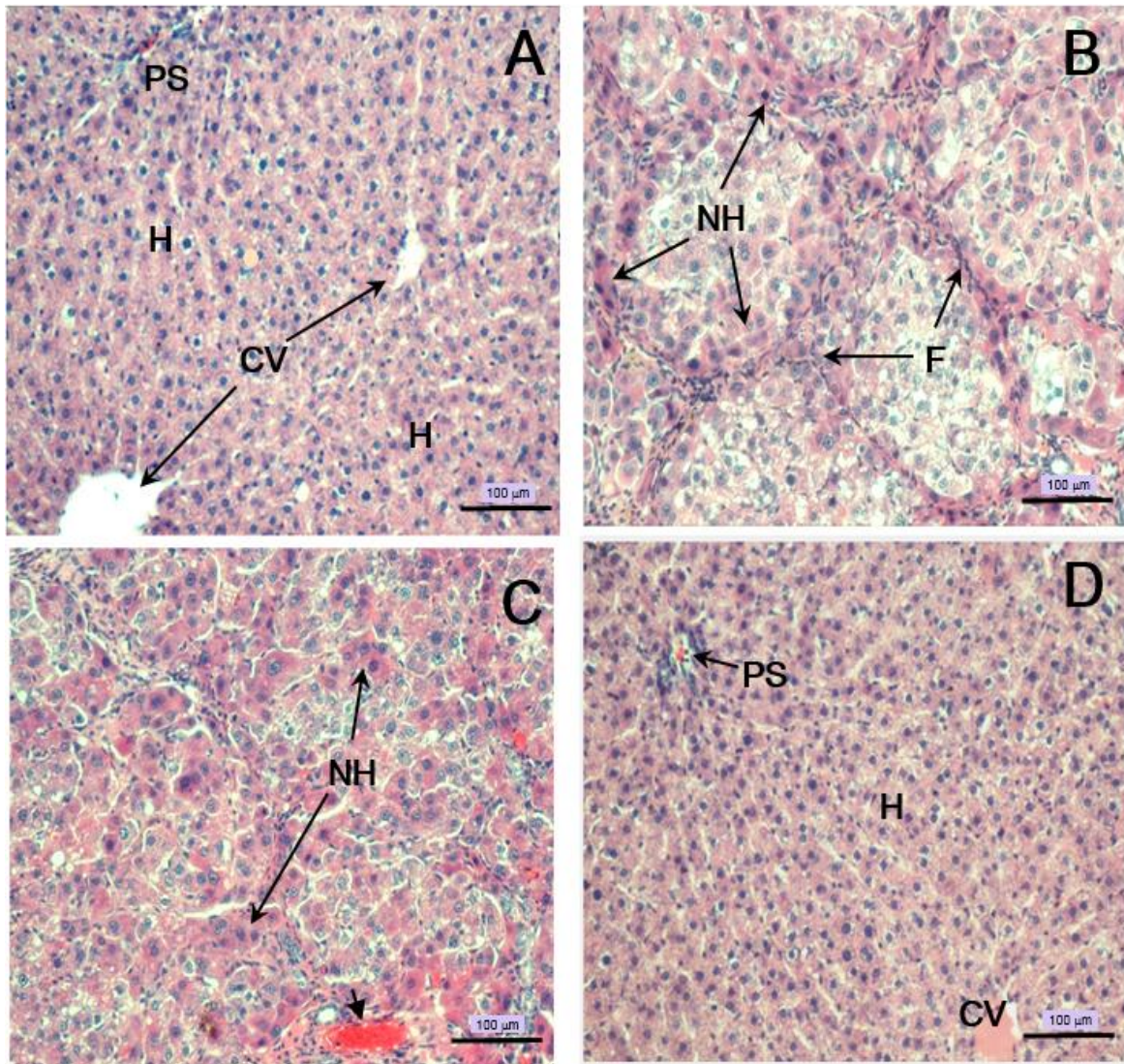


Figura 15. Histología de la tinción de hematoxilina y eosina en hígado de rata de diferentes tratamientos. Las ratas control (A); ratas tratadas con CCl_4 (B); Ratas tratadas con CCl_4 más hesperidina (C), y ratas administradas solo con hesperidina (D). CV: vena central; F: tejido fibroso; H: hepatocitos; NH: hepatocitos de neoformación; PS: espacio portal; punta de flecha: vena congestionada. Barra de escala = $100\mu\text{m}$.

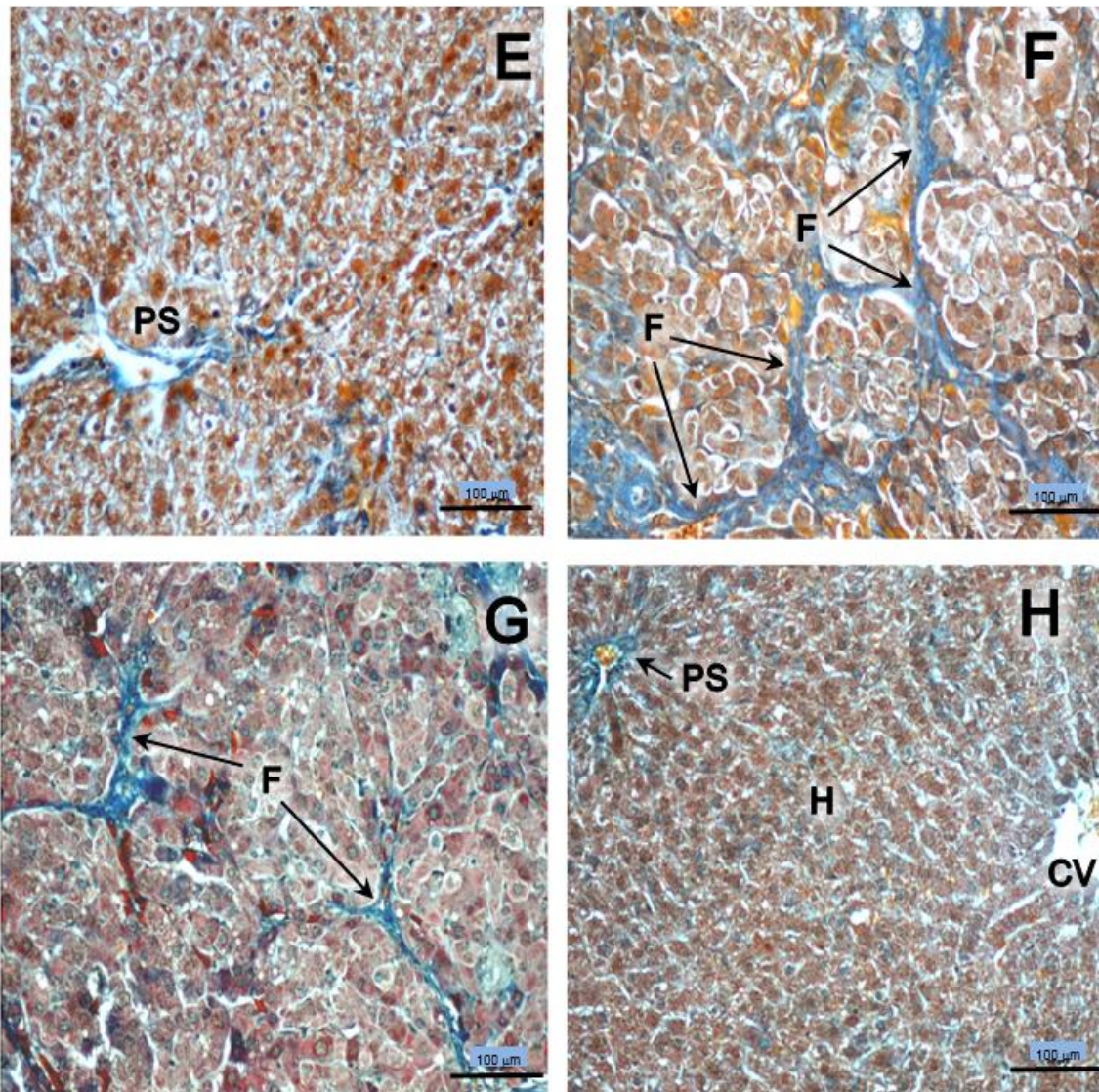


Figura 16. Histología de la tinción tricrómica de Masson en hígado de rata de diferentes tratamientos. Las ratas de control (E); tratadas con CCl_4 (F); Ratas tratadas con CCl_4 más hesperidina (G), y ratas administradas solo con hesperidina (H). CV: vena central; F: fibras de colágeno; H: hepatocitos; PS: espacio portal. Barra de escala = $100\mu\text{m}$.

VIII.1.6 Capacidad inmunomoduladora de la hesperidina

VIII.1.6.1 Expresión proteica del NF- κ B

Para la evaluación de la capacidad inmunomoduladora de la hesperidina se midieron los niveles de expresión de diferentes proteínas utilizando la técnica de western blot. Se determinó, mediante análisis densitométrico, la expresión proteica, del NF- κ B (p-65), donde se observó que la administración crónica de CCl₄ incrementó la expresión de esta proteína significativamente por encima de los niveles del grupo control, mientras que el grupo tratado en conjunción con la hesperidina previno considerablemente su expresión (figura 17). Interesantemente, la administración por si sola de la hesperidina disminuyó los niveles de expresión de p-65, incluso por debajo de los niveles observados en el grupo control.

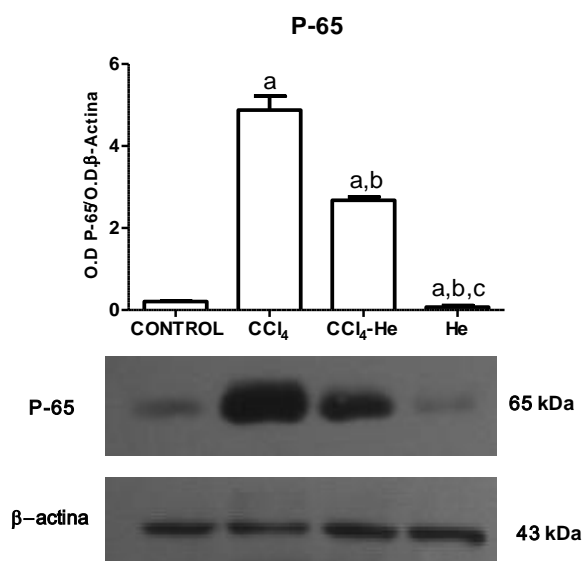


Figura 17. Expresión del NF- κ B (p65) determinada por western blot; se muestra un western blot representativo de los diferentes grupos: ratas control (control), ratas tratadas con CCl₄ (CCl₄), ratas tratadas con CCl₄ más hesperidina (CCl₄-He); y las ratas que recibieron sólo hesperidina (He), la β -actina se utilizó como control. Las intensidades de señal se determinaron mediante análisis densitométrico y los valores se calcularon como la relación de p-65/ β -actina. Cada barra representa los valores medios de 3 ratas \pm SE, por triplicado. "a" representa diferencia significativa de las ratas del grupo control, $p < 0,05$. "b" representa diferencia significativa de las ratas del grupo CCl₄, $p < 0,05$.

VIII.1.6.2 Expresión proteica de la citocina pro-inflamatoria IL-1 β .

A nivel molecular se determinó la expresión proteica de la citocina pro-inflamatoria (IL-1 β), utilizando la técnica de western blot y realizando el análisis densitométrico correspondiente (figura 18). Los resultados obtenidos mostraron que tras la administración crónica del CCl₄, los niveles en la expresión de dicha proteína se incrementaron considerablemente con respecto al grupo control. Sin embargo, el grupo que recibió tanto CCl₄ como hesperidina de manera concomitante mostró una expresión significativamente menor en los niveles de dicha proteína. Además de ello, la regulación a la baja de dicha proteína se observó también en el grupo tratado solo con hesperidina.

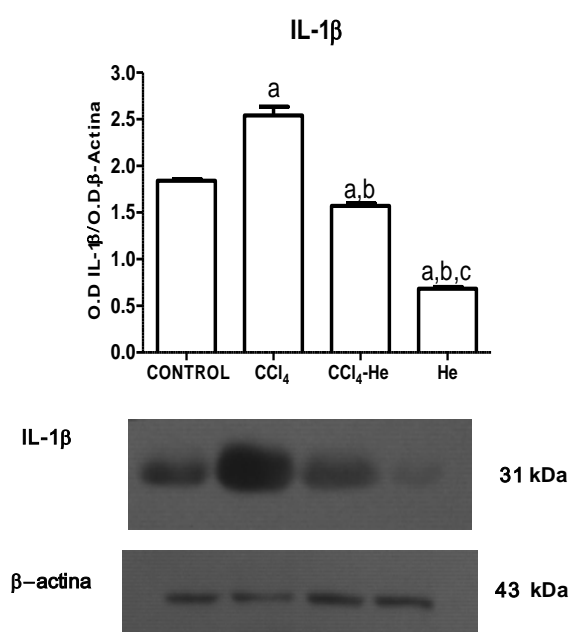


Figura 18. Expresión de la interleucina 1 β (IL-1 β) determinada por western blot; se muestra un western blot representativo de los diferentes grupos: ratas control (control), ratas tratadas con CCl₄ (CCl₄), ratas tratadas con CCl₄ más hesperidina (CCl₄-He); y las ratas que recibieron sólo hesperidina (He). La β -actina se utilizó como control. Las intensidades de señal se determinaron mediante análisis densitométrico y los valores se calcularon como la relación de IL- 1 β / β -actina. Cada barra representa los valores medios de 3 ratas \pm SE, por triplicado. "a" representa diferencia significativa de las ratas del grupo control, $p < 0,05$. "b" representa diferencia significativa de las ratas del grupo CCl₄, $p < 0,05$.

VIII.1.6.3 Expresión proteica de la citocina anti-inflamatoria IL-10.

Los niveles de expresión de la citocina anti-inflamatoria IL-10 fue incrementada en el grupo tratado crónicamente solo con CCl_4 . Interesantemente, en el grupo tratado concomitantemente con hesperidina y CCl_4 se incrementaron drásticamente los niveles proteicos de esta citocina (figura 19). Adicionalmente, la administración de hesperidina por sí sola incrementa los niveles de expresión de esta citocina por encima de los niveles observados en el grupo control, lo cual indica el efecto antiinflamatorio positivo de este flavonoide.

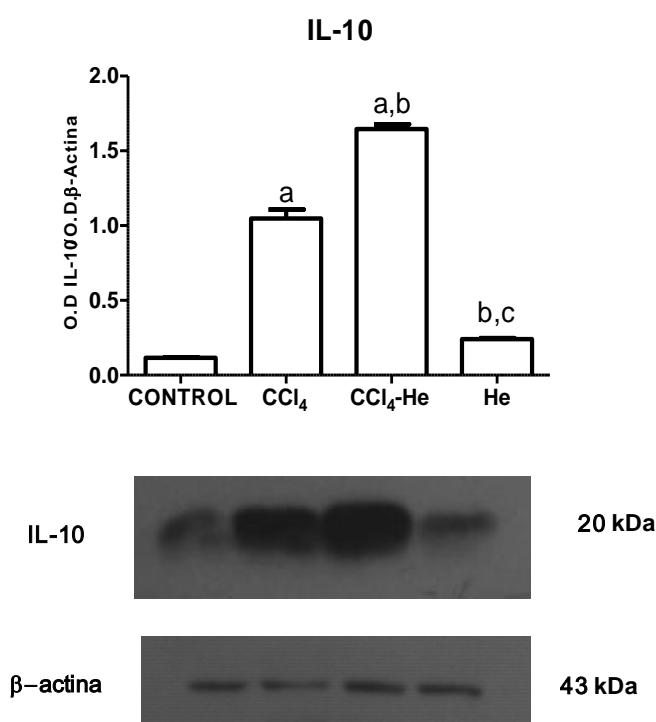


Figura 19. Expresión de la interleucina 10 (IL-10) determinada por western blot; se muestra un western blot representativo de los diferentes grupos: ratas control (control), ratas tratadas con CCl_4 (CCl_4), ratas tratadas con CCl_4 más hesperidina (CCl_4 -He); y las ratas que recibieron sólo hesperidina (He). La β -actina se utilizó como control. Las intensidades de señal se determinaron mediante análisis densitométrico y los valores se calcularon como la relación IL-10/ β -actina. Cada barra representa los valores medios de 3 ratas \pm SE, por triplicado. "a" representa diferencia significativa de las ratas del grupo control, $p < 0,05$. "b" representa diferencia significativa de las ratas del grupo CCl_4 , $p < 0,05$.

VIII.1.6.4 Expresión proteica de las citocinas pro-fibróticas TGF- β y CTGF.

Para finalizar la evaluación de la capacidad inmunomoduladora de la hesperidina, se determinaron los niveles de expresión del TGF- β , un mediador de la fibrosis por excelencia, y del CTGF, uno de sus mediadores más importantes en su vía de señalización; en donde, como es de esperarse la expresión de ambas proteínas del grupo de CCl₄ aumentó significativamente con respecto al grupo control. La hesperidina previno de manera significativa el incremento la expresión de ambas proteínas, parcialmente para TGF- β y totalmente para CTGF, con respecto al grupo control, además se observó una disminución en los niveles basales en el grupo tratado solo con hesperidina (figura 20).

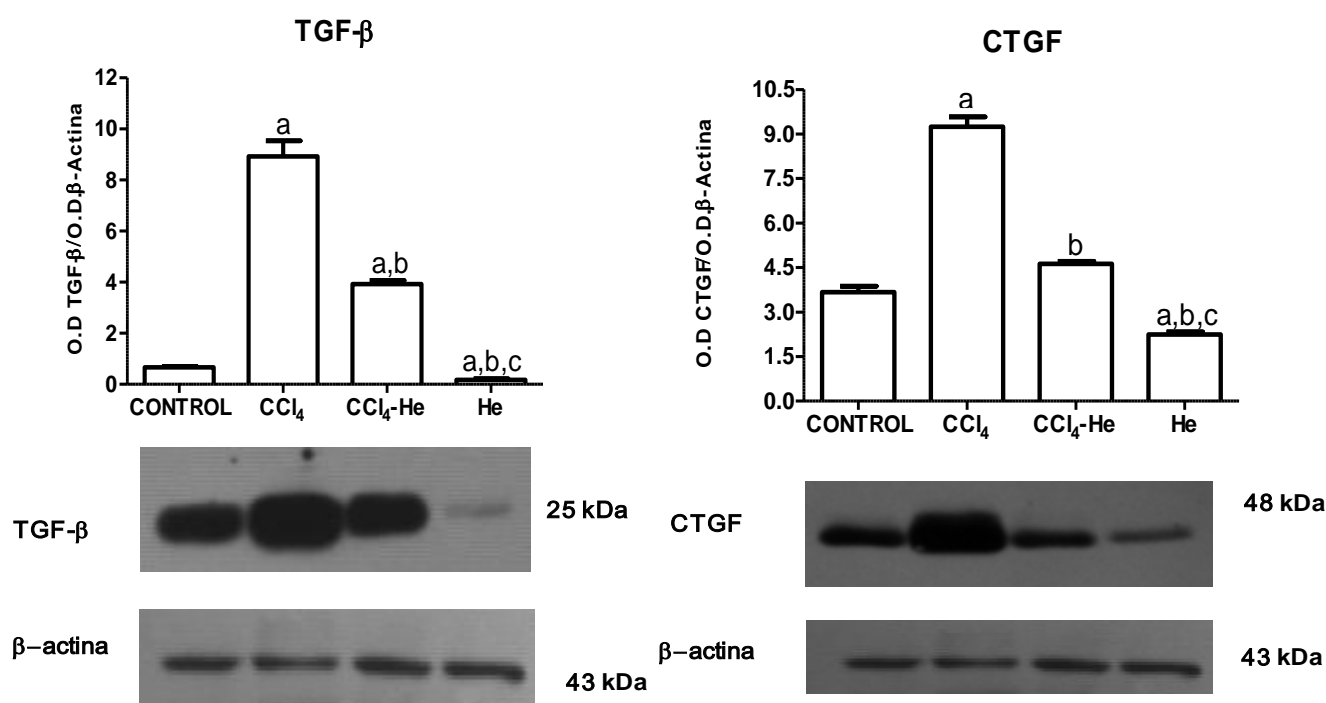


Figura 20. Expresión del TGF- β y del CTGF determinados por la técnica de western blot; se muestra un western blot representativo de los diferentes grupos: ratas control (control), ratas tratadas con CCl₄ (CCl₄), ratas tratadas con CCl₄ más hesperidina (CCl₄-He); y las ratas que recibieron sólo hesperidina (He). La β -actina se utilizó como control. Las intensidades de señal se determinaron mediante análisis densitométrico y los valores se calcularon como la relación TGF- β / β -actina y CTGF/ β -actina, respectivamente. Cada barra representa los valores medios de 3 ratas \pm SE, por triplicado. "a" representa diferencia significativa de las ratas del grupo control, $p < 0,05$. "b" representa diferencia significativa de las ratas del grupo CCl₄, $p < 0,05$.

VIII.1.6.5 m-RNA de citocinas profibrogénicas

Se evaluaron de manera cualitativa los niveles de mRNA del TGF- β y CTGF. La intoxicación crónica con el CCl₄ incrementó el mRNA del TGF- β y del CTGF, lo cual indica la activación de importantes vías profibrogénicas. Interesantemente, el tratamiento concomitante con hesperidina disminuyó los niveles de mRNA de esas proteínas (figura 21).

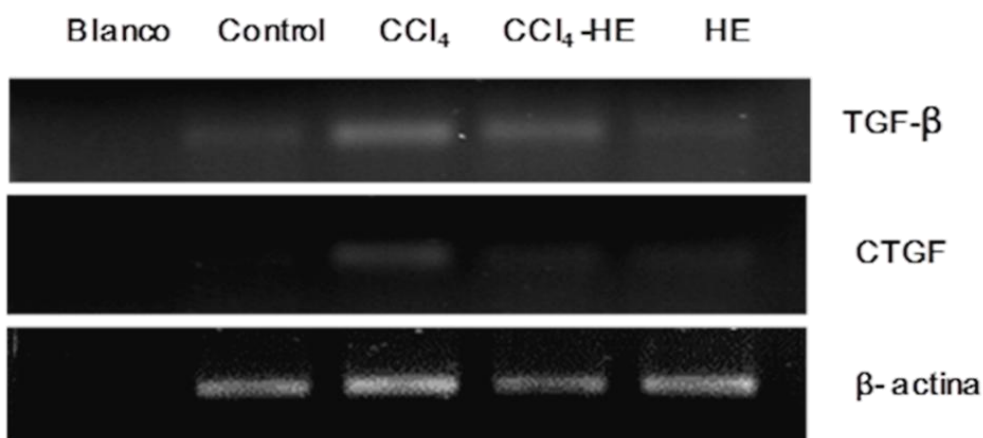


Figura 21 Niveles de mRNA para los genes TGF- β y CTGF. Se muestra una imagen representativa de los productos de PCR pertenecientes a los diferentes grupos: ratas control (control), ratas tratadas con CCl₄ (CCl₄), ratas tratadas con CCl₄ más hesperidina (CCl₄-He); y las ratas que recibieron sólo hesperidina (He). La β -actina se utilizó como control. Los productos de RT-PCR se obtuvieron con cebadores específicos para cada gen y β -actina.

VIII.2 Modelo de prevención con L-teanina

VIII.2.1 Actividades enzimáticas de la ALT y la γ -GTP.

Para evaluar la capacidad de prevención de la L-teanina en el daño hepático inducido en nuestro modelo se evaluaron las actividades enzimáticas de la ALT y de la γ -GTP. La ALT es una enzima citosólica del hepatocito, un incremento en los niveles séricos de dicha enzima refleja un incremento en la permeabilidad de la membrana plasmática, y en consecuencia muerte celular. Por otro lado, la γ -GTP es una enzima embebida en la membrana plasmática del hepatocito, principalmente en el dominio canalicular, esta enzima es el principal indicador de colestasis. Las actividades enzimáticas de la ALT y de la γ -GTP en el grupo de CCl₄ mostraron un incremento con respecto al grupo. La administración concomitante de L-teanina normalizó los niveles séricos de ambas enzimas (Tabla 20).

Tabla 20. Efecto de la administración crónica de CCl₄ y L-teanina sobre las actividades de la ALT y la γ -GTP

Parámetro	Control	CCl ₄	CCl ₄ + L-THE	L-THE
ALT (μ mol/Lmin)	27.07 \pm 2.77	79.52 \pm 2.29 ^a	59.43 \pm 4.64 ^{a,b}	18.31 \pm 1.13
γ -GTP (μ mol/Lmin)	9.48 \pm 1.45	11.29 \pm 0.70 ^a	11.26 \pm 0.53 ^a	9.40 \pm 1.15

Efecto de la administración crónica de CCl₄ sobre las actividades de la ALT, y la γ -GTP en el grupo control, grupo tratado con CCl₄ (CCl₄), las ratas tratadas con CCl₄ más L-teanina (CCl₄-THE) ; y ratas administradas sólo con L-teanina (THE). Cada resultado representa el valor medio de experimentos realizados en ensayos por duplicado \pm SE (n = 6). "a" representa diferencia significativa de las ratas del grupo control, p <0,05. "b" representa diferencia significativa de las ratas del grupo CCl₄, p <0,05.

VIII.2.2 Contenido de colágena

La fibrosis resultante de un daño crónico inducido con CCl_4 exhibe cambios tanto cualitativos como cuantitativos en la composición de la MEC como resultado del desequilibrio de las velocidades de su síntesis y degradación. La exposición crónica a agentes tóxicos como el CCl_4 incrementa la fibrosis cerca de 6 veces comparado con el grupo control. La L-teanina previene significativamente en forma parcial este efecto. (figura 22).

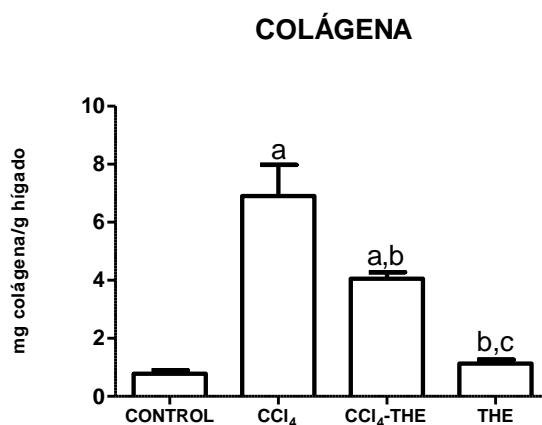


Figura 22. Contenido de colágena determinado en hígado de rata después de la administración crónica de CCl_4 en el grupo de control (control), ratas tratadas con CCl_4 (CCl_4), ratas tratadas con CCl_4 más L-teanina (CCl_4 -THE); y ratas administradas solo con L-Teanina (THE). Cada barra representa el valor medio de experimentos realizados en 6 ratas \pm SE "a" diferencia significativa con grupo control, $p < 0,05$. "b" diferencia significativa del grupo CCl_4 , $p < 0,05$. "c" representa diferencia significativa de las ratas del grupo CCl_4 -THE, $p < 0,05$.

VIII.2.3 Ensayo histopatológico.

Se realizó la tinción de hematoxilina y eosina del hígado de las ratas de los diferentes grupos tratados (figura 23). El grupo control mostró la apariencia de un tejido normal, de manera análoga al grupo tratado únicamente con L-teanina; mientras que el grupo tratado crónicamente con CCl_4 mostró una intensa fibrosis nodular del parénquima con hepatocitos hipertróficos, esteatosis y células acidofílicas de neoformación. Las áreas fibróticas fueron reducidas y las células de neoformación fueron incrementadas para el grupo con el tratamiento con CCl_4 y con L-teanina.

Adicionalmente, se realizó la tinción tricrómica de Masson (figura 24), donde se observaron pequeñas fibras de colágena en las áreas portales en el grupo control. Las secciones de tejido fibrótico del grupo expuesto al CCl_4 evaluadas mostraron un incremento en las fibras de colágena, así como fibrosis nodular rodeando a hepatocitos hipertróficos. El grupo tratado con L-teanina y CCl_4 mostró una menor cantidad de tejido fibrótico. Finalmente el grupo tratado solo con L-teanina con el parénquima hepático de apariencia normal.

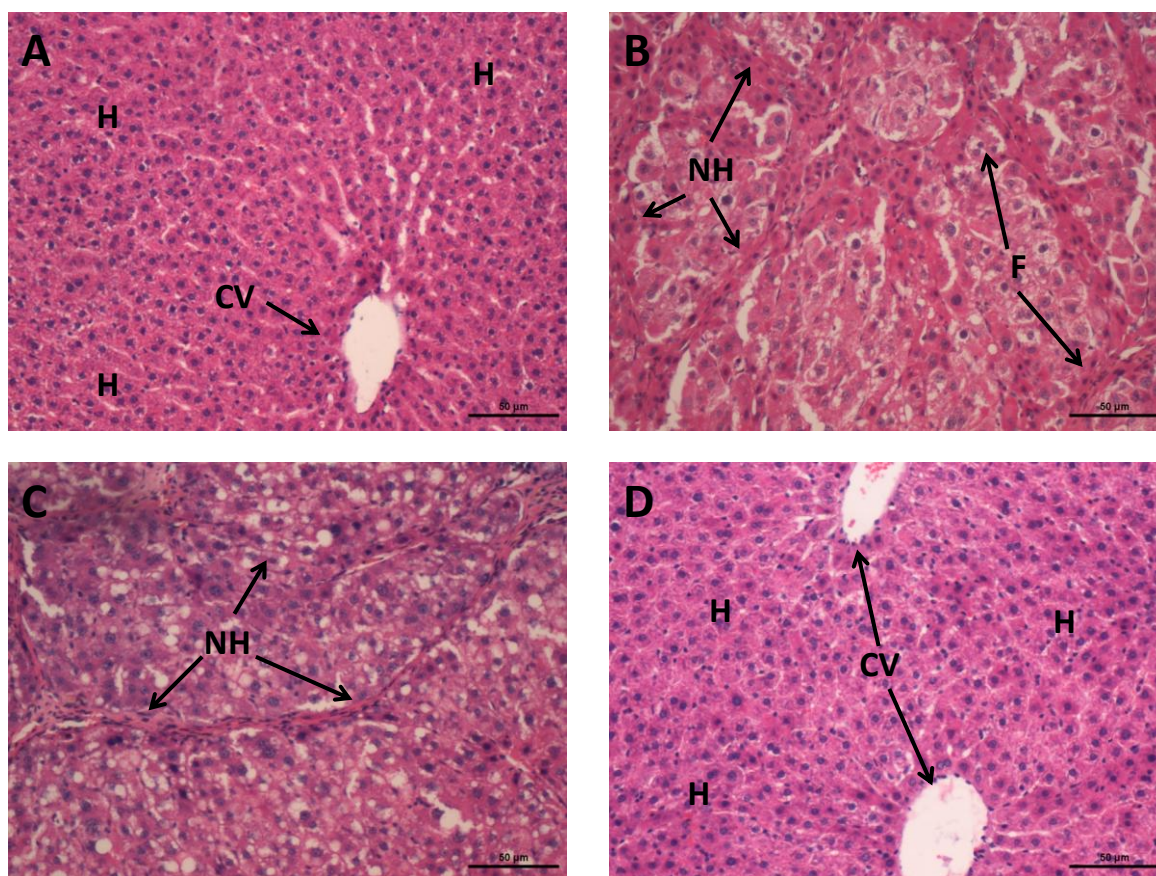


Figura 23. Histología de la tinción de hematoxilina y eosina en hígado de rata con diferentes tratamientos. Las ratas control (A); grupo de CCl_4 (B); Ratas tratadas con CCl_4 más L-teanina (C), y ratas administradas solo con L-teanina (D). CV: vena central; F: tejido fibroso; H: hepatocitos; NH: hepatocitos de neoformación; PS: espacio portal. Barra de escala = $50\mu\text{m}$.

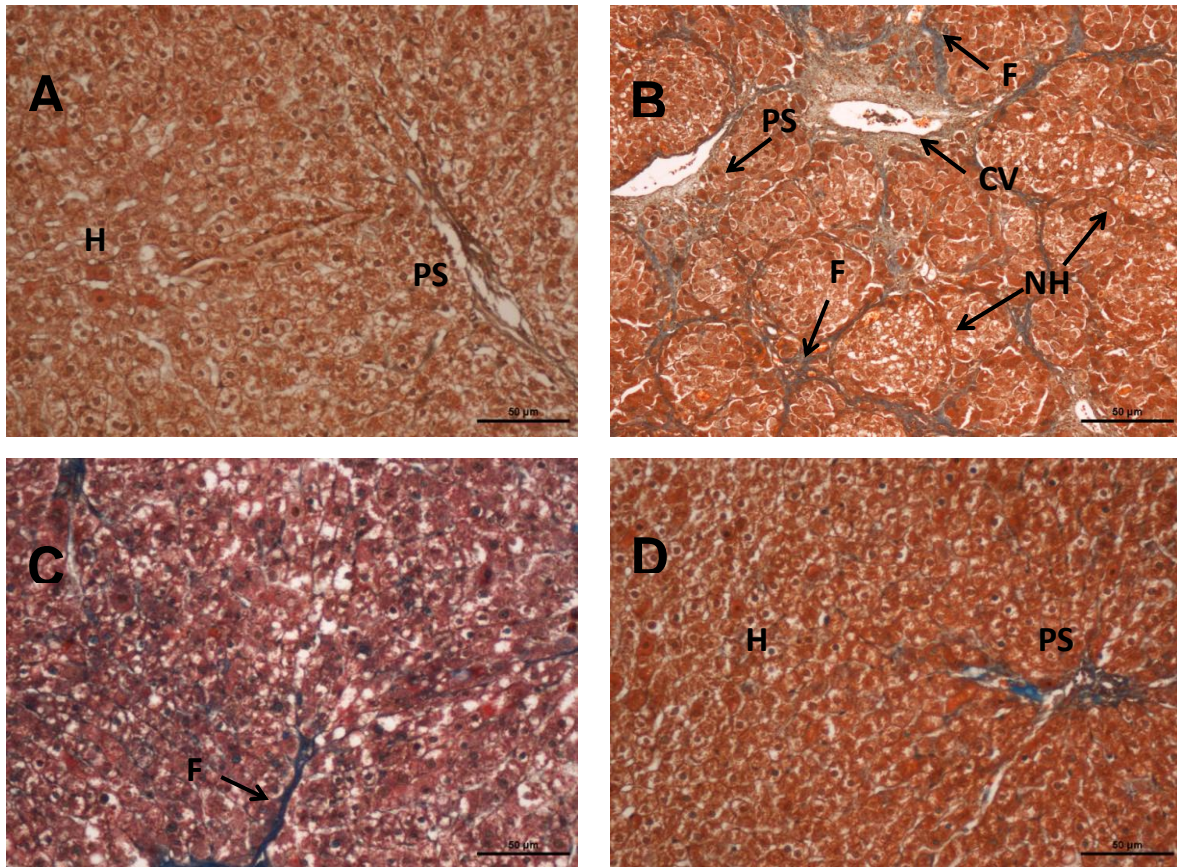


Figura 24. Histología de la tricrómica de Masson en hígado de rata con diferentes tratamientos. Las ratas control (A); Ratas tratadas con CCl_4 (B); Ratas tratadas con CCl_4 más L-teanina (C), y ratas administradas solo con L-teanina (D). CV: vena central; F: tejido fibroso; H: hepatocitos; NH: hepatocitos de neoformación; PS: espacio portal. Barra de escala = $50\mu\text{m}$.

VIII.2.3 Estrés oxidativo

Se evaluó el estrés oxidativo a nivel membranal por determinación del contenido de malondialdehído (MDA) hepático. La peroxidación lipídica se incrementó significativamente en el grupo tratado de manera crónica con CCl_4 . Este incremento fue parcialmente prevenido por la L-teanina. (figura 25).

Para evaluar el estrés oxidativo a nivel citosólico se cuantificaron los niveles de glutatión en el hígado (figura 26). Se observó un decremento de los niveles de GSH, mientras que los niveles de GSSG mostraron una tendencia a incrementarse en el grupo tratado con CCl_4 comparados con el grupo control. Este incremento causa una caída en la relación GSH/GSSG, lo cual indica un incremento en el estrés oxidativo del hígado. La L-teanina muestra un efecto parcial pero significativo en la prevención del estrés oxidativo.

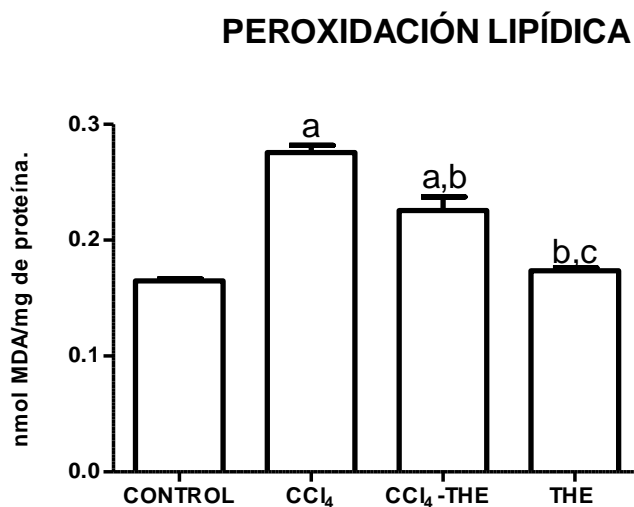


Figura 25. Peroxidación lipídica determinada en hígado de rata después de la administración crónica de CCl_4 , en el grupo control (control), ratas tratadas con CCl_4 (CCl_4), ratas tratadas con CCl_4 más L-teanina (CCl_4 -THE); y ratas administradas solo con L-Teanina (THE). Cada barra representa el valor medio de experimentos realizados en 6 ratas \pm SE. "a" diferencia significativa con el grupo control, $p < 0,05$. "b" diferencia significativa del grupo CCl_4 , $p < 0,05$. "c" representa diferencia significativa de las ratas del grupo CCl_4 -THE, $p < 0,05$.

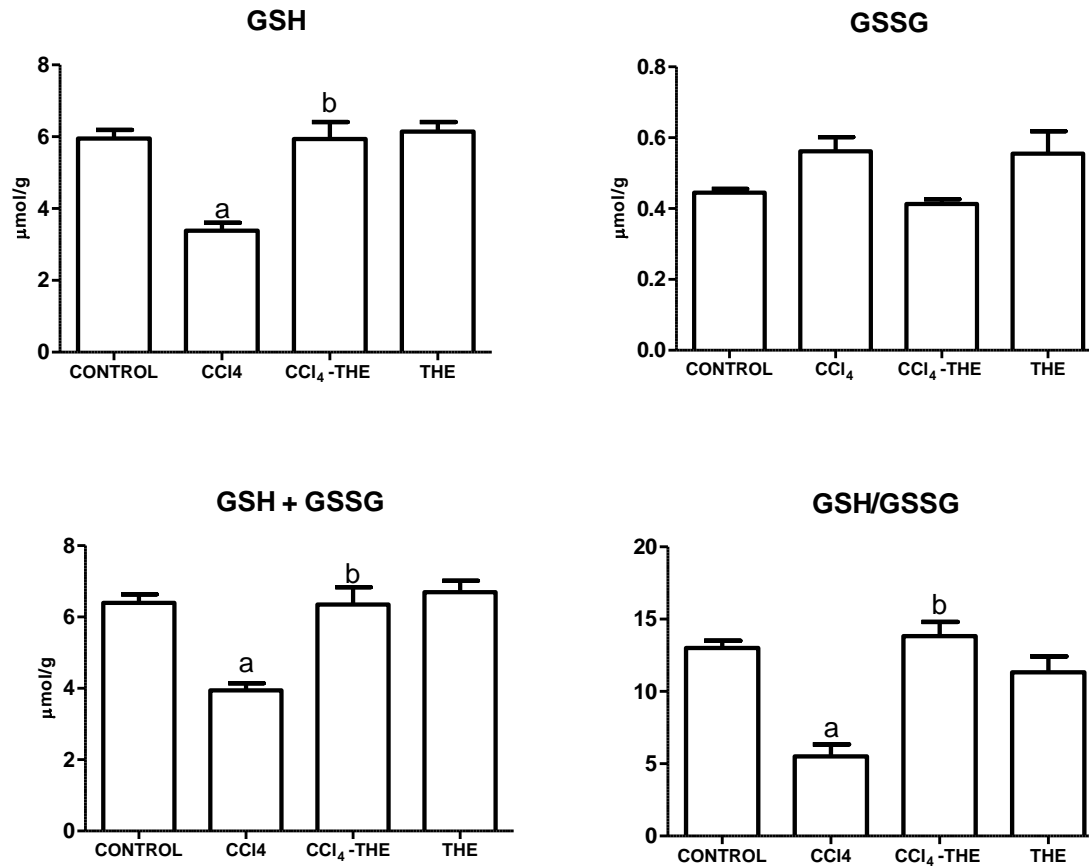


Figura 26 Glutación reducido (GSH), glutación oxidado (GSSG), razón GSH/GSSG y glutación total (GSH + GSSG) determinados en hígado de rata después de la administración crónica de CCl₄, en el grupo control (control), ratas tratadas con CCl₄ (CCl₄), ratas tratadas con CCl₄ más L-teanina (CCl₄-THE); y ratas administradas solo con L-Teanina (THE). Cada barra representa el valor medio de experimentos realizados en 6 ratas ± SE. "a" diferencia significativa con el grupo control, p <0,05. "b" diferencia significativa del grupo CCl₄, p <0,05.

VIII.2.4 Capacidad inmuno-moduladora de la L-teanina.

VIII.2.4.1 Expresión proteica del NF- κ B

Para evaluar la capacidad inmuno-moduladora de la L-teanina se determinó la expresión del NF- κ B a través de la cuantificación de los niveles proteicos de la subunidad p-65 mediante el análisis de western blot. La administración de CCl₄ incrementó la expresión de p-65 comparado con el grupo control; mientras que con el tratamiento concomitante de L-teanina disminuyó parcialmente la expresión de esta proteína (figura 27).

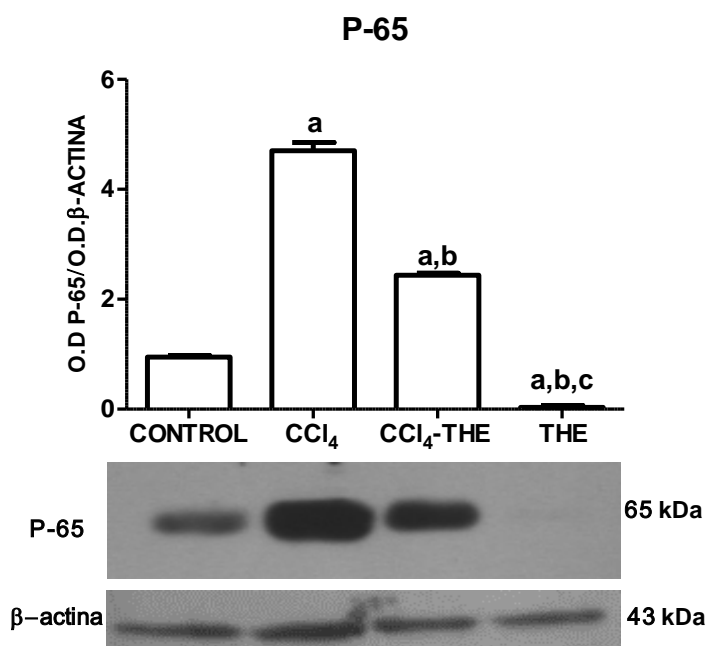


Figura 27. Expresión del NF- κ B (p65) determinada por western blot; se muestra un western blot representativo de los diferentes grupos: ratas control (control), ratas tratadas con CCl₄ (CCl₄), ratas tratadas con CCl₄ más L-teanina (CCl₄-THE), y las ratas que recibieron sólo L-teanina (THE). La β -actina se utilizó como control. Las intensidades de la señal se determinaron mediante análisis densitométrico y los valores se calcularon como la relación de p-65/ β -actina. Cada barra representa los valores medios de 3 ratas \pm SE, por triplicado. "a" representa diferencia significativa de las ratas del grupo control, $p < 0,05$. "b" representa diferencia significativa de las ratas del grupo CCl₄, $p < 0,05$. "c" representa diferencia significativa de las ratas del grupo CCl₄-THE, $p < 0,05$.

VIII.2.4.2 Expresión proteica de las citocinas proinflamatorias y anti-inflamatorias

Por otro lado, se evaluó el efecto de la L-teanina sobre la expresión de las citocinas proinflamatorias, interleucinas IL-1 β e IL-6. Los resultados muestran que existe un incremento en la expresión en el grupo tratado con CCl₄ comparado con el grupo control, tanto en la IL-1 β (figura 28), como en la IL-6 (figura 29). Los incrementos en los niveles de la expresión de dichas proteínas fueron prevenidos mediante la administración concomitante con L-teanina. Interessantemente, la administración por si sola de L-teanina disminuyó los niveles de la expresión de dichas proteínas, incluso por debajo de los niveles observados en el grupo control. De la misma manera, se evaluó la expresión de la citocina anti-inflamatoria IL-10, la cual mostró una tendencia a incrementarse en el grupo tratado con CCl₄, mientras que la L-teanina fue capaz de incrementarla de manera significativa (figura 30).

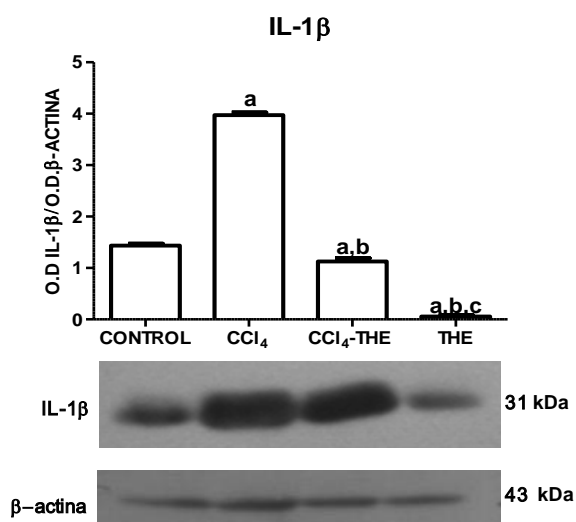


Figura 28. Expresión de la interleucina 1 β (IL-1 β) determinada por western blot; se muestra un western blot representativo de los diferentes grupos: ratas control (control), ratas tratadas con CCl₄ (CCl₄), ratas tratadas con CCl₄ más L-teanina (CCl₄-THE), y las ratas que recibieron sólo L-teanina (THE). La β -actina se utilizó como control. Las intensidades de la señal se determinaron mediante el análisis densitométrico y los valores se calcularon como la relación de IL-1 β / β -actina. Cada barra representa los valores medios de 3 ratas \pm SE por triplicado. "a" representa la diferencia significativa de las ratas del grupo control, $p < 0,05$. "b" representa diferencia significativa de las ratas del grupo CCl₄, $p < 0,05$. "c" representa diferencia significativa de las ratas del grupo CCl₄-THE, $p < 0,05$.

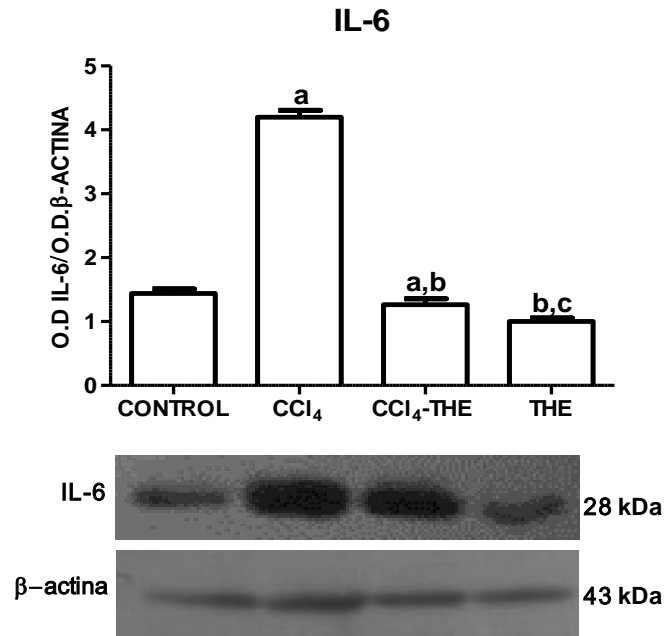


Figura 29. Expresión de la interleucina 6 (IL-6) determinada por western blot; se muestra un western blot representativo de los diferentes grupos: ratas control (control), ratas tratadas con CCl₄ (CCl₄), ratas tratadas con CCl₄ más L-teanina (CCl₄-THE); y las ratas que recibieron sólo L-teanina (THE). La β-actina se utilizó como control. Las intensidades de la señal se determinaron mediante el análisis densitométrico y los valores se calcularon como la relación de IL-6/β-actina. Cada barra representa los valores medios de 3 ratas ± SE por triplicado. "a" representa diferencia significativa de las ratas del grupo control, p <0,05. "b" representa diferencia significativa de las ratas del grupo CCl₄, p <0,05. "c" representa diferencia significativa de las ratas del grupo CCl₄-THE, p <0,05.

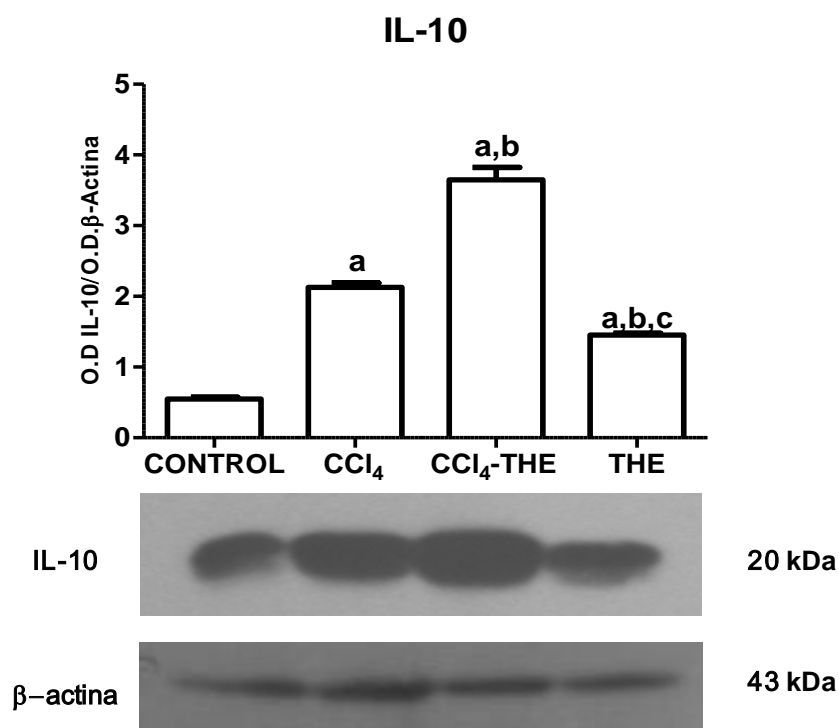


Figura 30. Expresión de la interleucina 10 (IL-10) determinada por western blot; se muestra un western blot representativo de los diferentes grupos: ratas control (control), ratas tratadas con CCl₄ (CCl₄), ratas tratadas con CCl₄ más L-teanina (CCl₄-THE); y las ratas que recibieron sólo L-teanina (THE). La β-actina se utilizó como control. Las intensidades de la señal se determinaron mediante el análisis densitométrico y los valores se calcularon como la relación de IL-10/β-actina. Cada barra representa los valores medios de 3 ratas ± SE por triplicado. "a" representa la diferencia significativa de las ratas del grupo control, p <0,05. "b" representa la diferencia significativa de las ratas del grupo CCl₄, p <0,05. "c" representa la diferencia significativa de las ratas del grupo CCl₄-THE, p <0,05.

VIII.2.4.3 Expresión proteica de las citocinas profibrogénicas

La citocina TGF- β muestra una sobreexpresión en casi todas las enfermedades fibróticas, así como en los modelos experimentales de fibrosis.³⁰ Los niveles de la expresión del TGF- β y del CTGF se analizaron utilizando la técnica de western blot. Después de la administración con CCl₄ durante 8 semanas, estas citocinas mostraron un incremento significativo en la expresión comparada con el grupo control.. TGF- β (figura 31), y CTGF (figura 32), Interestingly la L-teanina disminuyó la expresión de manera significativa la expresión de estas citocinas profibrogénicas. Además se observó una disminución en los niveles basales en el grupo tratado solo con L-teanina.

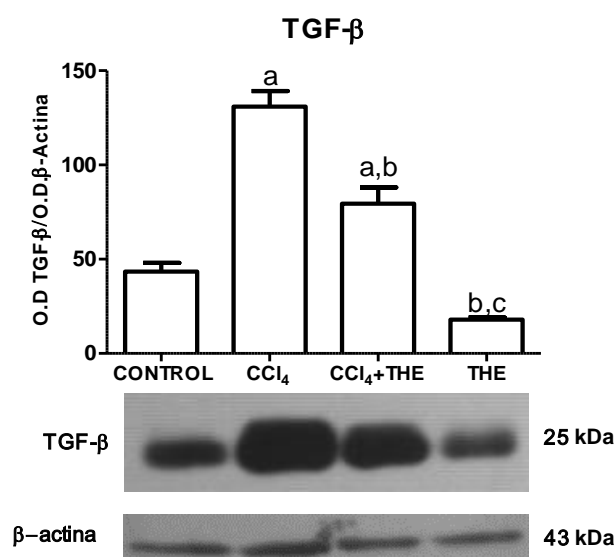


Figura 31. Expresión del TGF- β determinada por western blot; se muestra un western blot representativo de los diferentes grupos: ratas control (control), ratas tratadas con CCl₄ (CCl₄), ratas tratadas con CCl₄ más L-teanina (CCl₄-THE); y las ratas que recibieron sólo L-teanina (THE). La β -actina se utilizó como control. Las intensidades de la señal se determinaron mediante el análisis densitométrico y los valores se calcularon como la relación de TGF- β / β -actina. Cada barra representa los valores medios de 3 ratas \pm SE por triplicado. "a" representa la diferencia significativa de las ratas del grupo control, $p < 0,05$. "b" representa la diferencia significativa de las ratas del grupo CCl₄, $p < 0,05$. "c" representa diferencia significativa de las ratas del grupo CCl₄-THE, $p < 0,05$.

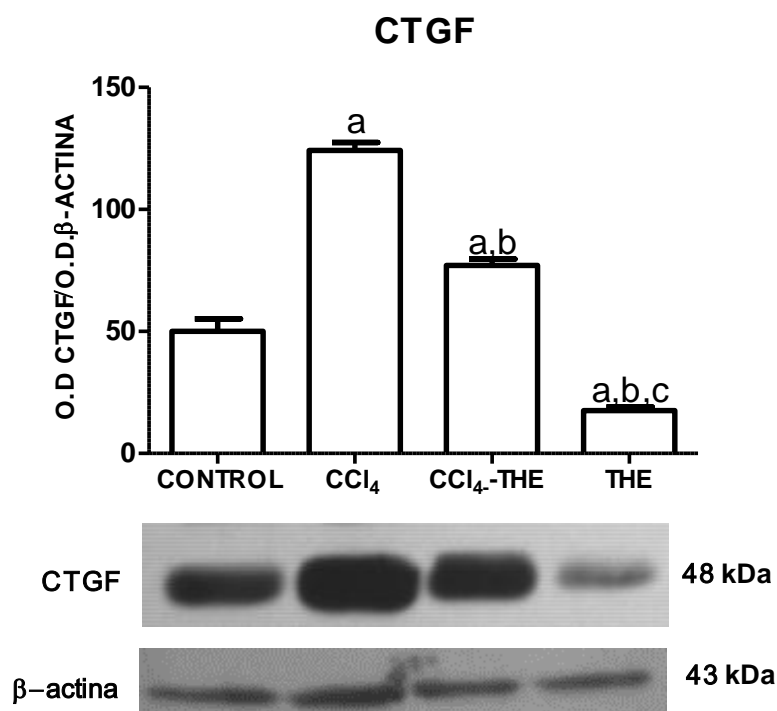


Figura 32. Expresión del CTGF determinada por western blot; se muestra un western blot representativo de los diferentes grupos: ratas control (control), ratas tratadas con CCl₄ (CCl₄), ratas tratadas con CCl₄ más L-teanina (CCl₄-THE); y las ratas que recibieron sólo L-teanina (TH). La β-actina se utilizó como control. Las intensidades de la señal se determinaron mediante el análisis densitométrico y los valores se calcularon como la relación de CTGF/β-actina. Cada barra representa los valores medios de 3 ratas ± SE, por triplicado. "a" representa la diferencia significativa de las ratas del grupo control, p <0,05. "b" representa la diferencia significativa de las ratas del grupo CCl₄, p <0,05. "c" representa diferencia significativa de las ratas del grupo CCl₄-THE, p <0,05.

VIII.2.4.4 Expresión de la MMP-13

En el modelo con L-teanina se evaluó la activación de la MMP-13 (figura 33). La forma latente de la MMP-13 no mostró alteraciones o cambios significativos entre los grupos evaluados para la forma activa de esta proteína, tanto los grupos control, y el tratado solo con L-teanina mostró una expresión basal de la MMP-13; sin embargo, la forma activa de la MMP-13 fue incrementada tras la administración crónica de CCl₄. Interesantemente, el tratamiento concomitante con L-teanina incrementó significativamente la expresión de la forma activa de la MMP-13.

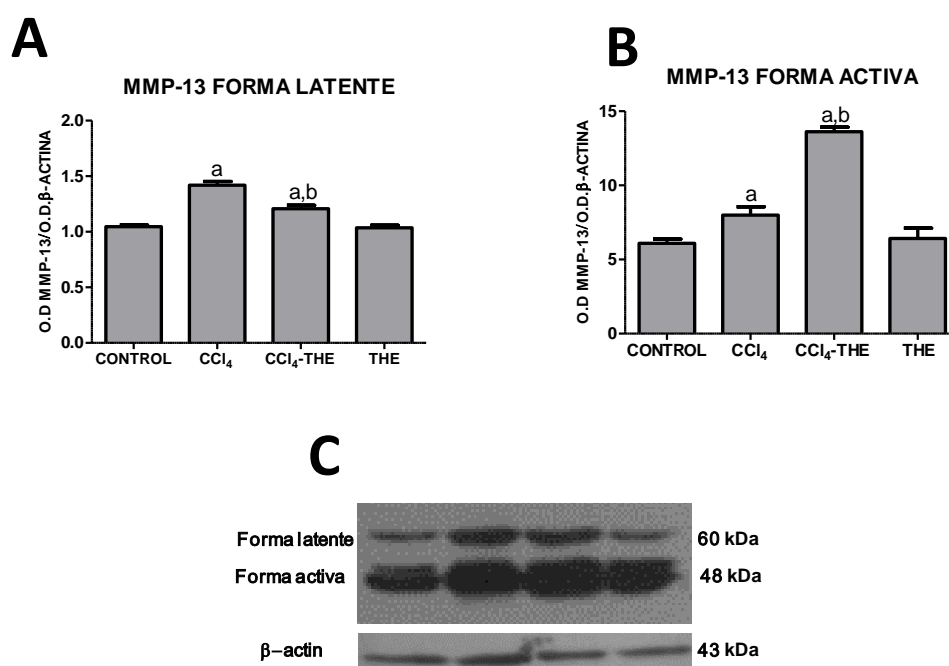


Figura 33. Expresión de la MMP-13 determinada por western blot; se muestra un western blot representativo de los diferentes grupos: ratas control (control), ratas tratadas con CCl₄ (CCl₄), ratas tratadas con CCl₄ más L-teanina (CCl₄-THE); y las ratas que recibieron sólo L-teanina (THE). La β-actina se utilizó como control. Las intensidades de la señal se determinaron mediante el análisis densitométrico y los valores se calcularon como la relación de MMP-13/β-actina tanto para la forma latente como la activa. Cada barra representa los valores medios de 3 ratas ± SE, por triplicado. "a" representa la diferencia significativa de las ratas del grupo control, p <0,05. "b" representa la diferencia significativa de las ratas del grupo CCl₄, p <0,05. "c" representa la diferencia significativa de las ratas del grupo CCl₄-THE, p <0,05.

VIII.2.4.5 m-RNA de citocinas profibrogénicas

Finalmente, se evaluaron de manera cualitativa los niveles de mRNA del TGF- β y del CTGF. La intoxicación crónica con el CCl₄ incrementó el mRNA del TGF- β y del CTGF, lo cual indica la activación de importantes vías profibrogénicas. Interesantemente, el tratamiento concomitante con L-teanina disminuyó los niveles de mRNA de esas proteínas (figura 34).

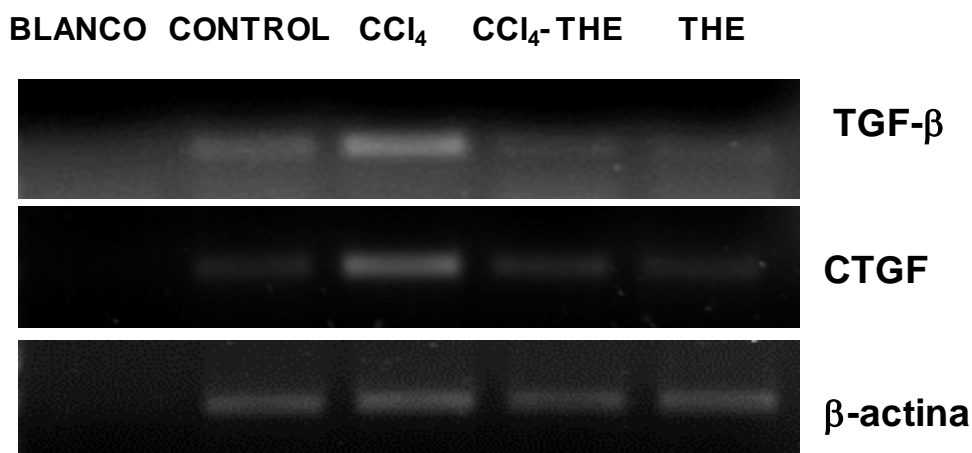


Figura 34. Niveles de mRNA para los genes TGF- β y CTGF. Los productos de RT-PCR se obtuvieron con cebadores específicos para cada gen y β -actina. Se muestra una imagen representativa de los productos de PCR pertenecientes a los diferentes grupos: ratas control (control), ratas tratadas con CCl₄ (CCl₄), ratas tratadas con CCl₄ más L-teanina (CCl₄-THE); y las ratas que recibieron sólo L-teanina (THE). La β -actina se utilizó como control. Productos de RT-PCR se obtuvieron con cebadores específicos para cada gen y β -actina.

IX. DISCUSIÓN

El presente estudio mostró que tanto la hesperidina como la L-teanina, previenen el estrés oxidativo, la inflamación, la fibrosis, y la cirrosis, que son inducidas por el CCl₄. Estos hechos, podrían ser atribuidos a que ambos compuestos presentan diferentes mecanismos para la prevención del daño hepático experimental, como son su capacidad antioxidante, así como su capacidad inmunomoduladora, para prevenir la sobreexpresión del NF-κB, y en consecuencia la regulación a la baja de diversas citocinas proinflamatorias, profibrogénicas y antiinflamatorias. Las citocinas son proteínas solubles, mediadores similares a las hormonas producidas en respuesta a diversos estímulos, incluyendo la inflamación y el daño del hígado, quien es el órgano principal de producción y eliminación de citocinas, ya que todos los tipos celulares del hígado son capaces de producir citocinas⁸⁰.

Para la evaluación de ambos compuestos antes mencionados, el daño hepático fue establecido por la intoxicación crónica de CCl₄.

IX.1 La hesperidina previene la cirrosis experimental.

La hesperidina, un flavonoide glucósido, encontrado abundantemente en las frutas cítricas, demostró tanto bioquímica, como histológicamente, así como por su capacidad inmunomoduladora, que el tratamiento farmacológico de este compuesto previene de manera significativamente la fibrosis hepática.

Los marcadores séricos evaluados fueron la ALT y la γ-GTP. La ALT es una enzima que se encuentra en el citosol de los hepatocitos y el incremento en los niveles plasmáticos de esta enzima refleja un incremento en la permeabilidad de la membrana, lo cual está asociado con la muerte celular⁸¹, por lo tanto este parámetro es considerado un buen indicador de daño hepático. La enzima γ-GTP está embebida en la membrana plasmática del hepatocito, mayormente en el espacio canalicular: esta enzima es considerada ser uno de los mejores indicadores de colestasis⁸². La hesperidina previno parcialmente el incremento de la ALT y de manera total la γ-GTP, en la cirrosis inducida experimentalmente. Por lo tanto, se sugiere que la hesperidina posee propiedades anti necróticas y anticolésticas.

El estrés oxidativo conduce a una pérdida en la reducción del potencial celular, es decir una gran disminución en la capacidad reductora de los pares redox celulares como el glutatión^{83, 84}. Los desbalances en el equilibrio redox pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y radicales libres que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN. Los efectos del estrés oxidativo dependen de la magnitud de estos cambios, y de si la célula es capaz de superar los pequeños daños y de recuperar su estado original. Sin embargo, se ha descrito que el estrés oxidativo severo puede causar la muerte celular y aún una oxidación moderada puede desencadenar la apoptosis, mientras que si es muy intensa puede provocar la necrosis¹².

La peroxidación lipídica produce daño hepático por desintegración de la membrana celular, además promueve el desequilibrio del ambiente redox mantenido por el glutatión, principal antioxidante endógeno⁸⁴.

El proceso de peroxidación lipídica culmina con la destrucción del parénquima hepático.⁴⁹

La hesperidina ha mostrado que ejerce efecto protector ante el daño hepatotóxico establecido con ciclofosfamida, efecto debido a la regulación de PPAR hepática, la inflamación y el estrés oxidativo⁸⁵. En nuestro estudio, la hesperidina mostró un excelente efecto antioxidante, ya que previno de manera significativa el estrés oxidativo, esto demostrado en la cuantificación de los niveles de glutatión en hígado, donde la hesperidina mantuvo en niveles normales el GSH, GSSG y la relación de GSH/GSSG, de acuerdo a los resultados mostrados en este estudio. Además de ello, la hesperidina fue capaz de prevenir totalmente la peroxidación lipídica, demostrado con los niveles de MDA, estos parámetros en conjunto ayudan a mantener un balance en el estado Redox, con lo cual se puede afirmar que la hesperidina posee excelentes propiedades antioxidantes.

El contenido de glucógeno hepático, la principal fuente de energía, permite conocer la capacidad de biosíntesis del órgano, ante un daño establecido la función de almacén de glucógeno se altera, en este caso por la administración crónica del CCl₄. Esta disminución está asociada con el reemplazo de los hepatocitos por fibras de colágena en la fibrosis y cirrosis^{87, 88}. La hesperidina, interesantemente fue capaz de prevenir la depleción de este parámetro.

Estos resultados mostraron la destrucción del parénquima hepático, para confirmar este hecho se determinó el nivel de fibrosis, por cuantificación del contenido de residuos

hidroxiprolina. La administración crónica del CCl₄ incrementó en aproximadamente 6 veces el contenido de hidroxiprolina con respecto al grupo control, lo cual indica la presencia de fibrosis y por lo tanto, la constante formación de cicatrices de tejido conectivo, lo cual interfiere con el intercambio de oxígeno y nutrientes entre los hepatocitos y los sinusoides. La hesperidina fue capaz de prevenir de manera significativa el incremento de este parámetro y por lo tanto, de la fibrosis.

Este hecho fue confirmado por la determinación a nivel histológico de la fibrosis mediante las tinciones de hematoxilina y eosina, y tricrómica de Masson. En ambas tinciones se confirmó la distorsión del parénquima hepático ocasionada por la administración del CCl₄, donde se pudo observar los nódulos de regeneración y las fibras abundantes de colágena, mientras que en los grupos con tratamiento concomitante con hesperidina, esta distorsión fue prevenida significativamente y confirmada por la observación de una menor cantidad de fibras de colágena y un aumento en la cantidad de los hepatocitos de neoformación. Con estos resultados se confirman las propiedades antinecróticas y antifibróticas de la hesperidina. La fibrogénesis hepática es un proceso dinámico e integrado tanto de manera molecular, tisular como celularmente y es considerada con potencial de ser reversible, este proceso impulsa la progresión de las enfermedades crónicas del hígado hacia la cirrosis y la insuficiencia hepática⁸⁷. Los miofibroblastos hepáticos, originados por la activación de las células estelares hepáticas y los fibroblastos portales que se caracterizan por una proliferación y supervivencia, promueven la producción de diversas citocinas profibrógenas y proinflamatorias. La cirrosis hepática es considerada la etapa final del estadio de fibrosis y está fuertemente relacionada con el estrés oxidativo, la inflamación crónica y la producción de citocinas profibrógenas especialmente del TGF-β^{88, 89}. El TGF-β incrementa la producción de proteínas de la matriz extracelular evidenciado fuertemente en el modelo de daño hepático inducido con alcohol^{90, 91}. Por otro lado, el TGF-β estimula a los hepatocitos, los cuales sintetizan CTGF en el daño hepático. En estudios previos se ha sugerido que el CTGF es un importante mediador río abajo del TGF-β, con lo cual la señal de esta proteína es amplificada y con ella la acción profibrógena en el hígado, y en otros tejidos^{44, 91}. La cirrosis involucra el incremento de ROS y la activación de vías de señalización del TGF-β y el CTGF reguladas por NF-κB, el cual es activado por la inducción del CCl₄, a través del estrés oxidativo¹⁵. El NF-κB es un

factor de transcripción regulado por redox y su activación vincula el daño hepático celular con el estrés oxidativo, así como con un incremento en la producción de citocinas, lo cual está relacionado directamente con la muerte celular. En este estudio se determinó el aumento en la expresión de la subunidad p-65, así como las proteínas TGF- β y CTGF. La hesperidina fue capaz de prevenir el incremento en la expresión de dichas proteínas. Con lo cual se refuerza la capacidad antifibrótica de este compuesto. El proceso inflamatorio caracterizado por el incremento en la expresión de citocinas proinflamatorias, las cuales se han descrito que juegan un papel importante en el desarrollo de enfermedades hepáticas⁹², han sido el foco de atención de muchos investigadores en diversas patologías así como en el daño hepático inducido con CCl₄^{15,92}. Por otro lado, la citocina antiinflamatoria IL-10 es producida por diversas células del sistema inmunológico, incluido el hígado. En estudios previos se ha demostrado que la producción de la IL-10 en el hígado se da en el interior de los hepatocitos, células sinusoidales, células de Kupffer, células estelares y en linfocitos⁹³. Además, se ha encontrado que la IL-10 exógena posee un efecto terapéutico en la fibrosis hepática inducida con CCl₄ en ratas⁹⁴. En este estudio se demostró que la hesperidina regula a la alza la expresión de esta citocina, con lo cual se sugiere el efecto benéfico antiinflamatorio sobre el daño hepático. Finalmente, se realizó la determinación cualitativa de los niveles de expresión de mRNA de los genes pertenecientes a las citocinas profibrogénicas TGF- β y CTGF. La hesperidina previno la expresión del mRNA de ambos genes, reforzando así los resultados de la capacidad de inmunomodulación de este compuesto.

IX.2 La L-teanina previene la cirrosis experimental.

La L-teanina es un aminoácido presente exclusivamente en la planta *Camelia sinensis*; en este estudio se demostró que este compuesto es capaz de prevenir parcialmente la fibrosis inducida con CCl₄ en la rata. Este hecho se explica parcialmente por la capacidad antioxidante de dicho compuesto, ya que en este estudio se demostró que el incremento de la peroxidación lipídica se previno totalmente y la disminución de la relación de GSH/GSSG se previno de manera parcial pero significativa tras la administración concomitante de la L-teanina con CCl₄ durante 8 semanas; además de ello los resultados

demuestran que la L-teanina por si sola es capaz de incrementar el contenido de GSH y de mantener en niveles normales la relación GSH/GSSG en el hígado.

El estrés oxidativo está directamente asociado con la fibrosis hepática⁹⁵. Se ha demostrado que tanto la peroxidación lipídica como la necrosis fue significativamente suprimida en el hígado de animales con suplemento de antioxidantes tal como diversos flavonoides como la silimarina o incluso con vitamina E⁹⁶. Además, en otros estudios previos se ha reportado que la L-teanina previene el daño hepático agudo inducido con CCl₄ en ratones y previene la apoptosis en hepatocitos⁹⁶.

El NF-κB es una familia de factores de transcripción que regula diversas respuestas inflamatorias, e inmunológicas en el hígado y diversos órganos. Por lo tanto, se le ha asociado con enfermedades hepáticas, como la fibrosis, ya que promueve el aumento en la expresión de citocinas pro-inflamatorias y pro-fibróticas. En este estudio, el aumento en su expresión fue inducido por la administración de CCl₄ y fué altamente dependiente del estrés oxidativo¹⁵. En este estudio se demostró que la L-teanina reduce la expresión de este factor inducida con CCl₄, incluso por debajo de los niveles control, lo cual demuestra la importante capacidad de inmunomodulación de este compuesto.

Los resultados presentados mostraron también los ensayos histopatológicos en los diversos grupos tratados y como era de esperarse, en el grupo tratado con CCl₄, el parénquima hepático se mostró distorsionado; también se observó una clara fibrosis. La L-teanina administrada concomitantemente fue capaz de prevenir la distorsión y la fibrosis de manera importante. Una vez que se establece la fibrosis es fácil perder el equilibrio entre la síntesis y degradación de la colágena, por lo que comienza a acumularse rápidamente alcanzando así el estadio de cirrosis⁵⁰. La acumulación de las fibras de colágena conduce a una constante formación de cicatrices de tejido conectivo, lo cual evita el intercambio de oxígeno y nutrimentos entre los hepatocitos y los sinusoides debido a la alteración del parénquima hepático. Los resultados mostraron un incremento de aproximadamente 6 veces del contenido de colágena en la cirrosis. La administración de la L-teanina muestra una prevención parcial pero significativa, indicando así su importante capacidad antifibrótica, demostrado con los ensayos bioquímicos, histopatológicos y por el decremento de la acumulación de MEC.

La cirrosis está fuertemente asociada con el estrés oxidativo y la inflamación crónica, y de manera relevante con el incremento en la expresión del TGF- β ⁸⁸⁻⁹⁰. El TGF- β juega un rol central en la activación de las HSC, lo cual promueve el incremento de la producción de proteínas de MEC aumentando de manera importante la progresión de la fibrosis⁸⁹. En el presente estudio, la L-teanina inhibió la expresión del TGF- β y en consecuencia la fibrosis hepática. Por otro lado, el CTGF, otro mediador importante en la fibrogenesis, se ha relacionado como regulador río abajo del TGF- β , sin embargo, se ha propuesto también la colaboración de tipo sinérgico para el desarrollo de la fibrosis con el TGF- β , mostrando así una regulación a la alta de la producción de proteínas de matriz extracelular⁹⁹⁻¹⁰¹. En concordancia con el TGF- β , la L-teanina también previno de manera significativa el incremento en la expresión del CTGF; para confirmar el efecto antifibrótico de la L-teanina en este estudio se evaluaron los niveles de mRNA del CTGF y del TGF- β . Los resultados del grupo tratado con L-teanina y CCl₄, mostraron una reducción en la expresión de los niveles de mRNA para estos genes; con lo cual se confirma el efecto antifibrótico de este compuesto. La remodelación del tejido es regulada por diversos mecanismos, en los cuales se involucran las colagenasas o MMPs encargadas de degradar la MEC; estas metaloproteinasas juegan roles importantes en la fisiopatología de diversas enfermedades que involucran la fibrosis del tejido¹⁰³. Se sabe que la degradación de la MEC es regulada por el incremento en la expresión de las MMPs y por la disminución de los inhibidores de las MMPs (TIMPs), por sus siglas en ingles¹⁰⁴. En este estudio se encontró que existe una moderada activación de la MMP-13, al término de las 8 semanas de tratamiento con CCl₄ el incremento de esta citocina resultó significativo con respecto al grupo control de manera importante este incremento se vuelve significativo con respecto al grupo de daño tras la administración concomitante con L-teanina, lo cual sugiere un importante mecanismo para el tratamiento de la fibrosis mediante la regulación de la degradación de la colágena en la fibrosis hepática. El tejido cirrótico, además de la fibrosis, está caracterizado por la inflamación. En este trabajo se demostró que la L-teanina previno de manera significativa la expresión de la IL-1 β y la IL-6, y de manera análoga al compuesto hesperidina, la L-teanina también reguló a la alta la expresión de la IL-10, demostrando la importante capacidad anti-inflamatoria de este compuesto. Las propiedades antiinflamatorias de la L-teanina están asociadas a su habilidad para disminuir la expresión del NF- κ B, con lo cual se

presume una disminución importante en la activación de esta proteína y por lo tanto la disminución de las citocinas pro-inflamatorias y pro-fibróticas. Con esto se sugiere que la L-teanina tiene una importante capacidad inmunomoduladora para prevenir la fibrosis hepática.

IX.3 Efecto hepatoprotector común de la hesperidina y la L-teanina

Tanto la hesperidina como la L-teanina fueron capaces de prevenir el daño hepático inducido con CCl₄. Es importante resaltar que la fibrogénesis hepática es un proceso dinámico, y estrechamente vinculado tanto con el estrés oxidativo como con la producción de diversas citocinas profibrogénicas, pro y antiinflamatorias reguladas en gran parte por el NF-κB¹⁵.

En nuestro trabajo, tanto la hesperidina como la L-teanina mostraron un importante efecto hepatoprotector global, es decir, destaca no solo el efecto en las actividades enzimáticas, el estrés oxidativo y la fibrosis de manera aislada sino vinculado con su capacidad inmunomoduladora. De manera particular, la hesperidina mostró un efecto benéfico en el restablecimiento de los niveles de glucógeno, ya que este compuesto logró restablecer de manera parcial pero significativa los niveles del glucógeno hepático, el cual es quizá la fuente más importante de energía en el organismo, se sabe que el control sobre la síntesis y degradación del glucógeno hepático es crucial para regular el nivel de glucosa en plasma. Además, la síntesis de glucógeno y la glucogenólisis se ven afectados por las citocinas proinflamatorias tales como el TNF-α, la interleucina-1β (IL-1β) y el interferón-γ (IFN-γ), los cuales, en niveles de expresión elevados, suprimen la captación de glucosa^{106,107}. De acuerdo a este hecho, en nuestro estudio se observó que la IL-1β fue incrementada de manera importante por el daño inducido con CCl₄, y por lo tanto, la depleción del contenido de glucógeno hepático fue total, y ante el tratamiento con hesperidina este parámetro es capaz de ser prevenido correlacionando de manera directa con la prevención en la expresión de dicha interleucina.

Sin embargo, se debe resaltar la acción tanto de la hesperidina como de la L-teanina sobre el glutatión, el cual es otro parámetro que permite inferir la vinculación entre el estrés oxidativo y la inmunomodulación ejercida por dichos compuestos. En condiciones normales, se producen bajas cantidades de ROS como subproductos de la respiración

aeróbica. Por lo tanto, las células emplean varios sistemas de mediadores antioxidantes y el balance GSH/GSSG para mantener bajos los niveles de ROS.

En nuestro estudio ambos compuestos previnieron de manera significativa el estrés oxidativo manteniendo los niveles, incluso por arriba de los niveles control de la razón de GSH/GSSG, evidenciando nuevamente las propiedades de estos compuestos. Sin embargo, en estudios recientes se ha vinculado las funciones del GSH con la modulación del TGF- β mediante la acción autocrina de las células estelares activadas, sirviendo el GSH como segundo mensajero en la vía de activación del TGF- β ¹⁰⁸.

IX.4 Efecto de la hesperidina y la L-teanina en los niveles basales.

Un hallazgo interesante en el presente estudio es la capacidad inmunomoduladora tanto de la hesperidina como de la L-teanina, confirmada por los niveles de expresión de las citocinas medidas, en donde ambos compuestos sugieren que por sí solos son capaces de disminuir los niveles basales de la expresión proteica de dichas citocinas.

El hígado, en condiciones normales, es el órgano principal para la síntesis de muchos metabolitos y de la mayoría de las diferentes proteínas plasmáticas. Estas funciones están coordinadas y reguladas por citocinas en respuesta a los cambios endocrinos que forman una red compleja de moléculas mediadoras¹⁰⁹. La producción constitutiva de citocinas en el hígado normal es nula o baja y es importante tener en consideración que la susceptibilidad que posee cada individuo para reaccionar y activar sus mecanismos patogénicos, o para activar sus sistemas moduladores, por ejemplo antiinflamatorios y apoptosis, constituyen una pieza clave para el inicio y la continuidad de la lesión. Por lo tanto, en los resultados obtenidos en los que se muestra la inhibición total de la expresión de las diferentes citocinas, puede ser explicado por la capacidad dual de ambos compuestos en los que interviene tanto el estrés oxidativo, como la capacidad inmunomoduladora promoviendo un sinergismo en su acción como supresores de la producción de las diferentes citocinas involucradas en el desarrollo de la cirrosis hepática. Nuestros resultados apoyan la hipótesis que tanto la hesperidina como la L-teanina previenen el daño hepático de manera importante por su capacidad antioxidante, vinculada fuertemente con su capacidad inmunomoduladora.

X. CONCLUSIONES

En conclusión, se reprodujo de manera exitosa el modelo de daño hepático inducido con CCl₄ en la rata; los mecanismos implicados en la progresión y el establecimiento de la fibrosis y cirrosis hepática involucran el estrés oxidativo, y la producción de citocinas pro-fibrogénicas y proinflamatorias reguladas por el NF-κB.

En este estudio se demuestra que tanto la hesperidina como la L-teanina poseen propiedades antioxidantes, antifibróticas, e inmunomoduladoras, demostradas por su capacidad para prevenir el estrés oxidativo y la disminución de la proteína p-65, reflejando así su capacidad antifibrótica. La hesperidina y la L-teanina tienen un alto potencial como fármacos hepatoprotectores, para el tratamiento de la fibrosis y la cirrosis. La hesperidina exhibe también una significativa actividad antiinflamatoria al modular la síntesis de prostaglandinas y regulación de la actividad de la ciclooxigenasa 2 (COX-2).

Finalmente, considerando las terapias actuales para el tratamiento de las enfermedades hepáticas, estos compuestos surgen como una alternativa viable, por su excelente capacidad antioxidante e inmunomoduladora, por su bajo costo y casi nula toxicidad.

XI. PERSPECTIVAS

De acuerdo a los resultados obtenidos, surgen nuevas propuestas, para profundizar en el estudio de estos compuestos y algunos otros de origen herbolario. Estos son:

- Proponer análisis clínicos en pacientes que cursen alguna enfermedad hepática, dada su baja toxicidad y amplia ventana terapéutica.
- Realizar estudios de formulación para aumentar la biodisponibilidad de los compuestos considerando sus tiempos de vida media.
- Utilizar técnicas de biología molecular para elucidar diferentes vías de señalización implicadas en el desarrollo y progresión de la cirrosis.
- Evaluar la capacidad moduladora de la L-teanina como estrategia terapéutica de las enzimas responsables de la degradación de colágena.
- Evaluar mediante estudios de inmunohistoquímica la activación de las HSC.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Base de datos del *Sistema Nacional de Información de Salud (SINAIS)*, <http://sinais.salud.gob.mx/>.
2. Netter F.H, Colección Ciba de Ilustraciones médicas, Sistema digestivo: hígado, vías biliares y páncreas. Tomo 3.3, secciones XV, XVI y XVII, Ed científicas y técnicas (Masson-Salvat de Medicina), Barcelona, 1981.
3. Ishibashi H, Nakamura M, Komori A, et al., Liver architecture, cell function, and disease. *Semin Immunopathol*, 2009; 31: 399-409.
4. Arias I, Boyer J, Chisari F, et al. *The Liver Biology and Pathobiology*, 4a edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001.
5. Muriel P and Rivera-Espinoza Y, Beneficial drugs for liver diseases. *J Appl Toxicol*, 2008; 28: 93-103.
6. Sahoo N, Manchikanti P and Dey S, Herbal drugs: Standards and regulation. *Fitoterapia*, 2010; 81: 462-71.
7. Guyton A, Hall J. *Tratado de Fisiología Médica*, 10a edición. Mc Graw-Hill Interamericana, México D.F, 2001.
8. Desmet VJ, MacSween RNM, Roskams T, Organizational Principles, in *The Liver: Biology and Pathobiology*, 3ª edition. Raven Press Ltd., Nueva York, 1994.
9. González RC, Hevia VA, Davidson HG. *Anatomía Microscópica del Hígado*, en *Tratado de Hepatología*. (eds) Herrerías Gutiérrez JM, Díaz Belmont A, Jiménez Saenz M; tomo 1, Universidad de Sevilla; España, 1996.
10. Matsumoto T, Komori R, Hamade HK, et al., A study on the normal structure of human liver, with special reference to its angioarchitecture, *Jkeikai Med J*, 1979, 1-40.
11. Wake K. Karl Wilhelm Kupffer and His Contributions To Modern Hepatology. *Comp Hepatol*. 2004 Jan 14;3 Suppl 1:S2.
12. Muriel P, Some experimental models of liver damage, en *Hepatotoxicity: from genomics to in vitro and in vivo models*. John Wiley & Sons LTD. 2007: West Sussex, UK.

-
13. B Sun and M Karin, NF- κ B signaling, liver disease and hepatoprotective agents. *Oncogene*, 2008; 27: 6228-44.
 14. Stanculeț N, Grigoras A, Avadanei R, et al., Relationship between Kupffer cells, inflammation, and fibrosis in chronic hepatitis B and C. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*, 2013; 117: 880-9.
 15. Muriel P, NF- κ B in liver diseases: a target for drug therapy. *J Appl Toxicol*, 2009; 29: 91-100.
 16. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K, Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol*, 1994; 10: 405-55.
 17. Wu J and Zern M, NF-Kappa B Liposomes and pathogenesis of hepatic injury and fibrosis. *Front Biosc*, 1999; 15: 520-27.
 18. Greenwel P, Geerts A, Ogata I, et al. M. Liver fibrosis, en *The Liver: Biology and Pathobiology*, de Arias IM eds., 3a. ed., Ed. Raven Press Ltd., Nueva York, 1994.
 19. Clemens MJ. Cytokines; Medical perspectives series; Editores: Read AP y Brown T; Ed. Bioscientific publishers, Oxford 1991.
 20. Kumar, MBBS, MD, FRCPath, V.; Abul K. Abbas, MBBS, Nelson Fausto, MD and Jon Aster, MD. Ch3-Tissue Renewal, Regeneration and Repair en Saunders (Elsevier) Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease 8th edición.
 21. Knittel T, Janneck T, Müller L, et al., Transforming Growth Factor β 1-Regulated Gene Expression of Ito Cells. *Hepatology*, 1996; 24: 2
 22. Senties-Gómez MD, Gálvez-Gastélum FJ, Meza-García E, et al., Hepatic fibrosis: role of matrix metalloproteases and TGF β . *Gac Med Mex*, 2005; 141-4: 315-22.
 23. Fausto N, Mead JE, Gruppuso PA, et al., Effects of TGF-beta s in the liver: cell proliferation and fibrogenesis. *Ciba Found Symp*, 1991; 157: 165-74.
 24. Miyazono K and Heldin CH, The mechanism of action of transforming growth factor-beta. *Gastroenterol Jpn*, 1993; 28:81-5;
 25. Louis H, LeMoine O, Peny MO, et al., Production and role of interleukin-10 in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology*, 1997; 25: 1382-9.
 26. DeCicco LA, Rikans LE, Tutor CG, et al., Serum and liver concentrations of tumor necrosis factor α and interleukin-1 β following administration of carbon tetrachloride to male rats. *Toxicol Lett*, 1998; 98: 115 - 21.

-
27. Llorente L, Richaud-Patin Y, Alcocer-Castillejos N, et al., Cytokine gene expression in cirrhotic and non-cirrhotic human liver. *J Hepatol*, 1996; 24: 555 - 63.
 28. Luster MI, Germolec DR, Yoshida T, et al., Endotoxin-induced cytokine gene expression and excretion in the liver. *Hepatology*, 1994; 19: 480-8.
 29. Harry D, Anand R, Holt S, Davies S, et al., Increased sensitivity to endotoxemia in the bile duct-ligated cirrhotic rat. *Hepatology*, 1999; 30:1198-205.
 30. Simpson KJ, Lukacs NW, Colleti L, et al., Cytokines and the liver. *J Hepatol*, 1997; 27: 1120-32.
 31. Li MC and He SH, IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*, 2004; 10: 620-5.
 32. Le Moine O, Louis H, Sermon F, et al., Interleukin-10 and liver diseases. *Acta Gastroenterol Belg*, 1999; 62: 1-8.
 33. Nelson DR, Lauwers GY, Lau JYN, et al., Interleukin 10 treatment reduces fibrosis in patients with chronic hepatitis C: a pilot trial of interferon nonresponders. *Gastroenterol*, 2000; 118: 655-60.
 34. Thompson KC, Trowern A, Fowell A, et al., Primary rat and mouse hepatic stellate cells express the macrophage inhibitor cytokine interleukin-10 during the course of activation in vitro. *Hepatology*, 1998; 28: 1518-24.
 35. Huang YH, Shi MN, Zheng WD, et al., Therapeutic effect of interleukin-10 on CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats. *World J. Gastroenterol*, 2006; 12:1386-91.
 36. Brinckerhoff CE, Rutter JL, Benbow U, Interstitial collagenases as a markers of tumor progression. *Clin Cancer Res*, 2000; 6: 4823-30.
 37. Arthur MJ, Fibrogenesis II. Metalloproteases and their Inhibitors in liver fibrosis. *Gastrointest Liver Physiol*, 2000; 279: G245-49.
 38. Egeblad M, and Werb Z, New functions of the matrix metalloproteases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 2002; 2: 161-174.
 39. www.rzpd.de/cards/index/html.
 40. Murphy G, Stanton H, Cowell S, et al., Mechanism for pro-matrix metalloprotease activation. *APMIS*, 1999; 107: 38-44.
 41. Westermarck J, and Kähäri VM, Regulation of matrix metalloproteases expression tumor invasion. *FASEB J*, 1999; 13: 781-92.

-
42. Lau L F, and Nathans D, Identification of a set of genes expressed during the G0/G1 transition of cultured mouse cells. *EMBO J*, 1985; 4: 3145–51.
 43. Sánchez-López E, Rodríguez-Diez R, Rodríguez-Vita J, et al., El factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF): factor clave en el inicio y la progresión del daño renal. *Nefrología*, 2009; 29: 382 - 91.
 44. Kothapalli D, Frazier KS, Welply A, et al., Transforming growth factor beta induced anchorage-dependent growth of NRK fibroblasts via a connective tissue growth factor-dependent pathway. *Cell Growth Differ*, 1997; 8: 61–8.
 45. O'brien TP, Yang GP, Sanders L, et al., Expression of *cyr61*, a growth factor-inducible immediate-early gene. *Mol Cell Biol*, 1990; 10: 3569–77.
 46. Kireeva ML, Mo FE, Yang GP, et al., *Cyr61*, a product of a growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion. *Mol Cell Biol*, 1996; 16: 1326–34.
 47. Abou-Shady M, Friess H, Zimmermann A, et al., Connective tissue growth factor in human liver cirrhosis. *Liver*, 2000; 20: 296-304.
 48. Hernández-Gea, V. and Friedman, SL. Pathogenesis of liver fibrosis. *Annu Rev Pathol*, 2011. 6: p. 425-56.
 49. Muriel, P. Peroxidation of lipids and liver damage, en *Antioxidants, Oxidants and Free radicals* BH. Salem., Editor. 1997: Washington D.C.
 50. Muriel P, Moreno MG, Hernández MC, et al., Resolution of liver fibrosis in chronic CCl₄ administration in the rat after discontinuation of the treatment: effect of silymarin, silibinin, colchicine and trimethylcolchicine acid. *Basic & Clin Pharmacol & Toxicol*, 2005; 96: 275 - 80.
 51. Pérez Tamayo R, Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ an adequate model of human cirrhosis? *Hepatology*, 1983; 3: 112-20.
 52. Majumdar S and Srirangam R, Solubility, Stability, Physicochemical Characteristics and In Vitro Ocular Tissue Permeability of Hesperidin: A Natural Bioflavonoid. *Pharm Res*, 2009; 26: 1217-25.
 53. Garg A1, Garg S, Zaneveld LJ, et al., Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytother Res*, 2001; 15: 655-69.

-
54. Franke AA, Cooney RV, Henning SM, et al.. Bioavailability and antioxidants effects of orange juice components in humans. *J Agric Food Chem*, 2005; 53: 5170-78.
55. Hirata A, Murakami Y, Shoji M, et al.. Kinetics of radical-scavenging activity of hesperetin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 expression. *Anticancer Res*, 2005; 25: 3367-74
56. Vallejo F, Larrosa M, Escudero E, et al.. Concentration and Solubility of flavonones in Orange Beverages Affect Their bioavailability in humans. *J Agric. Food Chem*, 2010; 58: 6516-24.
57. Yamada M, Tanabe F, Arai N, et al.. Bioavailability of Glucosyl Hesperidin in Rats. *Biotechnol Biochem*, 2006; 70: 1386- 94.
58. L-theanine Monograph. *Altern Med Rev*, 2005; 10: 136-8.
59. Flora of China Editorial Committee 2007. *Flora of China*. 2007; 12: 1–534
60. Sakato Y, The Chemical constituents of tea: III. A new amide theanine. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 1949; 23: 3262-67.
61. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, et al.. Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis, *Angew Chem Int Ed Engl*, 2011; 50: 586-621.
62. Yokogoshi H, Kobayashi M, Mochizuki M, et al., Effect of theanine, γ -glutamylethylamide, on brain monoamines and striatal dopamine release in conscious rats. *Neurochem Res*, 1998; 23: 667-73.
63. Juneja LR, Chu D, Okubo T, et al.. L-theanine a unique amino acid of green tea and its relaxation effects in humans. *Food Sci Tech*, 1999; 10: 199-204.
64. Sugiyama T and Sadzuka Y. Combination of theanine with doxorubicin inhibits hepatic metastasis of M5076 ovarian sarcoma. *Clin Cancer Res*, 1999; 2: 413 - 16.
65. Sugiyama, T., Sadzuka, Y. et al.. The effects of theanine as a novel biochemical modulator on the antitumor activity of adriamycin. *Cancer lett*, 1996; 2: 203- 09.
66. Unno T, Suzuki Y, Kakuda T, et al.. Metabolism of Theanine, γ -Glutamylethylamide, in rats. *J. Agric. Food Chem*, 1999; 47: 1593- 96.
67. Desai MJ1, Gill MS, Hsu WH, et al.. Pharmacokinetics of Theanine Enantiomers in rats. *Chirality*, 2005; 17: 154-62.

-
68. Lee KH, Yeh MH, Kao ST, et al.. The inhibitory effect of hesperidin on tumor cell invasiveness occurs via suppression of activator protein 1 and nuclear factor-kappaB in human hepatocellular carcinoma cells. *Toxicol Lett*, 2010; 194: 42- 9.
69. Kim TI, Lee YK, Park SG, et al.. L-Theanine, an amino acid in green tea, attenuates beta-amyloid-induced cognitive dysfunction and neurotoxicity: reduction in oxidative damage and inactivation of ERK/p38 kinase and NF-kappaB pathways. *Free Radic Biol Med*, 2009; 47:1601-10.
70. Glossman M, and Neville D. Gamma-glutamyl transferase in kidney brush border membranes. *FEBS Lett*, 1972; 19: 340-44
71. Reitman S, and Frankel SA, A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic pyruvic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol*, 1957; 28: 56 - 63.
72. Seifter S, Seymour B, Novic B, et al., The estimation of glycogen with the anthrone reagent. *Arch Biochem*, 1950; 25: 191.
73. Buege JA and Austin SD, *Methods in Enzimology*. 1978; 30: 302.
74. Bradford M, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal protein dye binding. *Anal Biochem*, 1976; 72: 248 - 54.
75. Rojkind M, and González E, An improved method for determining special radioactivities of proline and hidroxyproline. *Anal Biochem*, 1974; 57: 1 – 7.
76. Goldring JP, Protein quantification methods to determine protein concentration prior to electrophoresis. *Methods Mol Biol*, 2012; 869: 29-35.
77. Segovia J, Vergara P, Brenner M, Differentiation-dependent expression of transgenes in engineered astrocyte cell lines. *Neurosci Lett*, 1998; 242: 172-6.
78. Bettinger BT, Gilbert DM, Amberg DC, Actin up in the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004; 5: 410-5.
79. Hsieh HG, Huang HC, Lee FY, et al., Kinetics of cytokine expression in cirrhotic rats. *J Chin Med Assoc*, 2011;74: 385-93.
80. Kim WR, Flamm SL, Di Bisceglie AM et al., Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease. *Hepatology*, 2008; 47: 1363-70.

-
81. Linder H, The significance of transaminase determination for the evaluation of therapeutic success in liver diseases. *Munch Med Wochenschr*, 1959; 101:1782-6.
 82. Muriel, P. and M.G. Moreno, Effects of silymarin and vitamins E and C on liver damage induced by prolonged biliary obstruction in the rat. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2004; 94:99-104.
 83. Muriel, P. and R. Deheza, Fibrosis and glycogen stores depletion induced by prolonged biliary obstruction in the rat are ameliorated by metadoxine. *Liver Int*, 2003; 23: 262-8.
 84. Mahmoud AM, Hesperidin protects against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity by upregulation of PPAR γ and abrogation of oxidative stress and inflammation. *Can J Physiol Pharmacol*, 2014;16: 1-8
 85. Krahenbuhl S, Weber FL Jr, Brass EP, Decreased hepatic glycogen content and accelerated response to starvation in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Hepatology*, 1991; 14: 1189-95.
 86. Novo E, Cannito S, Paternostro C. et al., Cellular and molecular mechanisms in liver fibrogenesis. *Arch Biochem Biophys*, 2014; 548: 20-37
 87. Muriel P, Cytokines in liver diseases, en Hepatotoxicity: from genomics to in vitro and in vivo models. John Wiley & Sons LTD. 2007: West Sussex, UK. 371-389.
 88. Gressner AM and Weiskirchen R, Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med*, 2006; 10: 76-99.
 89. Meyer C, Meindl-Beinker NM, Dooley S, TGF-beta signaling in alcohol induced hepatic injury. *Front Biosci*, 2010; 15: 740-9.
 90. Gressner AM, Lahme B, Mannherz HG, et al., TGF-beta-mediated hepatocellular apoptosis by rat and human hepatoma cells and primary rat hepatocytes. *J Hepatol*, 1997; 26: 1079-92.
 91. Tilg H, Kaser A, Moschen AR. How to modulate inflammatory cytokines in liver diseases. *Liver Int*. 2006; 26: 1029–39.
 92. Le Moine O, Louis H, Sermon F, et al., Interleukin-10 and liver diseases. *Acta Gastroenterol Belg*, 1999; 62: 1-8.

-
93. Huang YH, Shi MN, Zheng WD, et al., Therapeutic effect of interleukin-10 on CCl₄-induced hepatic fibrosis in rats. *World J Gastroenterol*, 2006; 12: 1386-91.
94. Poli G and Parola M, Oxidative damage and fibrogenesis. *Free Radic Biol Med*, 1997; 22: 287-305.
95. Aldaba-Muruato LR, Moreno MG, Shibayama M, et.al., Allopurinol reverses liver damage induced by chronic carbon tetrachloride treatment by decreasing oxidative stress, TGF- β production and NF- κ B nuclear translocation. *Pharmacology*. 2013; 92: 138-49.
96. Jiang W, Gao M, Sun S, et al., Protective effect of L-theanine on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012; 422: 344-50.
97. Gressner AM, Lahme B, Mannherz HG, et al., TGF-beta-mediated hepatocellular apoptosis by rat and human hepatoma cells and primary rat hepatocytes. *J Hepatol*, 1997; 26: 1079-92.
98. Gressner OA, Weiskirchen R, Gressner AM, Evolving concepts of liver fibrogenesis provide new diagnostic and therapeutic options. *Comp Hepatology*, 2007; 6: 1 - 13.
99. Friedman SL, Mechanisms of Hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*, 2008; 134: 1655 - 69.
100. Sánchez-López E1, Rodrigues Díez R, Rodríguez Vita J, et al., Connective tissue growth factor (CTGF): a key factor in the onset and progression of kidney damage. *Nefrologia*, 2009; 29: 382-91.
101. Weng HL, Ciucan L, Liu Y, et al., Profibrogenic transforming growth factor-beta/activin receptor-like kinase 5 signaling via connective tissue growth factor expression in hepatocytes. *Hepatology*, 2007; 46: 1257-70.
102. Gressner OA, Lahme B, Siluschek M, et al., Activation of TGF-beta within cultured hepatocytes and in liver injury leads to intracrine signaling with expression of connective tissue growth factor. *J Cell Mol Med*, 2008; 12: 2717-30.
103. Consolo M, Amoroso A, Spandidos DA, et al., Matrix metalloproteinases and their inhibitors as markers of inflammation and fibrosis in chronic liver disease *Int J Mol Med*, 2009; 24: 143-52.

-
104. Iredale JP, Matrix turnover in fibrogenesis. *Hepatogastroenterology*, 1996; 43: 56-71.
105. Fernández-Martínez E, Pérez-Álvarez V, Tsutsumi V, et al., Chronic bile duct obstruction induces changes in plasma and hepatic levels of cytokines and nitric oxide in the rat. *Exp Toxicol Pathol*, 2006; 58:49–58.
106. Fernández-Martínez E, Wens-Flores I, Moreno GM, et al., Short-term effects of thalidomide analogs on hepatic glycogen and nitric oxide in endotoxin-challenged rats. *Gen Physiol Biophys*, 2008; 27: 203–10.
107. Pieter J, De Bleser, Guoxiong Xu, et al., Glutathione Levels Discriminate between Oxidative Stress and Transforming Growth Factor- β Signaling in Activated Rat Hepatic Stellate Cells. *J Biol Chem*, 1999; 274: 33881- 87.
108. Andus T and Holstege A. Cytokines and the liver in health and disease. Effects on liver metabolism and fibrogenesis. *Acta Gastroenterol Belg*, 1994; 57: 236-44.

Hesperidin Prevents Liver Fibrosis in Rats by Decreasing the Expression of Nuclear Factor- κ B, Transforming Growth Factor- β and Connective Tissue Growth Factor

J. Eliuth Pérez-Vargas^a Natanael Zarco^b Mineko Shibayama^c José Segovia^b
Víctor Tsutsumi^c Pablo Muriel^a

Departments of ^aPharmacology, ^bPhysiology, Biophysics and Neurosciences and ^cMolecular Pathogenesis and Infectomics, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico

Key Words

Hesperidin · Oxidative stress · Nuclear factor- κ B ·
Fibrosis · Carbon tetrachloride · Profibrotic cytokines ·
Proinflammatory cytokines

Abstract

Background/Aims: To evaluate the antioxidant, immunomodulatory, antinecrotic and antifibrotic effects of hesperidin on CCl₄-induced cirrhosis. **Methods:** Liver damage was produced by giving CCl₄ injections (0.4 g/kg, i.p., 3 times per week for 8 weeks) to rats. Hesperidin (200 mg/kg) was administered using gavage. The expression of nuclear factor- κ B (NF- κ B), transforming growth factor- β (TGF- β), connective tissue growth factor (CTGF), interleukin (IL)-10 and IL-1 β was assessed using Western blotting. Alanine aminotransferase (ALT) and γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP) serum activities, glycogen content, reduced/oxidised glutathione (GSH/GSSG) ratio, lipid peroxidation degree and fibrosis (using hydroxyproline content and a histopathological analysis) were measured. **Results:** CCl₄ increased the enzymatic activities of ALT and γ -GTP, liver lipid peroxidation, the hydroxyproline content as well as NF- κ B, TGF- β , CTGF, IL-1 β and IL-10 levels and decreased the glycogen content and

GSH/GSSG ratio. Hesperidin significantly decreased the modifications produced by CCl₄, except in the case of IL-10, which was further increased by the flavone. The group receiving hesperidin alone showed decreases in lipid peroxidation, NF- κ B, TGF- β , CTGF and IL-1 β and an increase in IL-10. The results of the histopathological analysis were in agreement with the biochemical and molecular findings. **Conclusions:** This study demonstrates that hesperidin prevents experimental necrosis and fibrosis. The action mechanism of hesperidin is associated with its ability to reduce oxidative stress and modulate proinflammatory and profibrotic signals. These results support earlier findings demonstrating the beneficial effect of hesperidin against liver damage.

© 2014 S. Karger AG, Basel

Introduction

The modern pharmaceutical industry has relied on traditional knowledge for the synthesis and development of drugs. However, the process of scientifically verifying these traditional products continues today with the constant discovery of new applications.

KARGER

© 2014 S. Karger AG, Basel
0031-7012/14/0942-0080\$39.50/0

E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/pha

Pablo Muriel
Departamento de Farmacología
Cinvestav-IPN, Apartado Postal 14-740
Mexico City 07000 (Mexico)
E-Mail pmuriel@cinvestav.mx



L-Theanine prevents carbon tetrachloride-induced liver fibrosis via inhibition of nuclear factor κ B and down-regulation of transforming growth factor β and connective tissue growth factor

JE Pérez-Vargas¹, N Zarco², P Vergara², M Shibayama³, J Segovia², V Tsutsumi³ and P Muriel¹

Abstract

Here we evaluated the ability of L-theanine in preventing experimental hepatic cirrhosis and investigated the roles of nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation as well as transforming growth factor β (TGF- β) and connective tissue growth factor (CTGF) regulation. Experimental hepatic cirrhosis was established by the administration of carbon tetrachloride (CCl₄) to rats (0.4 g/kg, intraperitoneally, three times per week, for 8 weeks), and at the same time, adding L-theanine (8.0 mg/kg) to the drinking water. Rats had ad libitum access to water and food throughout the treatment period. CCl₄ treatment promoted NF- κ B activation and increased the expression of both TGF- β and CTGF. CCl₄ increased the serum activities of alanine aminotransferase and γ -glutamyl transpeptidase and the degree of lipid peroxidation, and it also induced a decrease in the glutathione and glutathione disulfide ratio. L-Theanine prevented increased expression of NF- κ B and down-regulated the pro-inflammatory (interleukin (IL)-1 β and IL-6) and profibrotic (TGF- β and CTGF) cytokines. Furthermore, the levels of messenger RNA encoding these proteins decreased in agreement with the expression levels. L-Theanine promoted the expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 and the fibrolytic enzyme metalloproteinase-13. Liver hydroxyproline contents and histopathological analysis demonstrated the anti-fibrotic effect of L-theanine. In conclusion, L-theanine prevents CCl₄-induced experimental hepatic cirrhosis in rats by blocking the main pro-inflammatory and pro-fibrogenic signals.

Keywords

L-Theanine, liver damage, necrosis, oxidative stress, NF- κ B, cytokines, cirrhosis, carbon tetrachloride

Introduction

Cirrhosis is one of the most frequent and serious liver diseases and is the end stage of progressive fibrosis, which causes major disruptions to metabolic function and blood circulation.¹ Cirrhosis is characterized by the accumulation of extracellular matrix (ECM) proteins, and it causes the perturbation of liver homeostasis, leading to the intracellular release of cytokines. In particular, the fibrogenic cytokine, transforming growth factor β (TGF- β), is a key factor in cirrhosis development as it stimulates the generation of ECM and inhibits matrix protein removal.

¹Department of Pharmacology, Cinvestav-IPN Apartado, D.F. México

²Department of Physiology, Biophysics and Neurosciences, Cinvestav-IPN Apartado, D.F. México

³Department of Infectomics and Molecular Pathogenesis, Cinvestav-IPN Apartado, D.F. México

Corresponding author:

P Muriel, Department of Pharmacology, Cinvestav-IPN, Apdo. Postal 14-740, México 07000, D.F. México.

Email: pmuriel@cinvestav.mx