

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

"Evaluación del efecto de la *Stevia rebaudiana* en el daño hepático experimental"

TESIS

Que presenta M. EN C. ERIKA RAMOS TOVAR

Para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE FARMACOLOGÍA

Director de tesis: Dr. Pablo Muriel de la Torre

Diciembre, 2018.

Ciudad de México

AGRADECIMIENTOS

La realización de este proyecto de investigación fue llevado a cabo gracias al apoyo de la beca no. 380833 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y del donativo no. CB-253037 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, al laboratorio no. 15, del Departamento de Farmacología, a cargo del Dr. Pablo Muriel de la Torre perteneciente al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco a la vida por darme la oportunidad de seguir cumpliendo mis sueños.

El presente trabajo no hubiera sido posible sin las enseñanzas y dedicación de mi director de tesis, el Dr. Pablo Muriel de la Torre, quien me dio la oportunidad de pertenecer a este extraordinario proyecto de investigación.

Quisiera agradecer al Dr. Javier Camacho, Dr. Víctor Tsutsumi, Dr. Sergio Montes y a la Dra. Araceli Diaz, por abrirme las puertas de sus laboratorios para llevar a cabo parte de la experimentación de este proyecto y por sus sabias recomendaciones.

A mi comité tutorial, el Dr. Javier Camacho Arroyo, la Dra. Liliana Favari Perozzi, el Dr. Víctor Tsutsumi, el Dr. José Segovia Vila, la Dra. Aracely E. Chávez Piña y la Dra. Karina Reyes Gordillo por sus acertados comentarios durante el desarrollo de esta investigación.

A Eunice Vera Aguilar, Silvia Galindo Gómez, Karla Montserrat Gil Becerril, Paula Vergara, Zubillaga, Alejandra Ortíz Hernández, María Teresa García Camacho y Alma Gabriela García Díaz por su experiencia puesta para la ejecución de la experimentación.

A la Unidad de Producción y Experimentación Animal (UPEAL)-Cinvestav a cargo del Dr. Jorge Fernández-Hernández, a Rafael Leyva, Benjamín E. Chávez y Ricardo Gaxiola, por su excelente asistencia técnica en el cuidado de los animales de experimentación.

Al personal de la Biblioteca Central del Cinvestav, al Lic. Alberto F. Zurita, a Montserrat Yebra Lázaro y a Raúl Cuevas Córdova por todas las facilidades prestadas en la realización de los avances durante este doctorado.

A la generación 2015-2017 de la maestría en Ciencias en Farmacología.

A Rosa Elena Flores Beltrán, Laura D. Buendia Montaño, Benjamín Salinas Hernández y Ramón Hernández Guadarrama por todas las facilidades brindadas para la realización de los experimentos y por el agradable ambiente de trabajo.

A Arturo, María, Alejandro, Iván, Mirela, Mario, Fernanda, Andrea, Mauro, Mariliz y Emiliano por estar siempre a mi lado y su apoyo incondicional.

A mis queridas amigas "las nutrias" por su ánimo siempre oportuno.

A mi querido laboratorio 15 (y a todos sus integrantes) por fungir como mi segunda casa, por siempre agradecida.

I. ÍNDICE

II.	ÍNDICE DE FIGURAS	7
III.	ÍNDICE DE TABLAS	9
IV.	ÍNDICE DE ABREVIATURAS	10
1.	RESUMEN	12
2. I	INTRODUCCIÓN	14
2	.1. El hígado.	14
	2.1.1. La historia de la hepatología.	14
	2.1.2. La anatomía y la fisiología del hígado.	14
	2.1.3. El daño al hígado	17
	2.1.3.1. Los modelos experimentales de daño hepático	17
	2.1.3.2. Los mecanismos moleculares involucrados en el daño hepático	19
	2.1.4. La epidemiología de las enfermedades hepáticas	
2	2.2. Stevia rebaudiana Bertoni.	
	2.2.1. El efecto antioxidante de la stevia	
	2.2.2. El efecto antiinflamatorio de la stevia.	
	2.2.3. El efecto antifibrótico de la stevia	
2.	JUSTIFICACIÓN	27
3.	HIPÓTESIS	
4.	OBJETIVOS	
4	.1. Objetivo general.	
4	.2. Objetivos particulares.	
5. N	MATERIALES Y MÉTODOS	
5	5.1. Características de la <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni variedad Morita II.	
5	5.2. Material biológico	
5	3.3. Diseño experimental.	
5	.4. Determinaciones de laboratorio.	
	5.4.1. Determinación de la actividad de las enzimas hepáticas	
	5.4.2. Determinación de la concentración de las bilirrubinas	
	5.4.3. Determinación del contenido de glucógeno.	
	5.4.4. Determinación del grado de peroxidación lipídica	
	5.4.5. Determinación de la concentración de glutatión.	
	5.4.6. Determinación del contenido de colágena	

	5.4.7. Técnicas de histología
	5.4.7.1. Ensayos de inmunohistoquímica
	5.4.8. Determinación de las proteínas específicas mediante la técnica de western blot
	5.4.9. Determinación de la actividad de las metaloproteasas mediante la técnica de la zimografía.
	5.4.10. Determinación de la expresión génica mediante la reacción cuantitativa de la retro transcripción (qRT-PCR)
5	5.5. Análisis estadístico
6.	RESULTADOS41
(5.1. La stevia previene el daño hepático agudo
(5.2. La stevia previene la lesión hepática crónica inducida por el CCl4.
	6.2.1. La stevia preserva el equilibrio redox en la lesión hepática crónica inducida con el CCl ₄ .
	6.2.2. La stevia previene la necrosis y la inflamación al bloquear al factor NF-κB y las citoquinas proinflamatorias producidas por el CCl ₄
	6.2.3. La stevia previene la fibrosis inducida por la administración crónica del CCl ₄ 52
	6.2.3.1. La stevia previene la fibrosis al bloquear la activación del TGF- β y de las CEH 54
	6.2.3.2. La stevia previene la fibrosis al regular negativamente al PDGF, al CTGF, a las MMP2 y 13, y regulando positivamente a la Smad7
	6.2.3.3. La stevia previene la fibrosis mediante el bloqueo de la vía no canónica del TGF-β y regula negativamente a la pSmad3L, la pERK y la pJNK
(5.3. La stevia previene el daño hepático inducido por la TAA60
	6.3.1. La stevia previene el daño hepático inducido por la TAA por los mecanismos antioxidantes
	6.3.2. La stevia bloquea la inflamación del hígado al regular negativamente al NF-κB y, por lo tanto, inhibe la cascada proinflamatoria
	6.3.3. La stevia previene la fibrosis hepática producida por la administración crónica de la TAA mediante la modulación de la IL-17A
	6.3.4. La stevia regula negativamente los factores profibrogénicos TGF-β1, CTGF y PDGF, aumenta la proteína Smad7 y previene la activación de las CEH
	6.3.5. La stevia regula negativamente a las MMP y TIMP-172
	6.3.6. La stevia bloquea la activación de las proteínas pERK, pJNK y pp38 y, por lo tanto, la fosforilación de la pSmad3L74
7.	DISCUSIÓN76
	7.1. La stevia previene la lesión hepática experimental crónica al preservar el sistema antioxidante endógeno de la célula: Nrf278
,	7.2. La stevia previene la lesión hepática experimental al bloquear la cascada
1	oroinflamatoria regulada por el NF-κB

7 d	.3. La stevia previene la fibrosis hepática al limitar la activación, proliferación y migración e las CEH
	7.3.1. La stevia inhibe la activación y la proliferación de las CEH bloqueando directamente al TGF-β y/o a sus vías efectoras el CTGF y el PDGF
	7.3.2. La stevia previene la activación de las CEH al preservar en valores control a las MMP.
	7.3.3. La stevia regula al alza a la Smad7, la principal proteína inhibidora de la fibrogénesis, y consecuentemente reduce la deposición de la MEC
	7.3.4. La stevia previene la fibrosis hepática al regular negativamente la ruta no canónica del TGF-β1
8.	CONCLUSIÓN
9.	PERSPECTIVAS
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS90

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación histórica del hígado14
Figura 2. Principales estructuras y células del hígado15
Figura 3. Biotransformación de los xenobióticos por el hígado18
Figura 4. Los mecanismos moleculares del daño hepático
Figura 5. Proyección mundial de la mortalidad relacionada con las hepatopatías al 2030, etiología de las hepatopatías
Figura 6. Los efectos benéficos de la stevia en el hígado25
Figura 7. La stevia previene la lesión hepática aguda
Figura 8. La stevia previene la inflamación del hígado, la necrosis y la colestasis, en el daño crónico por el CCl ₄
Figura 9. La stevia previene el daño oxidante producido por el tratamiento crónico con el CCl _{4.} 47
Figura 10. La stevia previene la activación del factor proinflamatorio NF-κB (p65) en el daño hepático crónico
Figura 11. La stevia previene la expresión de citoquinas proinflamatorias en el daño hepático crónico
Figura 12. La stevia previene la fibrosis en el daño hepático crónico
Figura 13. La stevia previene el aumento del TGF-β y la activación de CEH en el daño hepático crónico
Figura 14. La stevia previene el aumento del PDGF, CTGF, Smad7 y MMP2 en el daño hepático crónico. 57
Figura 15. La stevia evita la fosforilación de la Smad3 en la región 'linker' al inhibir la activación de ERK y JNK
Figura 16. Efecto de la stevia sobre la arquitectura hepática macroscópica y microscópica en ratas tratadas con la TAA, y los marcadores generales de daño hepático

Figura 17. La stevia previene el estrés oxidante en el daño hepático crónico al preservar los niveles del Nrf2
Figura 18. La stevia previene la activación del factor NF-κB (p65) y la producción de citoquinas proinflamatorias en la cirrosis inducida por la TAA
Figura 19. La stevia previene la deposición de la MEC en ratas crónicamente tratadas con la TAA
Figura 20. La stevia evita la sobreexpresión del TGF-β y la activación de las CEH en la cirrosis inducida por la TAA71
Figura 21. La stevia modula la expresión y la actividad de las MMP en los hígados tratados con la TAA
Figura 22. La stevia evita la fosforilación de la proteína Smad3 en la región 'linker' al inhibit la activación de las proteínas JNK, p38 y ERK
Figura 23. Representación esquemática del efecto de la stevia a múltiples niveles celulares sobre la lesión hepática experimental

III. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales componentes de la Stevia Rebaudiana variedad Morita II	30		
Tabla 2. Diseño experimental del modelo de daño hepático agudo con el CCl4	32		
Tabla 3. Diseño experimental del modelo de daño hepático crónico con el CCl4	32		
Tabla 4. Diseño experimental del modelo de daño hepático crónico con la TAA	33		
Tabla 5. Los anticuerpos utilizados en las técnicas de western blot e inmunohistoquímica	37		
Tabla 6. Las sondas usadas en la técnica de qRT-PCR	39		
Tabla 7. Efecto de la stevia en el peso hepático, el peso corporal y la relación del peso del			
hígado y el peso corporal en el modelo de daño hepático crónico con el CCl4	43		
Tabla 8. Efecto de la stevia en el peso hepático, el peso corporal y la relación del peso	del		
hígado y el peso corporal en el modelo de daño hepático crónico con la TAA.	60		

IV. ÍNDICE DE ABREVIATURAS

4-HNE: 4-hidroxi-2.3-nonenal ALT: alanino aminotransferasa ANOVA: análisis de la varianza α-SMA: alfa-actina de músculo liso ARE: elemento de la respuesta antioxidante CCl₄: tetracloruro de carbono CEH: células estelares hepáticas CK: células de Kupffer Col-1: colágena tipo 1 CTGF: factor de crecimiento de tejido conectivo DO: densitometría óptica MEC: matriz extracelular ERK: quinasa regulada por la señal extracelular γ-GTP: gamma-glutamil transpeptidasa GPx: glutatión peroxidasa GSH: glutatión reducido GSSG: glutatión oxidado H&E: hematoxilina y eosina HP: hidroxiprolina IL: interleucina IP: vía intraperitoneal JNK: quinasas c-Jun N-terminal LPO: peroxidación de los lípidos MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos MDA: malondialdehído MMP: metaloproteasas NAFLD: hígado graso no alcohólico NASH: esteatohepatitis no alcohólica NF-κB: factor nuclear kappa B; p65 Nrf2: factor nuclear de transcripción (eritroide-2)-relacionado al factor 2 OMS: Organización Mundial de la Salud PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas PO: vía oral qRT-PCR: reacción cuantitativa de la transcripción reversa ROS: especies reactivas de oxígeno RBD: rebaudiósido SEM: error estándar de la media STV: esteviósido TAA: tioacetamida TGF-β: factor de crecimiento transformante beta TIMP: inhibidor de las metaloproteasas TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa

1. RESUMEN

Las hojas de la Stevia rebaudiana Bertoni morita II (stevia) han demostrado diversas propiedades farmacológicas que indican que esta planta puede ser beneficiosa para el tratamiento de la cirrosis hepática. En el presente estudio, se evaluó la capacidad antioxidante, antiinflamatoria y antifibrótica de las hojas de stevia para prevenir la cirrosis experimental en ratas y explorar el mecanismo de acción involucrado. La cirrosis se estableció mediante la administración de tetracloruro de carbono (CCl₄) o tioacetamida (TAA) (400 ó 200 mg/kg, IP tres veces por semana, doce o diez semanas, respectivamente); Se administró la stevia en polvo (100 mg/kg, PO diariamente) durante el tratamiento hepatotóxico. Se realizaron determinaciones de algunos de los marcadores séricos de daño hepático, como la peroxidación lipídica (LPO), glutatión reducido (GSH), contenido de colágena y análisis histopatológico. Se analizaron las vías antioxidante, inflamatoria y profibrótica mediante western blot, qRT-PCR y por inmunohistoquímica. El CCl₄ o la TAA aumentaron la producción de colágena e indujeron al factor de crecimiento transformante (TGF- β 1), factor nuclear kappa B (NF- κ B) y a las citoquinas proinflamatorias, se aumentó la producción de LPO y 4-hidroxi-2,3-nonenal, mientras que el GSH y el factor del eritroide 2 relacionado con el factor 2 (Nrf2) se redujeron. Los animales cirróticos mostraron un aumento del estrés oxidante, necrosis, colestasis y fibrosis. Nuestros resultados demostraron, por primera vez, que la stevia regula positivamente al Nrf2, contrarrestando así el estrés oxidante, y evita la necrosis y la colestasis al modular las principales citoquinas proinflamatorias mediante la inhibición del NF-κB. Además, la stevia reguló a la baja a varias vías profibrogénicas, incluida la inactivación de las CEH y la expresión de las metaloproteasas, bloqueando la liberación de TGF- β de la matriz extracelular. En particular, la stevia redujo la fosforilación de pSmad3L mediante la inhibición de la activación de las MAP cinasas. La Smad7, una molécula antifibrótica importante, se reguló positivamente mediante el tratamiento con la stevia en ratas cirróticas. La stevia posee propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antifibróticas, probablemente por su capacidad de inducir al Nrf2, reducir al NF- κ B y bloquear varias vías profibrogénicas, inhibiendo la activación de las CEH. Debido a que la stevia posee un perfil de seguridad razonable, nuestros resultados indican que debieran realizarse estudios en pacientes con el fin de averiguar su utilidad real en el tratamiento de la cirrosis en el humano.

1.1. ABSTRACT

Stevia rebaudiana has shown several pharmacological properties that indicate that this plant may be beneficial to treat liver cirrhosis. However, the effect of stevia on liver cirrhosis has not been previously investigated. In the present study, the antioxidant, anti-inflammatory, and antifibrotic abilities of stevia leaves were studied to prevent experimental cirrhosis in the rat and to explore the action mechanism involved. Cirrhosis was established by carbon tetrachloride (CCl₄) or thioacetamide (TAA) administration (400 or 200 mg/kg, IP three times a week, twelve or ten weeks, respectively); stevia powder was administered (100 mg/kg, by gavage, daily) during the hepatotoxic treatment. Serum markers of liver damage, lipid peroxidation (LPO), reduced glutathione (GSH), hydroxyproline and histopathological analysis were performed. Antioxidant, inflammatory and profibrotic pathways were analyzed by western blot, qRT-PCR, and by immunohistochemistry. CCl₄ or TAA increased collagen, hepatic stellate cells (HSC) activation and induction of profibrogenic mediators involved in the canonical and non-canonical transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) pathways, factor nuclear kappa B (NF-kB) and proinflammatory cytokines production, LPO, and 4hidroxi-2,3-nonenal (4-HNE), while GSH and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) were decreased. Cirrhotic animals showed increased oxidative stress, necrosis, cholestasis, and fibrosis. Our results demonstrated, for the first time, that stevia upregulated Nrf2, thereby counteracting oxidative stress, and prevented necrosis and cholestasis by modulating the main proinflammatory cytokines through inhibition of NF-kB. It is worth noting that stevia downregulated several profibrogenic pathways, including inactivation of HSC and decreased metalloproteinase (MMP)-2 and MMP13 expression, thereby blocking the liberation of TGF- β from the extracellular matrix. Notably, stevia reduced the phosphorylation of pSmad3L, the most profibrogenic and mitogenic Smad, by inhibiting the activation of c-Jun-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase. Interestingly, Smad7, an important antifibrotic molecule, was upregulated by stevia treatment in cirrhotic rats. Stevia possesses antioxidant, anti-inflammatory and antifibrotic properties, probably by its capacity to induce Nrf2, to reduce NF- κ B, and to block several profibrogenic pathways, inhibiting activation of HSC. These multitarget mechanisms led to the prevention of experimental cirrhosis. Because of stevia possesses a reasonable safety profile, our results indicate that it may be useful in the clinical setting to treat chronic liver diseases.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. El hígado.

2.1.1. La historia de la hepatología.

Desde tiempos ancestrales el hígado era conocido como el órgano más poderoso y rico en sangre del cuerpo. Diversos procesos se le atribuyeron a este impresionante órgano, incluso fue considerado como el "asiento de la vida". La palabra indogermánica "lîp" significa tanto hígado como vida. También existen similitudes entre las palabras en inglés "liver" "en vivo" y "vida" (inglés antiguo: "lifer-l If") y el alemán "leber-leben". El hebreo "kábe (r), kábe (d)" (o "cheber") es la raíz probable de la palabra griega "hepar". El anatomista británico Francis Glisson publicó la primera monografía exhaustiva sobre el hígado en 1654; su trabajo sirvió de referencia durante muchos años. La estructura interna del hígado se describió a detalle en "Anatomia hepatis" (Figura 1).



Figura 1. Representación histórica del hígado. Superficie visceral del hígado, los múltiples lóbulos (A), la vesícula biliar (B), la vena porta (D) y el conducto biliar, el sistema biliar (C, E y G) ("Anatomia Mundini", 1316) (Mondino de Luzzi, Bologna). Tomado de Muriel, 2017

2.1.2. La anatomía y la fisiología del hígado.

El hígado es un órgano triangular que se extiende a través de la cavidad abdominal debajo del diafragma. Este órgano está hecho de tejidos muy suaves y de color marrón rosado, envuelto por una cápsula de tejido conectivo, llamada cápsula de Glisson; es la glándula más

grande del cuerpo y representa aproximadamente el 2.5% del peso corporal en el ser humano (alrededor de 1500 g en el adulto). El hígado está dividido en cuatro lóbulos, los lóbulos derecho e izquierdo son divididos por el ligamento falciforme ¹. El hígado es irrigado por la arteria hepática y la vena porta, contribuyendo al flujo sanguíneo en un 25 y 75 %, respectivamente ², recibe las moléculas de importancia biológica de la vena porta y recibe oxígeno de la arteria hepática ¹. Este órgano tiene una compleja arquitectura, estructuralmente está conformado por un 70 a 80% de células parenquimatosas, los hepatocitos; y por un 20 a 30% de las células no parenquimatosas ³ (Figura 2).



Figura 2. Las principales estructuras y células del hígado. El hígado está conformado por diversos tipos celulares como los hepatocitos, las células estelares y representando el sistema inmunológico, las células de Kupffer. La principal estructura del hígado es el acino hepático, el cual es un rombo, en donde dos vértices tienen una triada porta conformada por: la vena porta, la arteria hepática y el conductillo biliar, y sus otros dos vértices están conformados por las venas centrales. Modificado de Bataller y Brenner, 2005⁴.

Los hepatocitos son células epiteliales altamente especializadas que realizan múltiples funciones, como son el metabolismo de los carbohidratos, aminoácidos y lípidos, la desintoxicación de amoníaco, la formación de la bilis y el colesterol, el almacenamiento de vitaminas, los minerales y el glucógeno; y la producción de proteínas séricas, como la

albúmina³. Los cordones de hepatocitos forman hexágonos que se encuentran delimitados por células endoteliales separándolos del espacio de Disse (Figura 2). Estos hexágonos son el centro funcional más pequeño del hígado, llamado acino hepático. El acino abarca el área entre dos lobulillos adyacentes, formando un rombo entre dos triadas portales y dos venas centrales (acino de Rappaport) (Figura 2). Los cambios en la composición del plasma y la oxigenación en los acinos tienen una gran influencia en el metabolismo y la expresión génica ⁵. Por otra parte, los lobulillos del hígado son, histológicamente, la unidad mínima estructural del hígado². Una de las primeras ilustraciones del lóbulo hepático fue hecha por el anatomista Francis Kiernan en 1833¹. El lobulillo tiene una forma hexagonal, con un diámetro aproximado de 1 mm, el cual consiste en hepatocitos radiados por una vena central en medio del hexágono. El hígado humano contiene cerca de un millón de lobulillos. En cada vértice del lobulillo hexagonal se encuentra una tríada portal, la cual comprende generalmente una arteria, una vena y un conducto biliar unido por tejido conectivo (Figura 2). Las células no parenquimatosas son representadas por las células del epitelio biliar, las células estelares hepáticas (CEH), las células endoteliales y las células de Kupffer (CK), los macrófagos del hígado¹.

Las CK son los macrófagos residentes del hígado y representan el 15% de la población celular de este órgano. Además, conforman del 80 al 90% de todos los macrófagos tisulares en el cuerpo ⁶. La función principal de las CK en el hígado sano es fagocitar bacterias, microorganismos y agentes tóxicos, que son transportados por la circulación hepática. Las CK son consideradas como la primera línea de defensa del organismo, pueden migrar entre los vasos (sinusoides) y el espacio intersticial (espacio de Disse). Las CK juegan un papel clave en la respuesta inmune innata y la defensa del huésped a través de la expresión y secreción de mediadores inflamatorios como son el factor nuclear kappa B (NF- κ B; p65), el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α), la interleucina (IL)-1 beta (β), IL-6, IL-10 y la IL17A ^{1,6,7}.

El conocimiento de las CEH data de 1876, cuando el anatomista Karl Wilhelm von Kupffer las identificó por primera vez. Las CEH se localizan en el espacio sinusoidal, estratégicamente posicionadas para interactuar con los hepatocitos y las CK, situadas en el espacio de Disse. Las CEH representan el 5 al 8% de todas las células del hígado ⁸, y contienen el 80% de los retinoides del cuerpo ⁷. Las funciones de estas células aún son controversiales, pero se conoce que en condiciones basales participan activamente en la respuesta inmune y en la regulación del estrés oxidante ⁹. Otra de sus funciones de la CEH, en condiciones basales, es controlar la homeostasis tisular y mantener un equilibrio fisiológico entre la síntesis y la degradación de los componentes de la MEC por medio de la secreción de las metaloproteasas (MMP) y las inhibitorias de las MMP (TIMP) ^{9,10}, promoviendo así la regeneración o remodelación tisular; característica que en el hígado ha evolucionado de manera sobresaliente, basada principalmente en la proliferación de hepatocitos para mantener la función hepática ^{1,9}.

2.1.3. El daño al hígado.

Debido a la localización anatómica del hígado y al papel que juega en la desintoxicación de los xenobióticos, el hígado está bajo una confrontación continua de factores que inducen daño, siendo uno de los órganos más atacado por las especies reactivas de oxígeno (ROS)¹¹. La realización de sus funciones puede verse comprometida por un incremento en el índice de producción de las ROS, debido al propio metabolismo aeróbico o por fármacos, virus y/o xenobióticos o el consumo elevado de alcohol y de grasas saturadas ¹². Los principales efectos deletéreos en el hígado pueden ser clasificados en estrés oxidante, necrosis y posteriormente fibrosis.

2.1.3.1. Los modelos experimentales de daño hepático.

El uso de animales de laboratorio, como la rata, es imperativo para mostrar que un agente tiene un efecto adverso en el hígado en un contexto de importancia fisiológica. El tetracloruro de carbono (CCl₄) es uno de los tóxicos más utilizados para inducir daño hepático experimental en muchas especies, incluidos los primates no humanos. El efecto tóxico del CCl₄ depende de sus metabolitos degradados, como son el radical triclorometilo (CCl₃•) y el radical triclorometil peroxilo (CCl₃OO•), formados por la enzima microsomal hepática citocromo P450 2E1 (CYP2E1). Los metabolitos del CCl₄ son moléculas inestables que exhiben una fuerte afinidad para unirse a las proteínas y a los lípidos de la membrana celular o abstraen los átomos de hidrógeno de un lípido insaturado, desencadenando la peroxidación lipídica (LPO), generalmente de los ácidos grasos ω -3 y ω -6 de la membrana plasmática, y causan daño hepático. La toxicidad inducida por el CCl₄ depende de la dosis y de la duración de la exposición. En dosis bajas del CCl₄, prevalecen los efectos transitorios, como la LPO y

la necrosis, a mayores dosis o en una exposición más prolongada son más serios los efectos, causando fibrosis, cirrosis o incluso cáncer. Además, en la intoxicación aguda con el CCl₄ en dosis altas, cuando la necrosis hepatocelular excede a la capacidad regenerativa del hígado, se puede producir una insuficiencia hepática fatal. El radical CCl3• reacciona con varias moléculas biológicas importantes como son los ácidos grasos, ácidos nucleicos y aminoácidos. El radical CCl3•, en presencia de oxígeno, se transforma en el radical CCl3OO•. Este radical es más reactivo, la vida media del radical CCl3OO• está en el intervalo de los milisegundos y al reaccionar con los sustratos adecuados como los ácidos grasos poliinsaturados conduce a la LPO, comprometiendo la integridad de las membranas y de las moléculas biológicas importantes ¹³. Cuando el CCl4 se administra en dosis bajas por un período largo puede producir un tipo de cirrosis que comparte varias características con la enfermedad hepática humana. En 1926, los médicos Lamson y Wing informaron por primera vez que la intoxicación por el CCl₄ producía cirrosis. Hoy en día, la cirrosis inducida con el CCl₄ es probablemente el modelo más utilizado para reproducir la cirrosis en ratas y ratones ¹³ (Figura 3).



Figura 3. La biotransformación de los xenobióticos por el hígado. Modificado de Muriel et al., 2017¹³. El tetracloruro de carbono (CCl₄) y la tioacetamida (TAA) son moléculas que pueden ser biotransformadas por el citocromo P450 produciendo radicales libres (•R) que generan daños en las proteínas, los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAS) y al ácido desoxirribonucleico (ADN) que pueden llegar a desencadenar fibrosis, cirrosis o hasta cáncer.

Por otra parte, existen otras moléculas hepatotóxicas como es la tioacetamida (TAA), la cual es metabolizada en el CYP2E1, y forma un intermediario metabólico llamado TAA-S-óxido ¹³, posteriormente este radical es bioactivado a TAA-S-S-dióxido ¹⁴, estos radicales se unen covalentemente a las macromoléculas y conducen a la necrosis de los hepatocitos. La administración crónica de dosis bajas de la TAA induce la formación de fibrosis periportal y a largo plazo, cirrosis. El daño hepático producido con esta toxina es más prominente que cuando se utiliza el CCl₄, y la fibrosis persiste durante varias semanas aun después de la interrupción de la administración de la TAA, lo que hace que este modelo sea adecuado para estudiar la capacidad de algún compuesto para revertir la fibrosis. La TAA es una hepatotoxina útil para inducir fibrosis, cirrosis y cáncer hepatocelular en un período relativamente corto de tiempo¹⁵. En la investigación básica los agentes tóxicos CCl₄ y TAA también son empleados para la inducción experimental de hepatocarcinoma al igual que la dietilnitrosamina (DEN). Los intermedios bioactivos de DEN son hidroxilados por el CYP2E1 en las células del hígado. Los metabolitos reaccionan posteriormente con los ácidos nucleicos, formando productos de alquilación. El daño crónico al parénquima se desarrolla progresivamente en dosis bajas de DEN. Estos modelos experimentales de cáncer hepático lograr inducir zonas tumorales en periodos relativamente cortos (menos de un año) en ratón, rata, conejo y otros animales, incluso meses después de retirar las toxinas ¹³.

2.1.3.2. Los mecanismos moleculares involucrados en el daño hepático.

Los efectos oxidantes del CCl₄ y la TAA pueden explicarse por la capacidad que tienen estos xenobióticos para bio-transformarse en especies reactivas desregulando al Nrf2, las enzimas antioxidantes y el GSH. Ambas moléculas, tanto el CCl₄ como la TAA, ejercen su efecto hepatotóxico a través de una vía mediada por las ROS ¹³ y causan LPO por la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular y conducen a la formación de aldehídos citotóxicos como el 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), por lo que este aldehído es un biomarcador útil para determinar LPO y daño oxidante a las proteínas ¹⁶. Las CK y las CEH son potencialmente sensibles al estrés oxidante ¹¹. El estrés oxidante puede ser abatido en las células animales mediante la acción del glutatión reducido (GSH), tripéptido que se encuentra en el citoplasma, el cual se oxida de manera no enzimática ante la presencia de las ROS o por medio de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) para formar glutatión oxidado (GSSG) y agua. La relación GSH/GSSG es la principal pareja redox que determina la capacidad

antioxidante de las células ^{17,18,19}. En el citoplasma también se encuentra el factor nuclear (eritroide 2)–relacionado al factor 2 (Nrf2), el cual es un modulador directo del balance de óxido-reducción, y regula la expresión de varias proteínas antioxidantes como son la enzima GPx, además regula la síntesis de *novo* de GSH, así como también promueve la reducción del GSSG ^{19,17}. El daño hepático causado por el estrés oxidante puede detonar una repuesta inflamatoria, dirigida principalmente por la activación de las CK, mediada por el NF- κ B y TNF- α , que conducen a la expresión de citoquinas proinflamatorias como son las IL-1 β , IL-6, IL-10, IL17A (Figura 4) ^{20,21}.



Figura 4. Los mecanismos moleculares del daño hepático. Representación esquemática de los múltiples efectos deletéreos del tetracloruro de carbono (CCl₄) y la tioacetamida (TAA) en la lesión hepática experimental. El daño hepático exhibe un amplio espectro de actividades que se pueden resumir en tres categorías principales: los efectos oxidantes, los inflamatorios y los fibróticos. Los efectos oxidantes pueden explicarse por la alta producción de radicales libres, impidiendo la modulación de 1) el factor nuclear (eritroide-2) relacionado con el factor 2 (Nrf2), 2) la enzima antioxidante glutatión peroxidasa (GPx) y 3) el glutatión reducido (GSH). El daño hepático promueve una cascada de señalización proinflamatoria asociada con su capacidad para elevar al factor nuclear kappa B (NF- κ B) y, por lo tanto, a las citoquinas proinflamatorias. El CCl₄ y la TAA poseen diversos mecanismos fibróticos que implican la regulación al alza de la vía canónica del factor de crecimiento tisular beta $(TGF-\beta)$ y elevan significativamente la ruta no canónica del TGF- β promoviendo la fosforilación de las proteínas MAPK y la activación de las células estelares hepáticas (CEH) exacerbando la producción de matriz extracelular (MEC); además, promueven la fibrosis regulando negativamente a la proteína inhibidora Smad7. En conjunto, estos efectos conducen a la fibrosis experimental.

El daño hepático crónico con frecuencia conduce a la fibrosis, que es una respuesta de cicatrización reversible. La fibrogénesis es una respuesta orquestada por las CEH, constituyendo una de las principales células efectoras que contribuyen a la producción de matriz extracelular (MEC)^{1,22}. La cirrosis fue descrita en 1977, por la Organización Mundial de la Salud (OMS), como "un proceso difuso caracterizado por fibrosis y transformación de la arquitectura normal del hígado a nódulos estructuralmente anormales ^{23,24}. En 1826, el médico René Laennec llamó por primera vez cirrosis a esta patología, por el aspecto café naranja que adquiere el hígado y que en griego se le denomina "kirrhos"²⁵. Las alteraciones morfológicas del hígado causadas por la cirrosis, fueron descritas en 1761 por el patólogo Gianbattista Morgagni²⁶. El desarrollo de la fibrosis puede dividirse en 4 etapas: 1) el daño; 2) la respuesta inflamatoria; 3) la activación y diferenciación de las CEH en células de músculo liso activas (tipo miofibroblastos) y la producción de colágena intersticial; 4) el remodelado del tejido y la resolución de la fibrosis². La cirrosis, la etapa final de la fibrosis, está fuertemente asociada con el estrés oxidante, la inflamación crónica y un incremento del TGF- β . Existen diversos mediadores durante el desarrollo de la fibrosis. La citoquina fibrogénica, el TGF-ß juega un papel importante en la activación fenotípica de las CEH a miofibroblastos, los cuales no solo incrementan la producción de la MEC en el hígado, sino también la muerte apoptótica de los hepatocitos, conduciendo a la progresión de la fibrosis hasta producir cirrosis. En el sinusoide hepático, la MEC llega a aumentar hasta seis veces más en las etapas avanzadas de la cirrosis²⁷. La excesiva deposición de la MEC (constituida principalmente por Col-1a) y la inhibición de la degradación, fragmenta la arquitectura hepática y produce la pérdida de la función del órgano²². La pérdida de la vitamina A y la aparición de los elementos contráctiles como la proteína alpha-actina de músculo liso (a-SMA) en el citoplasma representan la etapa de iniciación en la activación de las CEH ^{9,27}. Las CEH son activadas en presencia de proteínas inflamatorias como son el NF-KB, la IL-1β, el TNF-α o en presencia de cuerpos apoptóticos, resultando en una respuesta inflamatoria y fibrogénica exacerbada, provocando la expresión de la IL-17A, del factor tumoral de crecimiento (TGF)-β, de la colágena tipo 1 (Col-1) y de las MMP así como generan la proliferación y migración en las CEH⁷. La etapa de iniciación es fuertemente promovida por las CK²⁸. La perpetuación de las CEH, segunda etapa de la iniciación, también es orquestada

La señal autocrina de las CEH por medio de factores como el PDGF, junto con señales paracrinas de los hepatocitos por medio del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) y las CK, conspiran para que las CEH generen más MEC a través de una mayor proliferación, contractilidad, fibrogénesis y respuesta proinflamatoria vigorosa ³⁰.

El tejido hepático promueve su remodelación principalmente por medio de las MMP³¹. Las MMP son una familia de endopeptidasas extracelulares, que comprenden 25 tipos de enzimas, que están relacionadas con la proteólisis de la MEC. La biosíntesis de las MMP está controlada a diferentes niveles, por medio de la expresión génica, la activación del zimógeno y por las TIMP². Las MMP 2, 9 y 13 están relacionadas con la fibrosis hepática, las bajas concentraciones de colágena tipo IV provocan la activación de la MMP2, quien activa a la MMP13, la cual a su vez genera la activación de la MMP9. Las gelatinasas (MMP2 y 9) pueden liberar de la MEC citoquinas proinflamatorias como el TNF- α e IL-1 β ³², además del potente factor profibrogénico el TGF- β ². Este último factor activa proteínas como la Smad 3, mediante la fosforilación del carboxilo terminal de la Smad 3 en la vía canónica del TGF- β , las cuales interactúan con otras vías de señalización como el NF- κ B.

La Smad3 juega un papel central en la fisiopatología de la fibrosis, activando a las TIMP vía el factor TGF- β , lo que genera una inhibición en la degradación de la MEC ³³. Asimismo, existen vías con mayor potencial fibrogénico, como es la fosforilación de la Smad3 en la región 'linker' por parte de las proteínas quinasas activadas por los mitógenos (MAPK) integrada por la quinasa regulada por la señal extracelular (ERK), la quinasa c-Jun N-terminal (JNK) y el p38 ^{34–37}. Sin embargo, todos esos efectos profibróticos pueden ser prevenidos por la proteína Smad7, la cual regula a la baja las vías de señalización profibrogénica (TGF- β) e inflamatoria (NF- κ B). Asimismo, la proteína Smad7 limita la activación de las CEH, protegiendo al hígado de la fibrosis ^{22,38} (Figura 4).

2.1.4. La epidemiología de las enfermedades hepáticas.

La incidencia y prevalencia de dos condiciones, la cirrosis y el cáncer de hígado, son clave para entender la carga de la enfermedad hepática. Éstas representan la etapa final de la patología hepática y, por lo tanto, son indicativos asociados a la mortalidad. De acuerdo con la OMS, en 2015, la cirrosis hepática fue la decimoséptima causa de muerte en el mundo. Las proyecciones de la OMS al 2030 (2015) señalan que la cirrosis y el cáncer hepático claramente continuarán aumentando como causas de muerte ¹. La etiología más prevalente en la hepatopatía es la enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD)¹. Actualmente se estima que el 25% de la población adulta en el mundo tiene NAFLD, que a pesar de que esta enfermedad es reversible, un tercio de los pacientes con NAFLD llegan a desarrollar esteatohepatitis no alcohólica (NASH), la cual se caracteriza por fibrosis ³⁹ (Figura 5).



Figura 5. Proyección mundial de la mortalidad relacionada con las hepatopatías al 2030 (A) y etiología de las hepatopatías (B). De acuerdo a la OMS habrá un incremento constante en la mortalidad debido a la cirrosis y al cáncer hepatocelular. El 44% de las hepatopatías están relacionadas con el hígado graso no alcohólico (NAFLD) mientras que el 11% de las enfermedades hepáticas son debido al consumo elevado de alcohol, enfermedad hepática por alcohol (ALD). Tomado de Muriel, 2017¹.

En Estados Unidos, el NASH representa una de las principales causas de cirrosis, por lo tanto, una importante causa de trasplantes hepáticos ³⁹, por lo que este padecimiento está causando un incremento constante en la necesidad de reemplazar este órgano ⁴⁰. Los pacientes NAFLD generalmente presentan obesidad, resistencia a la insulina y / o diabetes tipo 2, dislipidemia, hipertrigliceridemia e hipertensión, por lo tanto, estos factores de riesgo hacen de estos pacientes candidatos idóneos para desarrollar enfermedades cardiovasculares ³⁹. El consumo de alcohol por persona en México no es particularmente alto, sin embargo, la carga de la cirrosis relacionada con el alcohol en México es muy superior a la de los países con alto consumo de alcohol ⁴¹ presentando la más alta tasa de mortalidad por cirrosis hepática en América Latina ⁴². La cirrosis hepática es la cuarta causa de muerte en nuestro país, siendo los hombres de entre 35 a 54 años de edad quienes mayor contribución tuvieron ¹. La cirrosis es un problema de salud importante en todo el mundo, debido a la falta de métodos de tratamiento efectivos ⁴³. Asimismo, los escasos tratamientos resultan costosos e inaccesibles en la mayoría de los países del mundo. Además, los tratamientos actuales mejoran mínimamente la supervivencia a largo plazo en los pacientes con cirrosis hepática ⁴⁴. A medida que la epidemia global de obesidad se incrementa la carga clínica y económica causadas por la cirrosis serán insostenibles ³⁹.

2.2. Stevia rebaudiana Bertoni.

El 80 % de la población mundial usa plantas medicinales para el cuidado de la salud. En los países desarrollados, la gente consume plantas debido a sus preocupaciones sobre los efectos secundarios de los fármacos. La Stevia rebaudiana es un pequeño arbusto perenne que pertenece a la familia Asterácea, es nativa de la región de Amambay en el noreste de Paraguay. En 1899, la Stevia rebaudiana Bertoni fue botánicamente caracterizada por el botánico Moisés Santiago Bertoni. Las hojas de la stevia tradicionalmente se usaban secas, como un edulcorante, medicinalmente o para masticar. La hoja de la stevia se considera la parte principal de la planta debido a sus compuestos bioactivos, ya que contiene más de 30 diferentes glicósidos de esteviol, como son rebaudiósido (RBD) (A, B, C, D, E, y F), esteviósido (STV), esteviolbiósido y dulcósido A; siendo el STV y el RBD A los que se encuentran en mayor proporción. Estos edulcorantes de la stevia son los únicos en tener un efecto de índice glucémico cero y cero calorías, y fueron reconocidos por la Food and Drug Administration (FDA) como "generalmente reconocido como seguro" (GRAS). No obstante, los problemas de seguridad deben ser considerados en la población especial como son los niños y las mujeres embarazadas. El STV está compuesto por tres moléculas de glucosa y una molécula de esteviol, su aglicona, mientras que RBD A tiene cuatro unidades de glucosa. El STV, el compuesto más abundante, posee un potencial edulcorante de 200 a 300 veces mayor que el de la sacarosa. Además, el STV es térmicamente una molécula estable hasta 100 °C. Por otro lado, el RBD A es menos abundante que el STV pero tiene un mayor potencial de endulzamiento; ya que es 400 veces más dulce que la sacarosa¹⁹.

2.2.1. El efecto antioxidante de la stevia.

La capacidad antioxidante de la stevia está relacionada con sus compuestos fenólicos y flavonoides, así como con sus glucósidos de diterpeno ¹⁹. Los compuestos fenólicos presentes en los extractos de la stevia son la quercetina y la catequina ^{45–47}. Diversas investigaciones han demostrado la capacidad antioxidante de la stevia de una manera dosis dependiente de la concentración, promoviendo la expresión de algunos genes de moléculas antioxidantes como son el GSH y la GPx, evitando así el daño oxidante a las proteínas, a las membranas celulares

y al ADN ^{48–51}. El STV podría estar implicado en la modulación del estrés oxidante, ya que en un estudio *in vitro* mostró regular a la baja al inhibidor del Nrf2, llamado Keap 1 ⁵². Sin embargo, existen muy pocos estudios de estos efectos antioxidantes de la stevia en modelos animales ¹⁸; menos aún son conocidos los mecanismos moleculares implicados en estos efectos (Figura 6).

2.2.2. El efecto antiinflamatorio de la stevia.

Los extractos de la stevia, tanto acuosos como etanólicos, han demostrado disminuir significativamente la producción de TNF- α , IL-6, e IL-1 en células estimuladas por LPS ¹⁹, así como suprimir la respuesta inflamatoria por la inhibición del factor IkB, proteína inhibitoria del NF- κ B ^{53,54}. Este efecto antiinflamatorio puede ser atribuido al STV, que inhibe la secreción de TNF- α , IL-6, IL-1 β mediante la regulación a la baja del NF- κ B en un modelo *in vitro* de una manera dependiente de la dosis ⁵⁵. Un efecto similar fue encontrado en un modelo de ratón, en donde tanto el STV como un extracto etanólico de la stevia suprimieron el estrés oxidante y la inflamación vía inhibición del NF- κ B ⁵⁶ (Figura 6).



Figura 6. Los efectos benéficos de la stevia en el hígado. Modificado de Ramos-Tovar y Muriel, 2017¹⁹. La stevia limita los proceso oxidantes, necróticos y colestáticos mediante la regulación de varios factores antioxidantes e inflamatorios.

2.2.3. El efecto antifibrótico de la stevia.

No existen estudios sobre el efecto antifibrótico de la stevia. Un estudio *in vivo* encontró que las hojas de la stevia limitaban las actividades de las enzimas hepáticas ALT y aspartato aminotransferasa (AST)^{49,57}. Das y Kathiriya (2012) utilizaron un extracto acuoso preparado con hojas de la stevia a una dosis de 400 mg / kg de peso de la rata durante 7 días. El daño hepático fue producido por la TAA en el 6to. día. Esta investigación demostró que el extracto acuoso de la stevia fue capaz de prevenir la necrosis (ALT, AST) y la colestasis (FA); y preservar los niveles de GSH y disminuir la LPO ^{18,58}. Sin embargo, los mecanismos moleculares involucrados en la hepatoprotección de la stevia no son elucidados.

2. JUSTIFICACIÓN

La morbimortalidad por la cirrosis y el cáncer hepáticos han tenido un incremento constante en muchas partes del mundo, incluida América Latina. De acuerdo con la OMS, en 2015, la cirrosis hepática fue la decimoséptima causa de muerte en el mundo. En México, la cirrosis hepática es la cuarta causa de fallecimiento, siendo los hombres de entre 35 a 54 años quienes mayor contribución tuvieron. La etiología más prevalente en la hepatopatía es el NASH^{1,39}. El consumo de alcohol por persona en México no es particularmente alto, sin embargo, la carga de la cirrosis relacionada con el alcohol en México es muy superior a la de los países con alto consumo de alcohol^{39,41}. Esto puede ser debido a la alta prevalencia en obesidad que puede estar contribuyendo en el desarrollo de las hepatopatías. Aunado a esto, no existe en la actualidad un tratamiento efectivo para prevenir o revertir la cirrosis hepática. Siendo las únicas alternativas para combatir la cirrosis hepática fármacos costosos con poca efectividad o la escasa posibilidad de trasplantes parciales o totales del órgano en etapas más avanzadas de esta enfermedad. Por lo tanto, el desarrollar nuevas herramientas terapéuticas que prevengan esta afección es de gran importancia, por lo que el objetivo de esta investigación fue conocer los efectos de la stevia como un posible protector de la fibrosis hepática en modelos animales que comparten características con la enfermedad en el humano. Con el fin de contribuir eventualmente a desarrollar un nuevo tratamiento para prevenir la fibrosis hepática y descubrir sus mecanismos de acción.

3. HIPÓTESIS

Debido a sus propiedades antioxidantes y antinflamatorias, la administración de la stevia prevendrá el establecimiento del daño hepático inducido por los agentes hepatotóxicos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general.

Evaluar la capacidad farmacológica de la stevia para prevenir el daño hepático experimental producido por la administración del CCl₄ o de la TAA.

4.2. Objetivos particulares.

a) Evaluar el potencial antioxidante y antiinflamatorio de la stevia en los modelos de daño hepático inducidos por la administración del CCl₄ o de la TAA.

b) Determinar la capacidad de la stevia para prevenir la fibrosis inducida por la administración del CCl₄ o de la TAA.

c) Analizar histológicamente el efecto benéfico de la stevia sobre el hígado al ser expuesto al CCl₄ o de la TAA.

d) Caracterizar los mecanismos de acción de la stevia en el daño hepático experimental.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Características de la Stevia rebaudiana Bertoni variedad Morita II.

En este estudio utilizamos la *Stevia* rebaudiana Bertoni variedad Morita II (stevia), la cual fue adquirida comercialmente en Mayan Sweet Stevia® (Yucatán, México). Este producto tiene una certificación del Departamento de Agricultura de EUA (USDA). El riego se realizó por goteo, el pH del agua fue de 7,5, el pH de la stevia fue de 7,0 y el suelo pedregoso tenía un pH de 7,5. La stevia se cultivó a una altitud de 550 m a 26 ° C y 60% de humedad. Los componentes presentes en esta variedad de la stevia han sido ampliamente descritos por varios investigadores (Tabla 1) ^{19,59–63}. Para fines de la administración, las hojas de la stevia se pulverizaron y tamizaron con una malla de 1 mm, y se almacenaron en una botella ámbar de vidrio para protegerlas de la luz solar hasta su uso.

COMPONENTES	CONTENIDO
Carbohidratos	67.32 %
Fibra cruda	9.52 %
Proteína	12.11 %
Grasas	3.23 %
Cenizas	7.82 %
Clorofila	7 mg/g
Carotenoides	4 mg/g
Flavonoides	36.7 mg equivalentes de quercetina/g
Contenido fenólico	28.4 mg equivalentes de ácido gálico /g
STV	15.5 g/100 g
RBD A	9.12 g/100 g

Tabla 1. Principales co	nponentes de la <i>Stevia Re</i>	<i>ebaudiana</i> variedad Morita II.
-------------------------	----------------------------------	--------------------------------------

Datos obtenidos de las siguientes referencias ^{19,59–63}.

a a la companya de la

5.2. Material biológico.

En este trabajo experimental se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar proporcionadas por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav). Las ratas fueron mantenidas bajo condiciones controladas (temperatura de 22 \pm 2 °C, humedad relativa del 50-60% y ciclos de luz-oscuridad de 12 h). Los animales tenían acceso a la dieta Labdiet (no. 5053, Indiana, EUA) y agua *ad libitum*. El aumento de peso corporal se evaluó una vez por semana. Una vez terminados los tratamientos, las ratas se eutanizaron bajo anestesia con ketamina y xilazina (a una dosis de 100 y 8 mg/kg de peso, respectivamente) y luego se sacrificaron. La sangre se recolectó por punción cardíaca y se centrifugó en tubos a 3000 rpm (12000 *g*). El hígado de cada rata se retiró rápidamente, se pesó y se almacenó a -75 °C. Todos los animales recibieron cuidados de acuerdo con el Comité de Ética del Cinvestav y a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), considerando las especificaciones técnicas de producción, cuidado y uso de animales de laboratorio que se encuentra en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NRC, 2011).

5.3. Diseño experimental.

En el diseño experimental se formaron dos esquemas experimentales: agudo y crónico. Para el modelo agudo se utilizaron ratas con un peso de 200 a 250 g, el tratamiento duró 7 días, como se muestra en el curso temporal.



Las ratas fueron divididas aleatoriamente en 4 grupos, como se muestra en la Tabla 2 con una n=8. La dosis del hepatotóxico fue de 4 g de CCl₄. La dosis de la stevia fue de 100 mg/kg de peso en 1 mL de carboximetilcelulosa (CMC) al 0.3 %, con sus respectivos controles.

Grupos	Periodo	Dosis	Vía
Control	7 días (d)	СМС	РО
CCl ₄	día 6	4 g /kg peso	РО
Stevia + CCl ₄	7 d día 6	stevia: 100 mg/kg peso CCl ₄ : 4 g/kg peso	РО
Stevia	7 d	100 mg/kg peso	PO

Tabla 2. Diseño experimental del modelo de daño hepático agudo con el CCl4.

Para el modelo crónico se utilizaron ratas con un peso inicial de 100 a 120 g, los animales fueron separados aleatoriamente en (n=8) grupos en los modelos del CCl₄ y la TAA (Tabla 3 y 4, respectivamente). La dosis para el CCl₄ fue de 400 mg/kg de peso, tres veces por semana durante 12 semanas y para la TAA 200 mg/kg de peso, tres veces por semana durante 10 semanas. La dosis diaria de la stevia fue de 100 mg/kg en 1 mL de CMC al 0.3 %.

Tabla 3. Diseño experimental del modelo de daño hepático crónico con el CCl₄.

Grupos	Periodo	Dosis	Vía
Control	12 semanas	СМС	РО
CCl ₄	12 semanas	400 mg/kg peso, 3 veces/semana	intraperitoneal (IP)
Stevia + CCl ₄	12 semanas	stevia: 100 mg/kg peso CCl ₄ : 400 mg/kg peso	PO IP
Stevia	12 semanas	100 mg/kg peso	PO

Grupos	Periodo	Dosis	Vía
Control	10 semanas	СМС	РО
ТАА	10 semanas	100 mg/kg peso, 3 veces/semana	IP
Stevia + TAA	10 semanas	stevia: 100 mg/kg peso TAA: 100 mg/kg peso	PO IP
Stevia	10 semanas	100 mg/kg peso	IP

Tabla 4. Diseño experimental del modelo de daño hepático crónico con la TAA.

5.4. Determinaciones de laboratorio.

Se cuantificaron los marcadores séricos de daño hepático: de las actividades de las enzimas fosfatasa alcalina (FA), alanino aminotransferasa (ALT) y gamma-glutamil transpeptidasa (γ -GTP), de la bilirrubina, glucógeno, LPO, GSH, GSSG y colágena mediante espectrofotometría. Se efectuaron tinciones (hematoxilina y eosina, y tricrómica de Masson) en el parénquima hepático. Se realizó la inmunohistoquímica (IHC) en el tejido hepático de las proteínas: NF- κ B, TGF- β 1 y α -SMA. Se cuantificaron en el hígado las siguientes proteínas por medio de la técnica de western blot: 4-HNE, Nrf2, TNF- α , IL-1 β , p65, IL-6, IL-10, IL-17A, TGF- β 1, α -SMA, PDGF, CTGF, Col-1 α , MMP13, TIMP-1, Smad7, Smad3, pSmad3L, JNK, pJNK, ERK, pERK, p38 y pp38, y como control de carga se utilizó la proteína β -actina. Por técnicas zimográficas se determinó la actividad de las enzimas MMP9 y 2. Se midió la expresión génica del ARNm de la enzima GPx, TNF- α , IL-1 β y α -SMA por qRT-PCR y como control de expresión se utilizó el gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). A continuación, se describen las técnicas utilizadas.

5.4.1. Determinación de la actividad de las enzimas hepáticas.

La actividad de la enzima FA fue determinada por el método de Berger y Rudolph, (1963), la cual se basa en la hidrólisis, por acción de la enzima p-nitrofenilfosfato, dando como productos fosfato inorgánico y p-nitrofenol. Este último se cuantifica espectrofotométricamente a 410 nm ⁶⁴. La actividad de la enzima ALT fue determinada por el método de Reitman y Frankel (1957). El método se basa en la formación de piruvato y glutamato a partir de alanina y alfa-cetoglutarato. El piruvato obtenido reacciona a través de su grupo ceto con la 2,4- dinitrofenilhidrazina formando un complejo coloreado con absorbancia de 515 nm ⁶⁵. La actividad de la enzima γ -GTP fue determinada por el método de Glossmann y Neville (1972). Este método consiste en la conversión de γ -glutamil-p-nitroanilida a γ -glutamil-glicil-glicina con liberación de p-nitroanilina debido a la actividad de la enzima. La p-nitroanilina tiene una absorbancia máxima a 410 nm ⁶⁶.

5.4.2. Determinación de la concentración de las bilirrubinas.

Las bilirrubinas se determinaron usando un kit comercial marca Spinreact ® (catálogo número 1001044, Girona, España). La bilirrubina se convierte en azobilirrubina mediante el ácido sulfanílico diazotado midiéndose espectrofotométricamente. De las dos fracciones presentes en el suero, la bilirrubina ligada a ácido glucurónico y la bilirrubina libre ligada a la albúmina, sólo la primera reacciona en el medio acuoso (bilirrubina directa) precisando la segunda la solubilización con dimetilsulfóxido (DMSO) para que reaccione (bilirrubina indirecta). En la determinación de la bilirrubina indirecta se determina también la directa, correspondiendo el resultado a la bilirrubina total. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de bilirrubina en la muestra ⁶⁷.

5.4.3. Determinación del contenido de glucógeno.

La determinación del contenido de glucógeno hepático se realizó con la técnica de la antrona 68 . La técnica de la antrona es un método en donde a partir de una muestra de hígado se determina la cantidad de glucógeno. El glucógeno es hidrolizado por un ácido (H₂SO₄) hasta sus unidades elementales (monosacáridos), que pueden ser luego deshidratadas dando furfural. Éste último, reacciona con la antrona y se forma un producto coloreado (azulverdoso). Se leyó la muestra a una absorbancia de 620 nm y se expresaron los resultados como g de glucógeno por 100 g de hígado 68 .

5.4.4. Determinación del grado de peroxidación lipídica.

La técnica colorimétrica de la LPO se evaluó en homogeneizados de hígado mediante la medición de la formación del subproducto malondialdehído (MDA), utilizando el método del ácido tiobarbitúrico ⁶⁹. La absorbancia se relacionó con el contenido de proteína. La concentración de proteína se determinó de acuerdo con el método de Bradford utilizando la albúmina sérica bovina como estándar, e interpolando el valor de las muestras en la curva estándar ⁷⁰.

5.4.5. Determinación de la concentración de glutatión.

La técnica para determinar el GSH en el hígado se basa en la reacción entre el grupo sulfhidrilo de la cisteína que pertenece al glutatión y el ácido 5-5´-diotiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) del reactivo de Ellman. Tras la reacción se obtiene como producto el ácido 5-tio-2-dinitrobenzoico, compuesto coloreado que se lee en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 412 nm⁷¹. Los niveles de GSSG se cuantificaron según lo descrito por Hissin y Hilf⁷².

5.4.6. Determinación del contenido de colágena.

Para cuantificar la colágena hepática se determinó la hidroxiprolina (HP). La HP es el aminoácido más abundante en la colágena, constituye alrededor de un 10 a 12 % del total de los aminoácidos en la colágena. La cantidad de HP puede cuantificarse a partir del producto generado por la reacción entre el p-dimetilamino-benzaldehído (reactivo de Ehrlich) y el pirrol derivado de la oxidación de los residuos de HP. Los grupos pirrol son recuperados con tolueno y se hacen reaccionar a temperatura ambiente por 30 minutos con el reactivo de Ehrlich, para generar un producto de coloración amarillo – anaranjado, que es medible a una longitud de onda de 560 nm⁷³.

5.4.7. Técnicas de histología.

Las técnicas utilizadas fueron la tinción de H y E (hematoxilina y eosina), y la tricrómica de Masson. La tinción de H y E se basa en la reacción entre los ácidos nucleicos y el colorante alcalino hematoxilina, formando un complejo coloreado azul-púrpura; mientras que el colorante aniónico eosina interacciona con estructuras alcalinas, tiñendo en distintos grados de rosa el citoplasma y la matriz extracelular ⁷⁴. La tinción tricrómica de Masson permite evaluar los cambios en el grado de deposición de colágena y la evolución del proceso de cicatrización. La ventaja principal que ofrece la tinción tricrómica de Masson es que permite identificar estructuras celulares y moléculas clave en el proceso de cicatrización, pues mientras la queratina, hemoglobina y fibras musculares se tiñen de rojo, el núcleo lo hace de café obscuro a negro, el citoplasma y los adipocitos de rosa o rojo pálido y las fibras de colágena de azul ⁷⁵.

5.4.7.1. Ensayos de inmunohistoquímica.

La IHC se realizó utilizando un protocolo de inmunoperoxidasa. Las secciones se desparafinaron durante la noche a 58 °C. Las muestras se hidrataron usando xileno durante 5 minutos, 3 veces y 90% de alcohol durante 3 minutos, 4 veces. Posteriormente, las secciones se sumergieron en 1X PBS durante 5 minutos, 3 veces; y luego se sometieron a la autoclave con buffer de citrato 0.10 N a 121 °C durante 20 minutos. Las secciones fueron lavadas con 1X PBS durante 5 minutos, 4 veces. A continuación, la peroxidasa endógena se bloqueó con metanol-peroxidasa durante 60 minutos (46 mL de MeOH + 4 mL de H₂O₂) seguido de lavado con 1X PBS durante 5 minutos, 5 veces. Además, para bloquear las uniones no específicas, se añadió 5% de leche en 1X PBS durante 60 minutos. Los tejidos se enjuagaron en 1X PBS durante 5 minutos, 5 veces. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario diluído en suero bovino fetal al 3% durante la noche. Luego, se enjuagaron con 1X PBS durante 5 minutos, 5 veces. Los anticuerpos utilizados para IHC se dirigieron contra el NF- κ B; p65, el TGF- β 1 y la α -SMA que se describen en la Tabla 5.
PROTEÍNA	MARCA	CATÁLOGO				
4-HNA	Abcam® (Cambridge, GB)	AB46545				
α-SMA	Sigma-Aldrich® (Missouri, EUA)	A-5691				
β-actina	Ambion® (MA, EUA)	AM4302				
COL-1A	Sigma-Aldrich® (Missouri, EUA)	C-2456				
CTGF	Santa Cruz Biotechnology® (CA, EUA)	SC-365970				
ERK	Santa Cruz Biotechnology® (CA, EUA)	SC-292838				
IL-1β	Abcam® (Cambridge, GB)	AB18329				
IL-6	Invitrogen® (CA, EUA)	ARC0962				
IL-10	Invitrogen® (CA, EUA)	ARC 9102				
IL-17A	Cell Signaling Technology® (MA, EUA)	SC-374218				
JNK 1/2	Cell Signaling Technology® (MA, EUA)	9252S				
MMP13	Merck-Millipore® (MA, EUA)	MAB13426				
Nrf2	Abcam® (Cambridge, GB)	AB31163				
p38	Abcam® (Cambridge, GB)	AB31828				
p65	Merck-Millipore® (MA, EUA)	MAB3026				
PDGF	Abcam® (Cambridge, GB)	AB16829				
pERK	Santa Cruz Biotechnology® (CA, EUA)	SC-136521				
pJNK	Abcam® (Cambridge, GB)	AB131499				
pP38	Cell Signaling Technology® (MA, EUA)	9211S				
pSMAD3L	Abcam® (Cambridge, GB)	AB63403				
SMAD3	Cell Signaling Technology® (MA, EUA)	SC-101154				
SMAD7	Abcam® (Cambridge, GB)	AB90086				
TGF-β1	Merck-Millipore® (MA, EUA)	MAB1032				
TIMP-1	Abcam® (Cambridge, GB)	AB61224				
TNF-α	Ebioscience® (CA, EUA)	BMS175				

Tabla 5. Los anticuerpos utilizados en las técnicas de western blot e IHC.

5.4.8. Determinación de las proteínas específicas mediante la técnica de western blot.

Para el análisis de las proteínas por western blot, el tejido hepático se homogeneizó en tampón de lisis (1 mol/Tris-HCl pH 8,5 mol /NaCl, NP40, Tritón, 0.5 mol/EDTA pH 8, 0.1 mol/PMSF, 0.1 mol/L Na₃VO₄ y 0.1 mol/L Naif (Sigma-Aldrich®, Missouri, EUA), junto con los cócteles de los inhibidores de las proteasas y fosfatasas (Sigma-Aldrich®, Missouri, EUA), posteriormente el homogeneizado fue centrifugado a 12000 rpm (13200 g) durante 20 minutos a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se midió la concentración de las proteínas usando el método del ácido bicinconínico ⁷⁶ (Ensayo de las proteínas Pierce BCA, número de catálogo 23223, Thermo Fischer Scientific®, NY, EUA). Se prepararon geles de dodecilsulfato sódico con poliacrilamida al 12 % (SDS-PAGE) en gel electroforesis, en donde se inyectaron 40 µg de proteína por muestra (100 V, 3 h, temperatura ambiente), una vez corrida la muestra, las proteínas se electrotransfirieron en una membrana de Immuno-Blot PVDF de 0.45 μm (BIO-RAD®, CA, EUA) (0,25 A, 1,40 ha 4 °C). Las membranas se bloquearon con albúmina de suero bovino al 5% (BSA) (Sigma-Aldrich®, Missouri, EUA) en una solución de Tris con Tween20 (TBST) durante dos horas a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron en una solución diluida 500 veces de anticuerpo primario, descritos en la Tabla 5, durante la noche a 4 °C, se lavaron con TBST 3 veces, y luego se incubaron en una solución diluida 5000 veces de anticuerpo secundario durante dos horas a temperatura ambiente. El anticuerpo contra β-actina se usó como control interno y los resultados se expresaron en relación con el control. Las membranas fueron bañadas con el reactivo de luminol (Santa Cruz Biotechnology®, CA, EUA). Las placas fotográficas (número de catálogo 822526, Kodak®, NY, EUA) se sumergieron durante 5 minutos en el revelador (número de catálogo 1900943, Kodak®, NY, EUA), luego se enjuagaron con agua corriente y se pasaron a un recipiente con solución fijadora (catálogo 1901875, Kodak®, NY, EUA) durante 5 minutos. Las placas se enjuagaron con agua corriente y se dejaron secar. Las imágenes se digitalizaron y la intensidad de cada banda se cuantificó mediante el escaneo densitométrico con el software ImageJ® (NIH, MD, EUA)⁷⁷.

5.4.9. Determinación de la actividad de las metaloproteasas mediante la técnica de la zimografía.

La actividad proteolítica de las MMP2 y 9 se evaluó en geles de gelatina-sustrato. El tejido hepático (0.25 g) se homogeneizó mediante sonicación y se centrifugó con 1.7 mL de 1X

PBS a 13000 rpm (16400 g) durante 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante, y las proteínas se cuantificaron por el método del ácido bicinconínico ⁷⁶. Se añadieron volúmenes equivalentes de 50 µg de proteína con 2.5% de SDS, 1% de sacarosa y 4 mg / mL de rojo de fenol sin agentes reductores y se inyectaron en geles de acrilamida al 8% polimerizados con 1 mg / mL de gelatina. La electroforesis se realizó a 72 V durante 2 h. Los geles se enjuagaron dos veces en Tritón X-100 al 2.5% y luego se incubaron en un buffer de Tris-HCl a 37 °C durante 48 h. Los geles se fijaron y tiñeron con 0.25% de Coomassie Brilliant Blue G-250 en ácido acético al 10% y metanol al 30%. La actividad proteolítica se detectó como bandas transparentes contra la tinción de fondo del sustrato no digerido en el gel en la posición esperada, de acuerdo con el peso molecular de las MMP. Las imágenes se digitalizaron y la intensidad de cada banda se cuantificó con el software ImageJ® (NIH, MD, EUA) ⁷⁷.

5.4.10. Determinación de la expresión génica mediante la reacción cuantitativa de la retro transcripción (qRT-PCR).

Las muestras de hígado (0.1 g) se colocaron inmediatamente en una solución del reactivo de TRI en frío (Sigma-Aldrich®, Missouri, EUA) y se congelaron en nitrógeno líquido. El ARN se separó usando reactivos como cloroformo, isopropanol y etanol, consecutivamente. El sobrenadante se centrifugó durante 6 minutos a 10600 rpm (11500 g) y se resuspendió en agua.

La concentración de ARN se determinó mediante espectrofotometría (Nanodrop Lite, Thermo Fischer Scientific®, Shanghai, China) a una longitud de onda de 260 nm. Las muestras se trataron con DNAse Recombinant (Roche, Sigma-Aldrich®, Missouri, EUA). Las muestras se transcribieron con 2.5 μ g de RNA, inhibidor de RNasa (RNAseout) (Invitrogen, CA, EUA) y la transcriptasa inversa M-MuLV (New England BioLabs, MA, EUA). Las condiciones del ciclo de la transcripción reversa fueron las siguientes: 65 °C durante 5 minutos, 37 °C durante 60 minutos, 70 °C durante 15 minutos y 4 °C durante 5 minutos. La qRT-PCR se realizó utilizando el sistema Applied Biosystems® Step-One Plus Real-Time PCR con el software versión 2.3. La polimerasa Taq (TaqMan, Universal Master Mix REF 4304437, Applied Biosystems®, CA, EUA) se usó para medir la expresión génica de la GPx, TNF- α , IL-1 β y α -SMA (Tabla 6). Las pruebas se realizaron por duplicado y se marcaron con colorante informador FAM y con un inhibidor no fluorescente. Los ensayos fueron adquiridos en Thermo Fisher Technology® (MA, EUA). La mezcla de reacción

totalizó 10 µL y contenía 5 µL de TaqMan Universal Master Mix, 0.5 µL de sonda de gen problema, 1 µL de muestra (16 ng / µL) y 3,5 µL de H2O estéril. Las condiciones de ciclación de la qRT-PCR fueron de 95 °C durante 10 minutos, seguidas de 40 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 s. Se utilizó al gen GAPDH como el control interno, previamente evaluada su estabilidad y los resultados se expresaron como una relación relativa al control. La línea de base y el umbral se establecieron usando la función autobase y de umbral en Step One Software (Applied Biosystems®, CA, EUA). Las muestras se consideraron positivas si la amplificación objetivo se registró dentro de los 35 ciclos. Las curvas estándar se prepararon usando una muestra de hígado del grupo control en 5 diluciones en serie (1: 0, 1: 2, 1: 4, 1: 8, 1:16 y 1:32). Se construyó una curva estándar de los valores del umbral del ciclo (CT) versus el logaritmo de la dilución y se calculó la ecuación. La dilución utilizada fue 1:8. Cada análisis se realizó por duplicado con sus respectivos controles de reactivos. El análisis de los datos relativos de expresión génica se realizó utilizando el método de la doble delta CT ⁷⁸.

Tabla 6. Los ensayos usados en la técnica de qRT-PCR.

Genes	Número
a-SMA	Rn01759928_g1
GAPDH	Rn01775763_g1
GPx	Rn00577994_g1
IL-1β	Rn00580432_m1
TNF- α	Rn01525859_g1

5.5. Análisis estadístico.

Se realizaron pruebas estadísticas con el programa GraphPad Prism® 7.0 software (CA, EUA), como la media \pm error estándar de la media (SEM), el análisis de la varianza (ANOVA) de una sola vía seguido de la prueba de Tukey. Se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas en un intervalo de confianza del 95 % o p < 0.05.

6. RESULTADOS

6.1. La stevia previene el daño hepático agudo.

En principio, como un estudio piloto para investigar si la stevia pudiese ser un tratamiento potencial para las enfermedades hepáticas, se llevó a cabo un experimento sobre el daño hepático agudo inducido por una dosis alta de CCl₄ en ratas Wistar macho. El aspecto general de los hígados en los niveles macroscópico y microscópico se muestran en la figura 7. El tratamiento con una dosis aguda del CCl₄ produjo la inflamación del hígado que se evitó con la stevia. Las ratas tratadas con la stevia además del CCl₄ tenían hígados que eran macroscópicamente similares a los animales control. Las muestras teñidas con hematoxilina y eosina se muestran en las figuras 7A-D. La figura 7A, que representa al grupo control, muestra un parénquima hepático normal sin alteraciones, en donde se puede una luz vascular que corresponde a una vena central. La figura 7B corresponde a una sección representativa del hígado de una rata expuesta a la intoxicación aguda con CCl₄; en este caso, el tejido muestra una degeneración severa de los hepatocitos (esteatosis), así como la distorsión del parénquima hepático, la necrosis y la infiltración inflamatoria. Estas alteraciones fueron atenuadas por la stevia (Figura 7C). El tratamiento con la stevia a las ratas control no produjo ningún efecto sobre la histología hepática. En donde se observa la arquitectura de un espacio portal (Figura 7D). La administración aguda del CCl₄ aumentó significativamente la actividad sérica de la enzima ALT (Figura 7E), un indicador de la necrosis de los hepatocitos ⁷⁹ y la γ-GTP (Figura 7F), un marcador de colestasis ⁷⁹, en relación con el grupo control. El pretratamiento con la stevia evitó por completo el aumento de la actividad de las enzimas ALT y γ -GTP, lo que sugiere que la stevia puede prevenir la necrosis y la colestasis inducidas por el CCl₄. El tratamiento de la stevia en las ratas control no produjo ningún efecto sobre los marcadores séricos de daño hepático. El MDA es uno de los principales productos de la LPO y se utiliza comúnmente para medir el estrés oxidante en los tejidos⁸⁰. La intoxicación aguda con el CCl₄ desencadenó la LPO según los niveles de MDA, que fueron 3 veces más altos que los del grupo control, y la actividad antioxidante de la stevia evitó de manera parcial pero significativa, el proceso de LPO (Figura 7G). El estrés oxidante producido por el CCl₄ condujo a una disminución en la concentración de GSH en el hígado, que también fue prevenida por la stevia (Figura 7H). El tratamiento con la stevia en las ratas control no produjo ningún efecto sobre estos parámetros de estrés oxidante.



Figura 7. La stevia previene la lesión hepática aguda. Efecto de la stevia sobre la estructura macroscópica y en la tinción con hematoxilina y eosina en el hígados de las ratas control (A), las ratas tratadas con el tetracloruro de carbono (CCl₄) (B), las ratas tratadas con la stevia + CCl₄ (C) y las ratas administradas con la stevia sola (D). Los histogramas muestran la actividad sérica de las enzimas alanino aminotransferasa (ALT) (E), gamma glutamil transpeptidasa (γ -GTP) (F), el grado de peroxidación de lípidos (LPO) (G) y el contenido de glutatión reducido (GSH) (H) en el hígado de las ratas con el modelo de daño hepático agudo por el CCl₄. Cada barra representa el valor medio de los experimentos realizados por duplicado ± SEM (n = 8). (a) indica P <0.05 frente al grupo control; (b) indica P <0.05 frente al grupo de daño con el CCl₄. Vena central: VC; triada portal: TP.

6.2. La stevia previene la lesión hepática crónica inducida por el CCl4.

Debido a que se observó que el tratamiento con la stevia previno eficazmente el daño hepático agudo, se decidió evaluar si esta planta era capaz de prevenir la cirrosis inducida por el CCl₄. El grupo cirrótico mostró un aumento en el peso del hígado en comparación con el grupo control, mientras que el tratamiento con la stevia previno este aumento (Tabla 7). El peso corporal disminuyó ligeramente por la intoxicación crónica con el CCl₄, pero la stevia fue incapaz de mantener el peso corporal dentro de los valores control. La relación de peso hepático/peso corporal aumentó significativamente con la administración crónica del CCl₄, y la stevia previno completamente esta alteración (Tabla 7). El tratamiento con la stevia en las ratas control no produjo ningún efecto sobre el hígado, el peso corporal o la relación entre el peso del hígado y el peso corporal.

Tabla 7. Efecto de la stevia en el peso hepático, el peso corporal y la relación del peso del hígado y el peso corporal en el modelo de daño hepático crónico con el CCl₄.

Grupo	Peso del hígado				Peso corporal				Hígado/peso corporal			
Control	15.36	±	0.25		468.27	±	3.92		0.03	±	0.00	
CCl ₄	20.29	\pm	0.46	a	421.79	\pm	6.34	а	0.05	\pm	0.00	a
Stevia + CCl ₄	15.76	\pm	0.16	b	415.96	\pm	1.79	а	0.04	±	0.00	b
Stevia	13.80	±	0.26		436.51	±	4.30		0.03	\pm	0.00	

La tinción con H y E de las secciones del hígado se muestra en las figuras 8A-D. El grupo control representado en la figura 8A no muestra alteraciones del parénquima hepático. La figura 8B corresponde a una sección de tejido representativa del daño hepático crónico inducido por el CCl₄; en este caso, el tejido muestra alteración del parénquima hepático, esteatosis, hepatocitos hipercromáticos nucleares y núcleos atípicos y pleomórficos. Las alteraciones producidas por la administración del CCl₄ se evitaron mediante el tratamiento con la stevia (Figura 8C). El tratamiento con la stevia en las ratas control no produjo ningún efecto sobre la histología hepática (Figura 8D). Los marcadores séricos convencionales de daño hepático, la actividad de las enzimas ALT (Figura 8E), FA (Figura 8F) y γ-GTP (Figura 8G), se incrementaron significativamente debido al tratamiento crónico con el CCl₄. El tratamiento con la stevia previno significativamente el aumento de estos indicadores séricos de daño hepático. El glucógeno, la principal fuente de energía de reserva en el hígado ⁸¹, y la bilirrubina en suero se midieron para evaluar la capacidad funcional del órgano.

La figura 8H muestra una disminución dramática en el contenido de glucógeno hepático en las ratas cirróticas en comparación con el grupo control, en particular, la stevia previno completamente este efecto. La concentración plasmática de la bilirrubina total (Figura 8I) y no conjugada (Figura 8J) aumentó significativamente en la intoxicación crónica por el CCl₄, mientras que el tratamiento con la stevia previno completamente esta elevación. El tratamiento con la stevia en las ratas control no produjo ningún efecto sobre los niveles de glucógeno o bilirrubina.



Figura 8. La stevia previene la inflamación del hígado, la necrosis y la colestasis, en el daño crónico por el CCl₄. Efecto de la stevia sobre la estructura microscópica en la tinción con hematoxilina y eosina en hígados control (A), las ratas tratadas crónicamente con el tetracloruro de carbono (CCl₄) (B), las ratas tratadas con la stevia + CCl₄ (C) y las ratas tratadas solamente con la stevia (D). Los histogramas muestran la actividad de las enzimas séricas alanino aminotransferasa (ALT) (E), fosfatasa alcalina (FA) (F) y gamma-glutamil transpeptidasa (γ -GTP) (G); el contenido de glucógeno hepático (H), la bilirrubina sérica total (I) y la bilirrubina no conjugada (J). Cada barra representa el valor medio de los experimentos realizados en el ensayo, por duplicado ± SEM (n = 8). (a) indica P <0.05 frente al grupo control; (b) indica P <0.05 frente al grupo con el CCl₄. Vena central: VC; triada portal: TP.

<u>6.2.1. La stevia preserva el equilibrio redox en la lesión hepática crónica inducida con el</u> <u>CCl4.</u>

El estrés oxidante juega un papel fundamental en el desarrollo de la cirrosis hepática ^{82,83}, por esta razón se determinaron cinco indicadores diferentes de estrés oxidante para investigar la capacidad antioxidante de la stevia. La LPO y el GSH son buenos indicadores del estrés oxidante a nivel lipofílico e hidrofílico, respectivamente. Las ratas cirróticas mostraron valores aumentados de LPO (Figura 9A) y un contenido disminuido de GSH (Figura 9B) en el hígado. De manera importante, la administración de la stevia previno significativamente estas alteraciones, demostrando una fuerte actividad antioxidante.

La GPx es una enzima con una importante función antioxidante que actúa contra las ROS, utilizando GSH para evitar el efecto tóxico del peróxido de hidrógeno $(H_2O_2)^{84}$; esta enzima se redujo significativamente por el tratamiento con el CCl₄, mientras que la stevia, parcial pero significativamente, conservó el ARNm de la proteína GPx (Figura 9C).

El 4-HNE es un excelente marcador de estrés oxidante a nivel membranal, así como, un fuerte inductor de la producción de H_2O_2 intracelular ^{85,86}; cómo se puede ver en la figura 9D, el tratamiento crónico con el CCl₄ aumentó el 4-HNE y la stevia limitó significativamente este efecto.

El Nrf2 se considera uno de los principales reguladores de la respuesta antioxidante de la célula ^{87,88}, por lo tanto, se exploró la posibilidad de que, además de la actividad depuradora directa de las ROS de los antioxidantes presentes en las hojas de la stevia (como atrapadores de radicales libres), esta planta pueda inducir al Nrf2 como un mecanismo importante para modular el estado redox en las células hepáticas. La figura 9E muestra que las ratas cirróticas presentan un nivel disminuido de Nrf2 y que la stevia conserva por completo los niveles proteicos de este factor. El tratamiento con stevia en las ratas control no produjo ningún efecto sobre estos marcadores de estrés oxidante.



Figura 9. La stevia previene el daño oxidante producido por el tratamiento crónico con el CCl₄. Se realizaron determinaciones en el hígado de la peroxidación lipídica (LPO) (A), del contenido de glutatión reducido (GSH) (B) y de la expresión génica de la enzima glutatión peroxidasa (GPx) (C). El gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se utilizó como gen control en la qRT-PCR. Cada barra representa el valor medio de los experimentos realizados por duplicado \pm SEM (n = 8). Se determinaron los niveles de la proteína 4-hidroxi-2,3-nonenal (4-HNE) (D) y del factor nuclear de transcripción (eritroide-2) relacionado con el factor 2 (Nrf2) (E) de secciones de hígado por western blot, de ratas control, tratadas con el tetracloruro de carbono (CCl₄), stevia + CCl₄ y stevia. La intensidad de la señal fue determinada mediante un análisis de densitometría óptica (DO). Cada barra representa la media de los experimentos realizados por duplicado \pm SEM (n = 3). La β -actina se usó como control de carga. Los valores se expresan como el valor relativo normalizado a los valores del grupo control (control = 1). (a) indica P <0,05 frente al grupo control; (b) indica P <0,05 frente al grupo con el CCl₄.

<u>6.2.2.</u> La stevia previene la necrosis y la inflamación al bloquear al factor NF- κ B y las citoquinas proinflamatorias producidas por el CCl₄.

El NF- κ B es el principal regulador de la inflamación y la fibrosis hepática, que induce la expresión de las citoquinas proinflamatorias ⁸⁹. Como se muestra en la figura 10, los tejidos hepáticos se embebieron en parafina y se llevó a cabo una IHC con el anticuerpo NF- κ B (p65) para investigar el efecto de la stevia en el daño hepático crónico. La figura 10 muestra pocas detecciones específicas del antígeno contra p65 en el grupo control (panel A). Por el contrario, la expresión de p65 fue muy marcada en el grupo tratado con el CCl₄ (panel B) en comparación con el grupo control. El tratamiento con la stevia disminuyó notablemente el incremento de esta proteína (panel C), en comparación con los animales cirróticos.

La figura 10E muestra el porcentaje de zonas de positividad obtenidas de tres cortes de hígado, en donde puede apreciarse que las diferencias alcanzaron significancia estadística. Los resultados se confirmaron mediante western blot donde se puede observar que el CCl₄ indujo un aumento de 8 veces en la proteína p65, mientras que el tratamiento con la stevia atenuó significativamente este efecto (Figura 10F). El tratamiento con la stevia en las ratas control no produjo ningún efecto significativo sobre la expresión del p65.



Figura 10. La stevia previene la activación del factor proinflamatorio NF- κ B (p65) en el daño hepático crónico. La inmunohistoquímica del factor nuclear kappa B (p65) representativa de cortes de hígado de las ratas tratadas control (A), las ratas intoxicadas con el tetracloruro de carbono (CCl₄) (B), stevia + CCl₄ (C) y stevia (D). El panel E representa el porcentaje de positividad del factor nuclear kappa B (p65) obtenido a partir de cortes de hígado. El panel F representa los niveles de proteína en muestras de tejido hepático determinadas por análisis de western blot. La intensidad de la señal fue determinada mediante un análisis de densitometría óptica (DO). Cada barra representa el valor medio ± SEM (n = 3). Los valores se expresan como el valor relativo normalizado a los valores del grupo control (control = 1). (a) indica P <0,05 frente al grupo control; (b) indica P <0,05 frente al grupo con el CCl₄. Vena central: VC; triada portal: TP.

Varias citoquinas implicadas en los procesos inflamatorios en el daño hepático se regulan positivamente por el NF- κ B, incluidos el TNF- α , la IL-1 β , la IL-6 y la IL-10 ⁹⁰. Los niveles del TNF- α (Figura 11A), la IL-1 β (Figura 11B), la IL-6 (Figura 11C) y la IL-10 (Figura 11D) aumentaron en los hígados de las ratas cirróticas en comparación con el grupo control. El tratamiento con la stevia previno significativamente el aumento en los niveles de la proteína de estas citoquinas involucradas en la reacción proinflamatoria del hígado. Estos resultados mostraron que la stevia bloqueó la expresión de la transducción de la señal proinflamatoria del NF- κ B en la lesión hepática crónica inducida por el CCl₄. El tratamiento con la stevia en las ratas control no produjo ningún efecto sobre estas citoquinas.



Figura 11. La stevia previene la expresión de citoquinas proinflamatorias en el daño hepático crónico. Los niveles del factor nuclear tumoral alpha (TNF- α) (A), de las proteínas la interleucina (IL)-1 beta (β) (B), la IL-6 (C) y la IL-10 (D) en muestras de tejido hepático se determinaron por análisis de western blot del grupo control, del grupo intoxicado con el tetracloruro de carbono (CCl₄), stevia + CCl₄ y ratas tratadas con la stevia. La β -actina se usó como control. La intensidad de la señal fue determinada mediante un análisis de densitometría óptica (DO). Cada barra representa el valor medio ± SEM (n = 3). Los valores se expresan como el valor relativo normalizado a los valores del grupo control (control = 1). (a) indica P <0,05 frente al grupo control; (b) indica P <0,05 frente al grupo con el CCl₄.

6.2.3. La stevia previene la fibrosis inducida por la administración crónica del CCl₄.

El aspecto general de los hígados a nivel macroscópico y microscópico se puede ver en la figura 12. El tratamiento crónico con el CCl₄ produjo una fibrosis macronodular que se previno mediante la administración de la stevia. Las secciones de hígado coloreadas con la tinción de Masson se muestran en la figura 12A-D. La figura 12B muestra una porción representativa del hígado de una rata tratada crónicamente con el CCl₄ en la que se detectaron cantidades sustanciales de colágena (teñida de color azul grisáceo) alrededor de los nódulos fibróticos; la distorsión del parénquima es evidente en los hígados cirróticos cuando se compara con un hígado control (Figura 12A). La administración de la stevia a ratas con intoxicación crónica por el CCl₄ evitó la acumulación de colágena y la formación de nódulos regenerativos (Figura 12C), y la administración de la stevia a ratas sanas no produjo ningún efecto (Figura 12D). Con el fin de corroborar los hallazgos histopatológicos, se estimó la concentración de la HP en muestras de hígado para cuantificar la colágena. Como puede verse en la figura 12E, el tratamiento crónico con el CCl₄ produjo un aumento de 9 veces en el contenido de colágena, mientras que la administración de la stevia previno este efecto en forma parcial pero significativamente. Además, el análisis por western blot de la Col-1 α , mostró que el tratamiento crónico con el CCl₄ aumentó esta proteína y que la stevia previno significativamente esta elevación (Figura 12F). El tratamiento con la stevia en las ratas control no produjo ningún efecto significativo sobre el contenido de la Col-1a hepática.



Figura 12. La stevia previene la fibrosis en el daño hepático crónico. El efecto de la stevia sobre la estructura macroscópica y en los cortes histológicos de hígado teñidos con la tinción tricrómica de Masson de ratas control (A), las ratas tratadas crónicamente con el tetracloruro de carbono (CCl₄) (B), las ratas tratadas con la stevia + CCl₄ (G) y las ratas administradas con la stevia sola (D). El histograma E representa la colágena medida como el contenido hepático de hidroxiprolina (HP). Cada barra en el panel E representa el valor medio de los experimentos realizados por duplicado ± SEM (n = 8). El panel F muestra un análisis por la técnica western blot de la proteína colágena 1 alpha (Col-1 α). La proteína β -actina se usó como control. La intensidad de la señal fue determinada mediante un análisis de densitometría óptica (DO). Los valores se expresan como el valor relativo normalizado a los valores del grupo control (control = 1). Cada barra representa el valor medio ± SEM (n = 3). (a) indica P <0.05 frente al grupo control; (b) indica P <0.05 frente al grupo control; VC; triada portal: TP; matriz extracelular: MEC.

6.2.3.1. La stevia previene la fibrosis al bloquear la activación del TGF- β y de las CEH.

Con el fin de investigar si el efecto antifibrótico del tratamiento con la stevia se debió a la inhibición del mayor factor profibrogénico, el TGF-β, y/o a la inhibición de la transdiferenciación de las células productoras de la MEC, las CEH³⁰, fueron utilizadas las técnicas de IHC y de western blot (Figura 13). Como se muestra en la figura 13A-D, la IHC se usó para investigar la presencia del TGF-β1; la figura 13A muestra que se observaron pocas regiones específicas del TGF-^β1 en el grupo control. Por el contrario, la expresión del TGFβ1 fue más abundante en el grupo con el CCl₄ (Figura 13B) en comparación con el grupo control. En particular, el tratamiento con la stevia limitó el incremento del TGF-β1 inducido por el CCl₄ (Figura 13C), en comparación con los animales cirróticos. La figura 13E muestra el porcentaje de positividad obtenido de tres cortes de hígado, en donde puede apreciarse que los cambios observados en la IHC alcanzan diferencias estadísticamente significativas. Los resultados se confirmaron mediante western blot (Figura 13F) donde se puede observar que el CCl₄ indujo un aumento significativo en la proteína TGF-β1, mientras que el tratamiento con la stevia previno completamente este efecto. El tratamiento con la stevia en las ratas control no produjo ningún efecto sobre la expresión del TGF-β1. Es bien sabido que el TGF- β es un fuerte inductor de la transdiferenciación de las CEH y produce una acumulación excessiva de la MEC 4,91 . Cuando se activan, las CEH expresan la proteína α -SMA, por lo tanto, esta proteína se utiliza ampliamente para determinar si las CEH se activaron ³⁰. Las figuras 10G-J muestra la IHC en cortes de hígado tratados con el anticuerpo contra α -SMA. La expresión de la proteína α-SMA fue más abundante en el grupo tratado con el CCl₄ (Figura 13H) en comparación con el grupo control (Figura 13G). De manera notable, el tratamiento con la stevia limitó la expresión de la proteína α -SMA (Figura 13I), en comparación con los animales cirróticos. La figura 13K muestra el porcentaje de positividad para la α-SMA, obtenido a partir de tres cortes de hígado, indicando que los efectos observados fueron estadísticamente significativos. La técnica de western blot de la proteína α-SMA confirmó que el CCl₄ indujo un aumento significativo en esta proteína, mientras que el tratamiento con stevia previno completamente este efecto, lo que indica que la stevia es capaz de evitar la activación de las CEH, como parte de su mecanismo antifibrótico. El tratamiento con la stevia de las ratas control no produjo ningún efecto sobre la expresión de la α -SMA (Figura 13L).



Figura 13. La stevia previene el aumento del TGF-β y la activación de CEH en el daño hepático crónico. Los paneles A-D muestran la inmunohistoquímica del factor de crecimiento tisular beta 1 (TGF-β1) representativa de las ratas control (A), las ratas tratadas crónicamente con el tetracloruro de carbono (CCl₄) (B), las ratas tratadas con la stevia + CCl₄ (G) y las ratas administradas con la stevia sola (D). El histograma E representa el porcentaje de positividad del TGF-β1 obtenido a partir de cortes de inmunohistoquímica. En el panel F se representa los niveles de la proteína TGF-β en muestras de tejido hepático determinadas por western blot. Los paneles G-J muestran la inmunohistoquímica representativa de la proteína alpha-actina de músculo liso (α-SMA) de las ratas control (G), las ratas tratadas crónicamente con el CCl₄ (H), las ratas tratadas con la stevia + CCl₄ (I), y las ratas administradas con la stevia sola (J). El histograma K representa el porcentaje de positividad de la α-SMA obtenida a partir de cortes de inmunohistoquímica. El panel L representa el nivel de proteína la α-SMA en muestras de tejido hepático, el cual se determinó por western blot. La intensidad de la señal fue determinada mediante un análisis de densitometría óptica (DO). La β-actina se usó como control. Los valores se expresan como el valor relativo normalizado a los valores del grupo control (control = 1). Cada barra representa el valor medio ± SEM (n = 3). (a) indica P <0,05 frente al grupo control; (b) indica P <0,05 frente al grupo control; (

6.2.3.2. La stevia previene la fibrosis al regular negativamente al PDGF, CTGF, MMP2 y MMP13 y regulando positivamente a la Smad7

Los factores PDGF y CTGF son bien reconocidos por sus potentes efectos pro-proliferativos y profibrogénicos, respectivamente ⁹². Además, las actividades de las MMP2 y MMP13 conducen a la activación del TGF- β al escindir al TGF- β de su reservorio en la MEC, mejorando así la respuesta profibrogénica ^{93–96}. Interesantemente, la proteína Smad7 ejerce un efecto inhibitorio sobre la ruta del TGF- β mediante la activación de la degradación del receptor T β RI ⁹⁷. Como puede verse en la figura 14A y B, el daño inducido con la administración crónica del CCl₄ aumenta las proteínas PDGF y CTGF mientras que el tratamiento con la stevia bloquea completamente este efecto.

Las figuras 14D y E muestra que la actividad de la MMP2 y de la proteína MMP13 aumentaron en las ratas cirróticas, mientras que el grupo que recibió la stevia además del CCl₄ mostró niveles normales de las MMP2 y MMP13. La Smad7, una proteína de retroalimentación negativa autorreguladora de la señal del TGFβ/Smad, fue regulada negativamente por el CCl₄, vale la pena señalar que la stevia conserva los niveles de esta proteína inhibidora de la fibrogénesis (Figura 14C). El tratamiento con la stevia en las ratas control no produjo ningún efecto sobre las proteínas PDGF, CTGF, Smad7, MMP2 o MMP13.



Figura 14. La stevia previene el aumento del PDGF, CTGF, Smad7 y MMP2 en el daño hepático crónico. Los paneles A-C y E muestran el análisis de western blot del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (A), el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) (B), la Smad7 (C) y la metaloproteasa (MMP)-13 (E) en las muestras de tejido hepático de las ratas control, las ratas tratadas crónicamente con el tetracloruro de carbono (CC14), stevia + CC14 y stevia sola. La β -actina se usó como control. La actividad de la MMP2 se determinó mediante zimografia (D). La intensidad de la señal fue determinada mediante un análisis de densitometria óptica (DO). Cada barra representa el valor medio ± SEM (n = 3). Los valores se expresan como el valor relativo normalizado a los valores del grupo control (control = 1). (a) indica P <0,05 frente al grupo control; (b) indica P <0,05 frente al grupo CC14.

6.2.3.3. La stevia previene la fibrosis mediante el bloqueo de la vía no canónica del TGF- β y regula negativamente a la pSmad3L, pERK y pJNK

La Smad3 normalmente se activa mediante el TGF-β a través de la ruta canónica; sin embargo, ERK y JNK activan a la Smad3 a través de la fosforilación en la región 'linker' (vía no canónica). Esta vía permite a la proteína Smad3 inducir la proliferación de las CEH y por lo tanto potenciar la síntesis de las proteínas de la MEC ^{36,98}. Nuestros resultados muestran que las ratas tratadas crónicamente con el CCl₄ durante 12 semanas presentaron un aumento significativo en la expresión de las proteínas pSmad3L, pERK y pJNK, en comparación con el grupo de las ratas control. De manera notable, la administración de la stevia impidió la fosforilación de la Smad3, vía ERK y JNK (Figuras 15A-C).

Además, la administración crónica del CCl₄ aumentó los niveles de la proteína Smad3 y ERK, mientras que la stevia previno completamente este efecto (Figuras 15D y E); de manera importante, las relaciones pERK/ERK y pJNK/JNK se incrementaron significativamente por el CCl₄ y la stevia previno completamente este efecto (Figuras 15H e I). Debido a que tanto la pSmad3L como la Smad3 aumentaron de forma similar por el CCl₄, la relación pSmad3L/Smad3 no se alteró significativamente en este grupo (Figura 15G). El tratamiento con la stevia de las ratas control no produjo ningún efecto en la vía no canónica.



Figura 15. La stevia evita la fosforilación de la Smad3 en la región 'linker' al inhibir la activación de ERK y JNK. Los paneles A-F muestran el análisis por western blot de la proteína pSmad3L (A), la quinasa regulada por la señal extracelular fosforilada (pERK) (B), la quinasa: c-Jun N-terminal fosforilada (pJNK) (C) Smad3 (D) ERK (E) y JNK (F) en las muestras de tejido hepático de las ratas control, las tratadas crónicamente con el tetracloruro de carbono (CC1₄), la stevia + CC1₄ y stevia. La β -actina se usó como control. Los paneles G-I muestran las relaciones de la pSmad3L / Smad3 (G), pERK / ERK (H) y pJNK / JNK (I). La intensidad de la señal fue determinada mediante un análisis de densitometría óptica (DO). Cada barra representa el valor medio de tres ratas ± SEM. Los valores se expresan como el valor relativo normalizado a los valores del grupo control (control = 1). (a) indica P <0,05 frente al grupo control; (b) indica P <0,05 frente al grupo CCl₄.

6.3. La stevia previene el daño hepático inducido por la TAA.

La tabla 8 muestra la ganancia de peso corporal en las ratas tratadas durante 10 semanas con la TAA. Las ratas tratadas con la TAA, con o sin tratamiento concomitante con la stevia, ganaron menos peso que las ratas control. Al final de los tratamientos, se pesaron los hígados, se determinó el peso corporal y se calculó la relación entre el peso del hígado y el peso corporal (Tabla 8), mientras que el peso del hígado permaneció dentro del valor de los grupos control en todos los grupos, el peso corporal disminuyó significativamente en las ratas intoxicadas con la TAA y en el grupo de la stevia + TAA. Como resultado, la proporción del peso del hígado/peso corporal aumentó significativamente en estos grupos (Tabla 8).

Tabla 8. Efecto de la stevia en el peso hepático, el peso corporal y la relación del pesodel hígado y el peso corporal en el modelo de daño hepático crónico con la TAA.

Grupo	Peso del hígado			Peso	poral		Hígado/peso corporal				
Control	14.59	\pm	0.14	422.88	±	3.00		0.03	±	0.00	
TAA	14.53	\pm	0.35	262.13	±	3.41	a	0.06	±	0.00	а
Stevia + TAA	16.26	\pm	0.25	282.88	±	2.66	a	0.05	±	0.00	а
Stevia	13.47	±	0.69	410.00	±	3.85		0.04	\pm	0.00	

La figura 16 muestra que el tratamiento crónico con la TAA produjo fibrosis macronodular y que el tratamiento con la stevia previno este efecto. El grupo control no muestra alteraciones del parénquima hepático (Figuras 16A y B). Por el contrario, las secciones hepáticas de las ratas tratadas con la TAA muestran alteración y pérdida del parénquima hepático, necrosis periportal, proliferación de colangiolar e inflamación (Figuras 16C y D). La stevia evitó las alteraciones producidas por la TAA en el parénquima hepático (Figuras 16E y F). El tratamiento con la stevia en las ratas control no produjo ningún efecto sobre la histología hepática (Figuras 16G y H).

La Figura 16I muestra la ganancia de peso corporal en las ratas tratadas durante 10 semanas con la TAA. Las ratas tratadas con la TAA, con o sin tratamiento concomitante con la stevia, ganaron menos peso que las ratas control. La actividad enzimática sérica de la ALT (Figura 16J) y de la γ -GTP (Figura 16K), aumentaron significativamente por la intoxicación crónica con la TAA, mientras que el tratamiento con la stevia impidió parcial pero significativamente la elevación de estos marcadores de daño hepático.

La bilirrubina total (Figura 16L) y la directa (Figura 16M) aumentaron varias veces en el grupo intoxicado con la TAA, el tratamiento con la stevia atenuó significativamente la elevación de estos marcadores en la lesión hepática. El glucógeno, que constituye el principal reservorio de energía del hígado, casi se agotó en las ratas tratadas con la TAA, pero la stevia lo conservó parcial pero significativamente (Figura 16N). El tratamiento con la stevia de las ratas control no produjo ningún efecto sobre los marcadores de daño hepático estudiados.



Figura 16. Efecto de la stevia sobre la arquitectura hepática macroscópica y microscópica en ratas tratadas con la TAA, y los marcadores generales de daño hepático. El aspecto macroscópico y microscópico de los hígados en las ratas control, tratadas con la tioacetamida (TAA), stevia + TAA y stevia sola. La tinción de hematoxilina y eosina en los hígados de las ratas control (A, B), las tratadas con la TAA (C, D), las tratadas con la stevia + TAA (E, F) y administradas con la stevia sola (G, H). El curso temporal de la ganancia de peso corporal durante el experimento (I), la actividad de las enzimas séricas alanino aminotransferasa (ALT) (J) y gamma glutamil transpeptidasa (γ -GTP) (K), y la bilirrubina total (L) y directa (M) en suero, y el contenido de glucógeno hepático (N). Cada barra representa el valor medio de los experimentos realizados por duplicado \pm SEM (n = 8). (a) indica P <0.05 frente al grupo control; (b) indica P <0.05 frente al grupo de la TAA. Matriz extracelular: MEC; vena central: VC; triada portal: TP.

6.3.1. La stevia previene el daño hepático inducido por la TAA por mecanismos antioxidantes.

El daño hepático inducido por la administración crónica de la TAA produjo estrés oxidante como se muestra en la figura 17. Interesantemente, el tratamiento con la TAA redujo significativamente el Nrf2, lo que lleva a un desequilibrio redox dentro de las células hepáticas; sin embargo, el tratamiento con la stevia conservó parcial pero significativamente la expresión de este factor que se encarga de inducir al sistema antioxidante celular endógeno (Figura 17A). Además, los hígados de las ratas cirróticas con la TAA mostraron niveles aumentados de la proteína 4-HNE, pero la stevia fue capaz de prevenir significativamente el aumento de este indicador de estrés oxidante (Figura 17B). Las ratas tratadas con la TAA presentaron valores más bajos de GSH (Figura 17C) y un mayor contenido de GSSG (Figura 17D), como resultado, la relación GSH/GSSG (Figura 2E) y GSH + GSSG (Figura 17F) se redujeron significativamente. En particular, la administración de la stevia impidió significativamente las alteraciones en el recambio de glutatión producidas por la intoxicación crónica con la TAA. La figura 2G muestra que en los hígados de las ratas tratadas con la TAA los niveles de MDA se incrementaron significativamente, y que la stevia previno parcial pero significativamente esta elevación. La figura 17H muestra que la TAA disminuyó el ARNm de la enzima GPx y que la stevia fue capaz de prevenir significativamente este efecto. El tratamiento con la stevia en las ratas control no produjo ningún efecto sobre los marcadores de estrés oxidante estudiados.



Figura 17. La stevia previene el estrés oxidante en el daño hepático crónico al mejorar al Nrf2. Los niveles del factor nuclear de transcripción (eritroide-2) relacionado con el factor 2 (Nrf2) (A) y el 4-hidroxi-2,3-nonenal (4-HNE) (B) se evaluaron mediante western blot. La β -actina se usó como control de carga del western blot. La intensidad de la señal fue determinada mediante un análisis de densitometría óptica (DO). Cada barra representa el valor medio \pm SEM (n = 3). Los valores se expresan como el valor relativo normalizado a los valores del grupo control (control = 1). Los paneles C-F muestran las determinaciones del glutatión reducido (GSH) (C) y glutatión oxidado (GSSG) (D), GSH/GSSG (E) y GSH + GSSG (F), la peroxidación lipídica (LPO), (G) y el ARNm de la enzima glutatión peroxidasa (GPx), cuantificada por qRT-PCR (H) que se determinaron en hígados de las ratas control, las ratas tratadas crónicamente con la tioacetamida (TAA), stevia + TAA, y las ratas con la stevia sola. El gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se utilizó como gen control en la qRT-PCR. Cada barra representa el valor medio de los experimentos realizados por duplicado \pm SEM (n = 8). (a) indica P <0.05 frente al grupo control; (b) indica P <0.05 frente al grupo de la TAA.

6.3.2. La stevia bloquea la inflamación del hígado al regular negativamente al NF-κB y, por lo tanto, inhibe la cascada proinflamatoria.

Los tejidos hepáticos se embebieron en parafina y se realizó la IHC con el anticuerpo contra NF- κ B (p65) para investigar el efecto de la stevia en el daño hepático crónico. La figura 18A indica que se observaron pocas detecciones positivas del antígeno de p65 en el grupo control. Por el contrario, la expresión del p65 fue significativamente mayor en el grupo con la TAA (Figura 18B) en relación con el grupo control. Las muestras de hígado de ratas tratadas con la stevia además de la TAA mostraron una regulación del incremento inducido por la TAA (Figura 18C). La stevia sola no produjo ningún efecto (Figura 18D). El porcentaje de zonas positivas obtenidas a partir de tres cortes de hígado se muestran en la figura 18E, lo que indica que los efectos observados tuvieron significación estadística, cuando se comparó el grupo de daño con la TAA con el grupo que además se le administró la stevia. El análisis por western blot del p65 (Figura 18F) indica que la TAA aumentó significativamente los niveles de proteína de este factor, mientras que la stevia previno completamente este aumento. El ARNm de la IL-1 β se muestra en la figura 18G, donde se puede apreciar que este ARNm se incrementó con el tratamiento crónico con la TAA y que la stevia pudo evitar completamente este efecto. La proteína IL-1 β se evaluó mediante western blot y se representó en la figura 18H. Nuevamente, la intoxicación por la TAA dio como resultado una regulación positiva de esta citoquina proinflamatoria, mientras que el tratamiento con la stevia impidió significativamente esta elevación. También se midieron los niveles de ARNm (Figura 18I) y la proteína del TNF- α (Figura 18J), otro mediador proinflamatorio importante regulado por el NF-kB. En ambos casos, las ratas crónicamente tratadas con la TAA mostraron un aumento en el ARNm de TNF- α y la administración concomitante de stevia previno eficazmente este efecto. Los niveles de proteína la IL-6 (Figura 18K) y 10 (Figura 18L) fueron evaluados por western blot. Ambas citoquinas se elevaron por la administración de la TAA y fueron atenuadas significativamente por la administración de la stevia. El tratamiento con la stevia a las ratas control no produjo ningún efecto sobre el p65 y las citoquinas reguladas por este factor.



Figura 18. La stevia previene la activación del factor NF- κ B (p65) y la producción de citoquinas proinflamatorias en la cirrosis inducida por la TAA. La inmunohistoquímica del factor nuclear kappa B (p65) representativa de los cortes de hígado de las ratas control (A), las tratadas con la tioacetamida (TAA) (B), stevia + TAA (C) y stevia (D). Escala de barras = 50 µm. El panel E representa el porcentaje de positividad del p65 obtenido a partir de cortes de inmunohistoquímica (n = 3). Los niveles de la proteína del p65 (F), la interleucina (IL)-1 β (H), el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α) (J), la IL-6 (K) y la IL-10 (L) en las muestras de tejido hepático se determinaron mediante western blot. La intensidad de la señal fue determinada mediante un análisis de densitometría óptica (DO). La β -actina se usó como control de carga en el western blot (n = 3). Los niveles de ARNm de IL-1 β (G) y TNF- α (I) en las muestras de tejido hepático se cuantificaron mediante qRT-PCR (n = 8). El gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se utilizó como gen control en la qRT-PCR. Los valores se expresan como el valor relativo normalizado a los valores del grupo control (control = 1) (n = 8). Cada barra representa el valor medio de tres ratas ± SEM. (a) indica P <0.05 frente al grupo control; (b) indica P <0.05 frente al grupo la TAA. Vena central: VC; triada portal: TP.

6.3.3. La stevia previene la fibrosis hepática producida por la administración crónica de la TAA mediante la modulación de la IL-17A.

Posiblemente, la característica más importante y prominente del daño hepático crónico es la fibrosis que finalmente conduce a la cirrosis e incluso al carcinoma hepatocelular. En consecuencia, la fibrosis se evaluó mediante la tinción tricrómica de cortes de hígado, midiendo el contenido de la HP y mediante western blot se cuantificó la proteína Col-1 α en muestras de hígado (Figura 19).

En las figuras 19C y D puede verse una porción representativa del hígado de las ratas tratadas con la TAA en la que se detectaron cantidades sustanciales de colágena alrededor de los nódulos fibróticos. La administración de la stevia a ratas tratadas con TAA dio como resultado una cantidad disminuida de la deposición de la MEC (Figuras 19E y F), y la stevia sola no produjo ningún efecto (Figuras 19G y H).

El porcentaje de zonas fibróticas positivas obtenidas a partir de tres cortes de hígado se muestra en la figura 19I e indica que la fibrosis producida por la administración de la TAA alcanza significancia estadística cuando se compara con el grupo control, y que cuando se administró como tratamiento la stevia se previno la acumulación de la MEC. Como se muestra en la figura 19J, el tratamiento crónico con la TAA produjo un aumento de 6 veces en el contenido de colágena, según lo evaluado por el contenido de HP, mientras que la administración de la stevia previno este efecto en parte, pero de manera significativa. De acuerdo con el análisis mediante western blot de la Col-1 α , se mostró que el tratamiento crónico con la TAA aumentó el contenido de esta proteína, y la stevia previno significativamente este efecto (Figura 19K). La citoquina profibrogénica, IL-17A, que estimula directamente la activación de las CEH y la síntesis de colágena ⁹⁹, se muestra en la figura 19L, donde se puede observar que las ratas cirróticas mostraron valores aumentados de esta proteína y que la stevia fue capaz de prevenir esta elevación.



Figura 19. La stevia previene la deposición de la MEC en ratas crónicamente tratadas con la TAA. El efecto de la stevia con la tinción tricrómica de Masson en los hígados de las ratas control (A), las ratas tratadas con la tioacetamida (TAA) (B), las ratas tratadas con la stevia + TAA (C) y las ratas administradas con la stevia sola (D). El área de fibrosis obtenida a partir de las histologías (200 µm) se representa en el panel I (n = 3). El histograma J representa la colágena medida como el contenido hepático de la hidro xiprolina (HP) (n = 8). Se muestran los análisis por westerm blot de las proteínas la colágéna 1 alpha (Col-1 α) (K) y la interleucina (IL)-17A (L). La intensidad de la señal fue determinada mediante un análisis de densitometría óptica (DO). La β-actina se usó como control (n = 3). Los valores se expresan como el valor relativo normalizado a los valores del grupo control (control = 1). Cada barra representa el valor medio de los experimentos realizados por duplicado ± SEM. (a) indica P <0.05 frente al grupo la TAA. Vena central: VC; triada portal: TP; matriz extracelular: MEC.

<u>6.3.4. La stevia regula negativamente los factores profibrogénicos TGF- β 1, CTGF y PDGF, aumenta la proteína Smad7 y previene la activación de las CEH.</u>

El TGF- β es considerado uno de los factores profibrogénicos más importantes que inducen la transdiferenciación de las CEH quiescentes a una máquina de producción de la MEC ⁹². Por lo tanto, se piensa que las estrategias terapéuticas para bloquear este factor para evitar la activación de las CEH son el tratamiento antifibrótico más efectivo ⁹⁰. La figura 20 representa el análisis de la IHC del TGF-β1, en el que se observaron pocas detecciones específicas del antígeno de TGF-\u00df1 en el grupo control (Figura 20A). Por el contrario, la expresión del TGF- β 1 fue significativamente mayor en el grupo intoxicado con la TAA (Figura 20B) en relación con el grupo control. El tratamiento con la stevia más la TAA mostró una regulación a la baja del TGF- β 1 (Figura 20C). El porcentaje de zonas positivas obtenidas a partir de tres cortes de hígado se muestra en la figura 20E, lo que indica que los efectos observados en la intoxicación con la TAA alcanzaron significación estadística con respecto al control; por el contrario, al administrar concomitantemente la stevia se previno la detección positiva de este factor. Este resultado fue confirmado por técnicas de western blot del TGF-β1 (Figura 20F), donde la TAA aumentó significativamente los niveles de proteína de este factor, mientras que la stevia impidió significativamente este aumento por la administración crónica de la TAA. La figura 201 representa el análisis de la IHC de la proteína α -SMA, en el que se observaron pocas detecciones de las CEH activadas en el grupo control. Sin embargo, la expresión de la proteína α-SMA fue significativamente mayor en el grupo de la TAA (Figura 20J) en relación con el grupo control. Notablemente, el tratamiento con stevia previno la transdiferenciación de las CEH observada en el grupo intoxicado (Figura 20K). La administración de la stevia por sí sola no produjo ningún efecto (Figura 20L). El porcentaje de zonas positivas obtenidas a partir de 3 cortes de hígado se muestra en la figura 20M, indicando que la intoxicación con la TAA aumentó significativamente la detección de la proteína α-SMA, mientras que el tratamiento con la stevia en el daño con la TAA limita significativamente la presencia de esta proteína.

La figura 20N muestra el qRT-PCR de la α -SMA, en donde se observó que el ARNm de esta proteína se incrementó mediante el tratamiento crónico con la TAA y que la stevia previno eficazmente este efecto. El western blot de la proteína α -SMA (Figura 20O) mostró un resultado similar a la IHC y a la qRT-PCR (Figura 20N), donde la TAA aumentó

significativamente los niveles de esta proteína, mientras que la stevia impidió significativamente este aumento. Por otro lado, los niveles de la proteína CTGF fueron evaluados por western blot y presentados en la figura 20G. De nuevo, la intoxicación con la TAA dio como resultado una regulación positiva de este factor profibrogénico, mientras que el tratamiento con stevia impidió significativamente esta elevación. El factor proliferativo PDGF también se incrementó por la administración de la TAA y el tratamiento concomitante con la stevia previno esta elevación (Figura 20H). Por el contrario, la Smad7 ejerce un efecto inhibitorio sobre la ruta del TGF- β 1. Prominentemente, la administración crónica de la TAA redujo los niveles de proteína de esta molécula inhibidora, mientras que el tratamiento con la stevia a ratas intoxicadas con la TAA conservó completamente los valores normales (Figura 20P). El tratamiento con la stevia en las ratas control no produjo ningún efecto sobre estos factores profibrogénicos y proliferativos.



Figura 20. La stevia evita la sobreexpresión del TGF- β y la activación de las CEH en la cirrosis inducida por la TAA. Se muestra la inmunohistoquímica (IHC) del factor de crecimiento tisular B (TGF- β) representativa de las ratas control (A), las ratas tratadas con la tioacetamida (TAA) (B), las ratas tratadas con stevia + TAA (C) y las ratas a las que se les administró la stevia sola (D). El histograma E representa el porcentaje de positividad del TGF- β obtenido a partir de la IHC. Los niveles de las proteínas TGF- β (F), del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) (G) y del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (H) en las muestras de tejido hepático se determinaron por el análisis de westem blot. Se muestra la IHC de la proteína alpha-actina de músculo liso (α -SMA) representativa de las ratas control (I), las ratas tratadas con la tevia + TAA (K) y las ratas a las que se administró la stevia sola (L). La β -actina se usó como control de carga en el westem blot (n = 3). El histograma M representa el porcentaje de positividad de la α -SMA obtenido a partir de la inmunohistoquímica (n = 3). La intensidad de la señal fue determinada mediante un análisis de densitometría óptica (DO). El ARNm de la α -SMA cuantificado por qRT-PCR se muestra en el panel N (n = 8). El glutaraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se utilizó como gen control en la qRT-PCR. Los paneles O y P muestran el nivel de las proteínas α -SMA y Smad7 en muestras de tejido hepático determinadas mediante westem blot. La intensidad de la señal fue determinada mediante un análisis densitométrico (n = 3). Cada barra representa el valor medio de tres ratas ± SEM. Los valores se expresan como el valor relativo normalizado a los valores del grupo control (control = 1). (a) indica P <0.05 frente al grupo control; (b) indica P <0.05 frente al

6.3.5. La stevia regula negativamente a las MMP y TIMP-1.

Las MMP juegan un papel importante en la deposición y degradación de la MEC ¹⁰⁰. Las figuras 21A y 21B muestran la actividad de las enzimas MMP9 y MMP2, respectivamente, evaluadas por zimografía (Figura 21C). En ambos casos, la actividad se incrementó mediante el tratamiento con la TAA, mientras que la stevia bloqueó significativamente este efecto. Los niveles de la proteína MMP13 fueron investigados por western blot y presentados en la figura 21D, donde se puede observar que las ratas cirróticas presentaron una elevación de siete veces de esta proteína y que la stevia preserva parcial pero significativamente a los valores control a esta MMP. Los niveles de la proteína del TIMP-1 fueron elevados en ratas tratadas con TAA, pero la stevia pudo evitar este efecto (Figura 21E). El tratamiento con la stevia en las ratas control no produjo ningún efecto sobre las MMP o el TIMP-1.


Figura 21. La stevia modula la expresión y la actividad de las metaloproteasas en los hígados de las ratas tratadas con la TAA. Las actividades de las metaloproteasa (MMP)9 (A) y MMP2 (B) se determinaron mediante zimografía (C). Se evaluaron mediante western blot la proteína MMP13 (D) y la proteína inhibidora de las metaloproteasa (TIMP)-1 (E) en muestras de tejido hepático de las ratas control, las tratadas con la tioacetamida (TAA), TAA + stevia y stevia. La intensidad de la señal fue determinada mediante un análisis de densitometría óptica (DO). La β -actina se usó como control. Los valores se expresan como el valor relativo normalizado a los valores del grupo control (control = 1). Cada barra representa el valor medio ± SEM (n = 3). (a) indica P <0.05 frente al grupo control; (b) indica P <0.05 frente al grupo con la TAA.

<u>6.3.6. La stevia bloquea la activación de las proteínas pERK, pJNK y pp38 y, por lo tanto, la fosforilación de la pSmad3L.</u>

La Smad3 puede ser fosforilada por las MAPK en la región 'linker' activando una molécula muy profibrogénica llamada pSmad3L que induce la proliferación de las CEH y la síntesis de la MEC ^{35,98}. Se encontró que las ratas tratadas con la TAA mostraron un aumento significativo en la expresión de la proteína pSmad3L, pERK, pp38 y pJNK, en comparación con el grupo control (Figura 22). Interesantemente, la administración de la stevia previno la fosforilación de la Smad3 (Figura 22A), JNK (Figura 22D), p38 (Figura 22G) y ERK (Figura 22J). Además, la administración crónica de la TAA aumentó los niveles de la proteína Smad3 y ERK, mientras que la stevia previno completamente este efecto (Figuras 22B y K). Es importante destacar que pJNK/JNK, pp38/p38 y pERK/ERK y las relaciones se incrementaron significativamente por la TAA, y la stevia previno completamente este efecto (Figuras 22F, 22I y 22L). Debido a que tanto la pSmad3L como la Smad3 se incrementaron de manera similar por la TAA, la relación pSmad3L/Smad3 no se alteró significativamente en este grupo (Figura 22C). El tratamiento con la stevia de las ratas control no produjo ningún efecto en la vía no canónica de la Smad3.



Figura 22. La stevia evita la fosforilación de la proteína Smad3 en la región 'linker' al inhibir la activación de las proteínas JNK, p38 y ERK. Se muestra el análisis westem blot de las proteínas pSmad3L (A), Smad3 (B), la quinasa c-Jun-N terminal fosforilada (pJNK) (D), JNK (E), pp38 (G), p38 (H), la quinasa regulada por la señal extracelu lar fosforilada) (pERK) (J) y ERK (K) en las muestras de tejido hepático del grupo control, el grupo intoxicado con la TAA, TAA + stevia y las ratas tratadas con la stevia sola. La proteína β-actina se usó como control. Se muestran las relaciones de la pSmad3L / Smad3 (C), pJNK / JNK (F), pp38 / p38 (I) y pERK / ERK (L). La intensidad de la señal fue determinada mediante un análisis de densitometría óptica (DO). Cada barra representa el valor medio \pm SEM (n = 3). Los valores se expresan como el valor relativo normalizado a los valores del grupo control (control = 1). (a) indica P <0.05 frente al grupo control; (b) indica P <0.05 frente al grupo de la TAA.

7. DISCUSIÓN

Debido a la localización anatómica y al papel que juega en la desintoxicación de los xenobióticos, el hígado es uno de los órganos más susceptibles de ser atacado por diversos agentes, por lo que, la realización de sus funciones puede verse comprometida. El 45 % de las muertes en el mundo son debidas a enfermedades crónicas fibroproliferativas ¹⁰¹. De acuerdo con la OMS, en 2015, la cirrosis hepática fue la decimoséptima causa de muerte en el mundo. Las proyecciones de la OMS al 2030 señalan que la cirrosis y el cáncer de hígado claramente continuarán aumentando como causas de muerte¹. La cirrosis es un problema de salud importante en todo el mundo no solo por su alta prevalencia sino también por la falta de tratamientos efectivos 43. Asimismo, los escasos tratamientos resultan costosos e inaccesibles en la mayoría de los países del mundo. Por lo tanto, el desarrollar nuevas herramientas terapéuticas que prevengan esta afección es de gran importancia, por lo que el objetivo de esta investigación fue evaluar un posible tratamiento para la cirrosis en modelos animales que comparten algunas características con la enfermedad en el humano ¹⁰², con el fin de contribuir, y eventualmente desarrollar un nuevo tratamiento para el daño al hígado, así como caracterizar sus mecanismos de acción. La stevia es una planta originaria de Paraguay que contiene compuestos bioactivos, como son los glicósidos de esteviol, siendo el STV y RBD A los que se encuentran en mayor proporción¹⁹. Estos edulcorantes de la stevia son los únicos en tener un índice glucémico cero y cero calorías, y fueron reconocidos por la FDA como GRAS¹⁹. Existen algunos estudios que sugieren el potencial antioxidante y antiinflamatorio de la stevia, de sus extractos y/o de sus componentes aislados ^{48–51,53,54}. Sin embargo, en cuanto al efecto antifibrótico de la stevia no existen estudios. Estudios in vivo solo reportan que las hojas de la stevia previnieron la elevación de las actividades de las enzimas hepáticas ALT y AST cuando se indujo daño en ratas mediante la administración crónica de hepatotóxicos como la TAA^{49,57}. Sin embargo, estos estudios marcaron la pauta para el desarrollo de esta investigación.

En principio, como un estudio piloto para investigar si la stevia pudiese ser un tratamiento potencial para las enfermedades hepáticas se llevó a cabo un experimento sobre el daño hepático agudo inducido por una dosis alta de CCl₄. Una vez obtenidos resultados prometedores se indujo daño hepático mediante la administración crónica del CCl₄ y la TAA, estos agentes de daño inducen en el hígado fibrosis centrolobulillar que se asemeja en gran

77

medida a la cirrosis humana ⁹⁹ y en adición tienen una excelente reproducibilidad. Sin embargo, en el modelo con el CCl₄, una vez cesadas las administraciones, se reestablece la funcionalidad del órgano, mientras que la TAA muestra una latencia más larga entre la exposición al hepatotóxico y el desarrollo de la lesión hepática. Además, la TAA conduce a procesos inflamatorios y fibróticos más exacerbados que el CCl₄ ^{13,15,102,103}. Por lo tanto, representa un reto mayor para los potenciales fármacos. Por lo que se realizó primero el modelo crónico con el CCl₄ y posteriormente se comprobaron los efectos de la stevia en el daño hepático por la TAA.

En esta investigación, tanto las ratas crónicamente tratadas con el CCl₄ como las ratas tratadas con la TAA mostraron similitudes cualitativas y diferencias cuantitativas. Los hepatotóxicos elevaron significativamente los parámetros de daño hepático con respecto al control, siendo el grupo de la TAA el que mostró el daño más contundente y severo, efectos que son compatibles con lo reportado en la literatura ^{13,15,102,103}. En contraste, la stevia tuvo un efecto protector cuando se indujo el daño en ratas durante 12 semanas con el CCl₄ o cuando se indujo el daño con la administración de la TAA por 10 semanas. Las determinaciones bioquímicas, histológicas y moleculares mostraron los efectos protectores de la stevia. Se encontró, por primera vez, que la stevia previene la cirrosis hepática experimental inducida en ratas. Además, se describieron varios mecanismos de acción, que incluyen la modulación de las vías antioxidante, antiinflamatoria y antifibrótica. Las elevadas concentraciones plasmáticas de bilirrubina son marcadores específicos de la lesión hepática grave ya que proporcionan información sobre la captación, la conjugación y la excreción del hígado, por lo tanto, de la funcionalidad hepática ^{104,105}. Los posibles efectos benéficos de la stevia se observaron en los marcadores de daño hepático más utilizados (ALT, γ -GTP, FA, bilirrubina y glucógeno). Los efectos antioxidantes de la stevia se asociaron con su capacidad para inducir al factor Nrf2, mejorando así la maquinaria antioxidante endógena de la célula, lo que permitió protegerla de los incrementos de la LPO y 4-HNE, dos marcadores importantes de estrés oxidante en las membranas ¹⁰⁶; la stevia también tuvo la capacidad de mantener en niveles control al GSH hepático, este último es un indicador del estrés oxidante en el citoplasma ¹⁰⁷, mejorando así el equilibrio del GSH / GSSG. Además, cuando se indujo el daño hepático en las ratas intoxicadas, la stevia fue capaz de preservar los niveles normales del factor Nrf2, lo que puede explicar que algunas enzimas antioxidantes como la GPx, cuva

síntesis es regulada por este factor, haya mostrado niveles control. Las propiedades antiinflamatorias se evidenciaron por la capacidad de las hojas de stevia para bloquear al factor NF-kB, principal factor de la respuesta proinflamatoria ⁸⁹, y en consecuencia, las citoquinas proinflamatorias, tales como el TNF- α , la IL-1 β , la IL-6, la IL-10 y la IL-17A, se regularon negativamente. En particular, la stevia puede ser una herramienta terapéutica con posibles efectos a diversos niveles celulares para prevenir la cirrosis experimental. La actividad antifibrótica de la planta de la stevia fue ampliamente demostrada en este trabajo, y el mecanismo de acción fue profundamente analizado; la stevia evitó la deposición de la colágena según lo evaluado por el contenido de hidroxiprolina, el análisis histológico y por la técnica de western blot de la proteína Col-1 α . El mecanismo antifibrótico de la stevia también podría ser debido a que evitó la propagación de la señal profibrogénica de los factores CTGF y PDGF, las vías de señalización río abajo de la ruta canónica del TGF-β; además, la planta moduló la actividad de las MMP y sus inhibidores. Al evitar la elevación de las MMP, la stevia evitó la liberación de las citoquinas fibrogénicas que se encuentran de reservorio en la MEC. Conjuntamente, se observó que la stevia protege al hígado de la fibrosis al regular negativamente la vía no canónica del TGF-β. La administración de las hojas de la planta evitó la activación de las MAPK, lo que impidió la fosforilación de la Smad3 en la región 'linker', evitando así la formación de la molécula Smad más profibrogénica, pSmad3L^{34,108}. Además, se encontró que la molécula inhibitoria de la vía de señalización del TGF-β, la Smad7⁹⁷, se redujo por la intoxicación de los hepatotóxicos y que la stevia fue capaz de prevenir este efecto. En consecuencia, las CEH no se activaron en presencia de la stevia, y como resultado, se previno la fibrosis. A continuación, se discuten a profundidad los efectos de la stevia en las vías de señalización.

7.1. La stevia previene la lesión hepática experimental crónica al preservar el sistema antioxidante endógeno de la célula: Nrf2.

La producción incontrolada de los radicales libres induce estrés oxidante que deteriora las funciones celulares lo que conduce a la muerte celular ¹⁰⁹. Los radicales libres se han visto implicados en el envejecimiento y la etiología de numerosas enfermedades, incluidas la aterosclerosis, la diabetes, el cáncer y la neurodegeneración ^{87,110–114}. En cuanto a las enfermedades hepáticas es sabido que los altos niveles de las ROS juegan un papel importante en el establecimiento, el desarrollo y la perpetuación del daño en el hígado ^{12,82,115}.

Las ROS pueden generar efectos tóxicos tales como la LPO, la destrucción de las membranas celulares, la inactivación enzimática, la formación de aductos en proteínas, necrosis, apoptosis y mutaciones al ADN por moléculas señal como el 4-HNE, y como se mencionó anteriormente, el hígado es uno de los principales órganos atacados por las ROS ^{11, 116, 117}. El 4-HNE es un lípido reactivo más tóxico que el MDA. El 4-HNE participa directamente en la activación de las CK y en el daño a los hepatocitos, además actúa como segundo mensajero de las ROS, promoviendo la perpetuación del daño ^{85,118–120}.

Por lo tanto, se investigó si los efectos protectores de la stevia estaban asociados con su actividad antioxidante. En la Tabla 1 se muestra un resumen de los compuestos más abundantes presentes en las hojas de la stevia. Se sabe que algunos compuestos, como los flavonoides, poseen importantes propiedades antioxidantes ^{121,122}; sin embargo, constituyen solo un pequeño porcentaje de los componentes activos de las hojas de la stevia. Quizás los componentes activos más abundantes de la stevia son el STV y el RBD A, que poseen solo una capacidad limitada para la neutralización de los radicales libres según lo determinado por la prueba de DPPH (datos no mostrados). En contraste, es importante mencionar que el tratamiento con la stevia en los animales intoxicados dio como resultado la prevención de los marcadores de estrés oxidante tales como MDA, 4-HNE, GSH y GPx. Estos resultados son similares a los reportados por dos grupos de investigadores, quienes encontraron que el extracto acuoso de la stevia limitaba la peroxidación de los ω -3 y ω -6 en las membranas plasmáticas en ratas diabéticas ^{50,123}.

Cuando las células se someten al estrés oxidante responden con una expresión rápida y coordinada de genes antioxidantes a través de interacciones con el elemento de respuesta antioxidante (ARE) para protegerse a sí mismas. Sin embargo, la capacidad antioxidante de la célula es rápidamente superada cuando el efecto del agente agresor se presenta de forma súbita o es mantenido durante un largo periodo. La regulación en la expresión de los genes antioxidantes que contienen ARE está dada principalmente por el Nrf2^{124,125}. El hígado posee una alta actividad metabólica; por lo tanto, las funciones protectoras del Nrf2 en la patogénesis de la enfermedad hepática han sido ampliamente estudiadas ^{87,126}.

Estos antecedentes llevaron a investigar si las hojas de la stevia podrían inducir la expresión del Nrf2, un regulador clave en la vía de señalización redox del hígado que se encuentra presente tanto en los hepatocitos, como en las CEH y en las CK ^{87,115,}

¹¹⁰. El tratamiento crónico con los hepatotóxicos dio como resultado una disminución proteica del Nrf2 hepático. En particular, se observó por primera vez que la stevia evitó eficazmente la regulación a la baja de este factor antioxidante en el daño al hígado. Estos hallazgos sugieren que probablemente los glucósidos de la stevia, particularmente el STV y el RBD A, pudiesen estar participando, ya que de acuerdo con lo reportado en la literatura se tiene que la stevia mejora el sistema antioxidante y neutraliza a las ROS ^{50,51}, además existen estudios que muestran que el RBD A, glucósido presente en la stevia, promueve la unión del Nrf2 con ARE, limitando el daño oxidante a las células ^{52,127}. Por lo que, siendo la vía del Nrf2 un sistema citoprotector endógeno complejo que puede reducir los niveles de los metabolitos reactivos por la inducción de la expresión de las enzimas antioxidantes, mediante el ARE ^{19,127,128}, es razonable especular que la stevia podría inducir la preservación de los niveles del Nrf2 en el hígado, promoviendo así la síntesis de GSH y de las enzimas antioxidantes como la GPx para combatir el estrés oxidante. De este modo se evitó la propagación de la oxidación de los lípidos y de las proteínas vía 4-HNE. Por lo que la stevia proporciona protección contra el daño hepático al regular el equilibrio redox de la célula. Además, se ha sugerido que el estrés oxidante pudiese tener un papel en la activación de las

CEH. Las ROS producidas por el daño proporcionan señales de activación paracrina para inducir la transdiferenciación, la proliferación y la migración de las CEH, y la producción de las proteínas de la MEC ^{129–131}. Por lo tanto, es probable que estas acciones antioxidantes proporcionadas por la stevia contribuyan a la prevención de la activación de las CEH, dando como resultado la prevención de la fibrosis.

7.2. La stevia previene la lesión hepática experimental al bloquear la cascada proinflamatoria regulada por el NF-κB.

El NF-κB es una familia de factores de transcripción que regulan los genes implicados en los procesos de inflamación, inmunidad y respuesta de la fase aguda, proliferación, supervivencia y apoptosis ^{89,132–134}. La inflamación es un mecanismo central en la progresión de la enfermedad hepática. Las CK son activadas por el agente agresor y en respuesta secretan una amplia cascada de proteínas inflamatorias ¹³⁵. El NF-κB es, sin duda, el director de orquesta en la respuesta inflamatoria ^{89,136,137}. Este factor es un sensor del estrés oxidante en la célula, por lo que el aumento en la generación de las ROS en la mitocondria promueve su

activación 19,138 , también puede ser activado por el incremento de H₂O₂ y del 4-HNE 16 . El p65 es una de las formas más activas y uno de los miembros más prevalentes de la familia del NF-kB, y requiere para su activación de la fosforilación del IkB, su inhibidor ¹³⁹. La activación del p65, el sensor del estrés oxidante, promueve un coordinado aumento en la expresión génica del IL-1, la IL-6 y el TNF-α, los cuales están estrechamente relacionados con la inflamación ¹⁴⁰. La activación directa del NF-κB por medio de la producción de las ROS lleva a la estimulación de IL-1 β y TNF- α , que podría conducir a la activación de dicho factor^{141–143}. Este tipo de circuito de autorregulación positiva puede amplificar y perpetuar las respuestas inflamatorias por lo que la acción prolongada e incontrolada de estas proteínas es muy dañina ⁹⁰. Diversos estudios sugieren que en la patogénesis de las enfermedades hepáticas, la vía de señalización del NF-kB promueve la necrosis y la apoptosis, mediante la activación de TNF- α , IL-6 y IL-1 β ^{89,90}. Algunas investigaciones *in vitro* han demostrado que algunos extractos de la stevia, el esteviol y el STV impiden la activación del NF-KB, al evitar la activación de las CK y/o al promover directamente la producción de su componente inhibitorio IkB, reprimiendo así la migración de este factor al núcleo, y por lo tanto, evita la promoción de genes proinflamatorios como TNF- α , IL-1 β , IL-6 y IL-17A ^{54–56,127,144–146}. De acuerdo con la evidencia reunida por IHC y western blot del presente estudio, se demostró que la cantidad del NF-KB se multiplicó varias veces en los hígados cirróticos y que la stevia previno eficaz y completamente este efecto. En esta investigación, las hojas de la stevia previnieron la necrosis y la colestasis al impedir el desarrollo de la cascada inflamatoria a través de la vía del NF-kB. Por lo que se puede sugerir que el efecto antiinflamatorio de la stevia es debido al aumento en la producción de IkB y a la disminución del grado de LPO, evitando así la progresión de la fibrosis, ya que al inhibir al factor NF- κ B se promueve la expresión del pseudo receptor a TGF-β1, BAMBI, evitando el progreso de la señal fibrogénica y, la activación y supervivencia de las CEH¹⁴⁷. Por otra parte, se estudió a la proteína IL-17A, ya que esta citoquina puede inducir la activación del NF-κB así como la expresión de la proteína Col-1^{101,148,149}. Nuestros resultados indican que las propiedades benéficas de la stevia están fuertemente asociadas con la capacidad de la planta para inhibir la actividad del NF-κB y de prevenir un aumento de la IL-17A, lo que conduce a la regulación a la baja de los principales mediadores proinflamatorios. Además, en la literatura científica existe evidencia emergente que apoya una interacción funcional entre las vías de los factores

Nrf2 y NF-κB, lo que contribuye a la generación de una complejidad adicional en la regulación del comportamiento celular. El NF-κB directamente reprime la señalización del Nrf2¹⁵⁰, lo que resulta en una tasa de supervivencia elevada de las CEH activadas y conduce a la producción elevada de la MEC¹⁴⁸. Por lo que consideramos que el mecanismo de acción de la stevia en la regulación a la baja del NF-κB en el daño hepático crónico podría ser mediante la inhibición directa de este factor, al promover su proteína inhibitoria IκB y/o los efectos antioxidantes de la planta. Ya que, al evitar la propagación del estrés oxidante se previene la vía proinflamatoria del p65. Por lo tanto, la stevia limita la propagación de la señal del NF-κB y evita el desarrollo de una cascada proinflamatoria fortalecida y, a su vez, previene la fibrosis, por consiguiente, preserva la estructura y función del parénquima hepático. En conclusión, nuestros hallazgos sugieren que el tratamiento con la stevia puede conducir a la inmunomodulación celular por diferentes flancos.

7.3. La stevia previene la fibrosis hepática al limitar la activación, proliferación y migración de las CEH.

Como se mencionó anteriormente, el estrés oxidante conduce a la necrosis, principalmente mediante la activación del NF- κ B, y la necrosis crónica puede conducir a la fibrosis ^{151,152}. Por lo tanto, la prevención del estrés oxidante y la necrosis proporcionada por el tratamiento con la stevia puede contribuir de manera indirecta al efecto antifibrótico de la stevia. Asimismo, en este trabajo, se observó los posibles efectos antifibróticos directos de esta planta, incluyendo sus acciones sobre la actividad de las MMP, la regulación a la baja de las vías del TGF- β canónica y no canónica, y la conservación de la proteína antifibrótica, Smad7. Estos efectos se discuten a continuación.

7.3.1. La stevia inhibe la activación y proliferación de las CEH bloqueando directamente al TGF- β y/o a sus vías efectoras CTGF y PDGF.

Como anteriormente fue señalado, una abundante evidencia indica que el TGF- β induce la activación de las CEH ^{4,91,153–156}. La activación de las CEH está ahora bien establecida como un conductor central de la fibrosis en la lesión hepática experimental y humana ^{23,91,155}. El TGF- β es en principio secretado por las CK activadas. Interesantemente, los hepatocitos parecen absorber y almacenar cantidades significativas de TGF- β latente en el citoplasma. Este factor puede activarse y estar disponible tras la inducción del daño y ejercer su efecto profibrogénico en las CEH, primero de forma paracrina y posteriormente por señalización

autocrina¹³⁵. Las CEH comienzan a secretar este factor e inducen la síntesis de Col-1 y otros componentes de la MEC¹⁵⁷. Asimismo, el TGF-β promueve la proliferación y supervivencia de las CEH al activar un complejo llamado AP-1, sinergizando y promoviendo la vía del TGF-β¹⁵⁸. El descubrimiento de compuestos capaces de prevenir la activación de las CEH pudiesen conducir a terapias efectivas para contrarrestar la cirrosis hepática ¹⁵⁵. En este estudio, se encontró que las ratas intoxicadas exhibieron un aumento dramático en la activación de las CEH, según lo determinado por la expresión de la proteína α-SMA. Es de destacar que el tratamiento con stevia previno la transdiferenciación de las CEH bloqueando al TGF-\u00c31. Para explorar m\u00e1s a fondo este fen\u00f3meno, se estudi\u00f3 otras prote\u00e1nas profibrogénicas que están involucradas en la activación de las CEH. La señal del TGF-β se amplifica río abajo por el CTGF, una citoquina fibrogénica muy potente, que está predominantemente presente en las CEH y en los hepatocitos, esta molécula robustece la fibrogénesis de manera dependiente del TGF- β , mejorando la unión del TGF- β a su receptor ^{4,152,155,159,160} o de manera independiente por medio de moléculas como la fibronectina y la Col-1 contribuyendo así a la producción de la MEC¹⁶¹. La señal del CTGF también puede ser regulada a la alza por el NF-KB¹⁶². El CTGF es una proteína secretada por la MEC con una biología muy compleja. Se ha demostrado que modula muchas vías de señalización que conducen a la adhesión y la migración celular, la angiogénesis, la activación, la proliferación y la supervivencia de las CEH y a la deposición de la MEC, que en conjunto lo coloca como el mediador central de la fibrosis ^{130,152,163,164}. Por otro lado, es bien sabido que el PDGF, es un mitógeno crítico en la activación y es el inductor más potente de la proliferación de las CEH ^{152,163}, por consiguiente desempeña un papel importante en la estimulación de la supervivencia y migración de las CEH durante la patogénesis de enfermedades fibróticas 163,165 . De hecho, se ha observado que el agotamiento genético de su receptor, PDGFR β , en las CEH disminuye la lesión y la fibrosis en los modelos in vivo ¹⁶⁶. A este respecto, es importante señalar que, si bien la intoxicación de las ratas indujo la expresión de los factores CTGF y PDGF, el tratamiento con la stevia notablemente inhibió la activación, la proliferación y migración de las CEH, en parte por la disminución de los niveles de CTGF y de PDGF. Por lo tanto, la evidencia en este estudio sugiere fuertemente que las propiedades antifibróticas de la stevia están asociadas, al menos en parte, con la regulación negativa de los factores TGF-β1, PDGF y CTGF.

<u>7.3.2. La stevia previene la activación de las CEH al preservar en valores control a las MMP.</u> Previamente se ha reportado que el hígado cirrótico produce mayores cantidades de MMP $^{167-171}$. Estas enzimas liberan al TGF- β de la MEC, promoviendo así la fibrosis y por lo tanto, a la cirrosis $^{43,93-95}$.

Las MMP requieren para su transcripción a el NF-KB, la IL-1 y la IL-6¹⁶². La MMP13 además de ser un acelerador de la fibrogénesis, es la principal responsable de la activación del CTGF, que como se mencionó induce la fibrogénesis hepática ¹⁷². Por otro lado, las altas actividades proteolíticas de las MMP2 y 9 promueven la disociación de la IL-1β y el TNF-α de la MEC, lo que conduce a la exacerbación del proceso inflamatorio. Asimismo, estas gelatinasas juegan un papel muy importante en el proceso de activación del TGF- β^{100} . Por otra parte, el TNF- α regula al alza a las TIMP-1¹⁷³, que a su vez, se asocia con la activación de las CEH ^{100,174}. Además, la activación de la IL-17A por medio de la IL-6 o el 4-HNE¹⁰⁶, puede aumentar la actividad de las MMP2, MMP9¹³⁷ y la expresión de la Col-1 en las CEH ¹⁴⁸ a través del TGF-β ¹⁴⁹. De acuerdo con este estudio se encontró que la administración crónica del hepatotóxico produjo un aumento de las MMP; en particular, se observó por primera vez que el tratamiento con la stevia preservó los niveles normales de estas MMP. En este escenario complejo, nuestros resultados sugieren que la stevia proporciona una alta actividad antifibrótica al regular negativamente a la IL-17A mediante la posible inhibición de la IL-6, lo que conduce a la represión de la síntesis de colágena por las CEH y a la modulación en la renovación de la MEC, regulando así las vías proinflamatorias y profibrogénicas. Por lo tanto, parece razonable postular que la stevia actúa como un agente antifibrótico, al menos parcialmente, al inhibir estas enzimas y disminuir los niveles de la IL-17A.

7.3.3. La stevia regula al alza a la Smad7, la principal proteína inhibidora de la fibrogénesis, y consecuentemente reduce la deposición de la MEC.

Después de una lesión hepática aguda, se produce la MEC en respuesta a la lesión hepática. Sin embargo, la síntesis del tejido conectivo está regulada negativamente y las MMP degradan las fibras de colágena producidas. Como resultado, la fibrosis no es establecida ^{4,34,175}. Uno de los mecanismos que regulan negativamente el proceso profibrogénico es la producción de la proteína inhibidora Smad7 ^{157,175}. Desafortunadamente, en la lesión hepática crónica, la expresión de la Smad7 disminuye y el desarrollo histológico de los nódulos de

regeneración rodeados por bandas fibrosas es constante ⁹¹. En este contexto, parece que la regulación positiva de la Smad7 es una estrategia adecuada para contrarrestar la progresión de la fibrosis. Los mecanismos por los que la Smad7 opera son: 1) forma complejos estables con el receptor TGF- β tipo 1; 2) promueve la degradación en el proteosoma de los receptores del TGF- β a través de Smurf; 3) se une directamente al ADN para impedir la unión del complejo funcional Smad3/Smad4; 4) compite con la Smad3 activada para unirse a la proteína accesoria co-Smad4; y 5) interacciona directamente con la Smad3 ^{97,176,177}. Además, la Smad7 promueve a la alza al inhibidor del NF- κ B, I κ B ¹⁷⁸. Por lo tanto, es de destacar que, en este estudio el hepatotóxico indujo una regulación negativa significativa de la Smad7, mientras que la stevia reguló positivamente esta molécula antifibrótica. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que otro mecanismo molecular por el cual la stevia muestra importantes efectos antifibróticos es preservando los niveles normales de la Smad7 en las ratas intoxicadas crónicamente con CCl₄ y TAA.

<u>7.3.4. La stevia previene la fibrosis hepática al regular negativamente la ruta no canónica del</u> <u>TGF-β1.</u>

Las quinasas unidas a las membranas, citoplásmicas y nucleares fosforilan diferencialmente a la Smad3 para crear isoformas fosforiladas en la región 'linker' ^{36,179}. Cuando la Smad3 es fosforilada en la región 'linker', se forma la pSmad3L y se produce una señal mitogénica ³⁶, lo que conduce a la proliferación de las CEH activadas y, por lo tanto, la fibrosis aumenta. Estudios recientes han demostrado que la región 'linker' de las proteínas Smad puede ser fosforilada por diversas quinasas, incluidas las proteínas ERK, JNK y p38 ¹⁸⁰. La vía de señalización de las MAPK es una cascada de fosforilación de pasos múltiples que transmite señales desde la superficie de la célula a los objetivos citosólicos y nucleares ¹⁸¹. La fosforilación de las MAPK puede ser promovida por factores como el 4-HNE, el NF- κ B, el TNF- α , la IL-1, la IL-17A, el TGF- β , el CTGF y el PDGF que promueven la activación de las MAPK ^{147,161,182,184,185}. Las MAPK son otra vía de señalización importante en la mediación de la expresión génica proinflamatoria y profibrótica. La proteína pSmad3L además estimula en el núcleo la expresión de c-Myc, un importante inductor de la proliferación de las CEH, que robustece la señal fibrogénica ^{34,36,108,183}. Los experimentos *in vitro* han demostrado que diversos componentes de la stevia como el STV, inhiben de manera

prominente y dosis-dependiente los incrementos en la fosforilación de p38, ERK y JNK ⁵⁵ ¹⁴⁴. Además, tanto el TNF-α, TGF-β y PDGF expresados en las CK, como la IL-17A, expresada en las células T, promueven la activación de las CEH^{185,186,187}. Estos dos eventos, la fosforilación de las MAPK y la activación de las CEH promueven la maquinaria profibrogénica no canónica y canónica en el hígado. Asimismo, las MAPK promueven la expresión de citoquinas proinflamatorias como el TNF- α , la IL-1 β y la IL-6¹⁸⁸. El tratamiento con la stevia evitó eficazmente el aumento de los niveles de proteína Smad3 y la fosforilación de las MAPK, JNK, ERK y p38, por lo tanto, disminuyó la formación de pSmad3L, lo que condujo a la inhibición de la proliferación de las CEH activadas, evitando la deposición de la MEC. ERK es un miembro de la familia de las MAPK que puede mediar la proliferación y migración de las CEH⁴. La señalización del PDGF a través de ERK sirve para perpetuar la activación de las CEH, y estimular la proliferación para aumentar el número de células fibrogénicas hepáticas y promover la migración a otros sitios de lesión ¹⁸⁹. Además, la fosforilación de la Smad3L dependiente de ERK aumenta la síntesis de Col-1 en respuesta al TGF- β^{35} . Por otro lado, JNK es otro miembro de la familia MAPK que se activa con TNF-α, TGF-β, IL-1 y PDGF¹⁹⁰. El 4-HNE también ha demostrado estimular a JNK en las CEH¹⁹¹. La activación de la JNK parece ser crítica para la cascada de señalización implicada en la activación, la proliferación y la migración de las CEH, y contribuye a la producción de proteínas de la MEC a través de la promoción de la vía pSmad3L, que conduce a la enfermedad hepática terminal ^{35,192,190}. Asimismo, se encontró que las ratas intoxicadas crónicamente mostraron un aumento en la fosforilación de pERK, pp38 y pJNK y, por lo tanto, también aumentaron las relaciones pERK/ERK, pp38/p38 y pJNK/JNK, lo que condujo a la activación de la proteína pSmad3L. En particular, se reveló por primera vez que el tratamiento con la stevia previno la activación de estas quinasas y así se conservaron los valores normales de la pSmad3L. Estos resultados sugieren fuertemente que un mecanismo adicional por el cual la stevia interfiere con el proceso fibrótico es a través del bloqueo de la vía de transducción de la señal profibrótica no canónica del TGF-B, evitando así la activación, la proliferación y la migración de las CEH.

8. CONCLUSIÓN

En conclusión, nuestros resultados demuestran por primera vez que la stevia previene la fibrosis hepática experimental en modelos de rata que imitan la enfermedad en el humano ¹⁰², actuando a través de la inhibición de varias vías patológicas que se resumen en la figura 23. Estos hallazgos sugieren que la stevia debería investigarse más como una nueva alternativa para el tratamiento del daño hepático crónico en el humano. Es importante destacar que la stevia tiene un perfil de seguridad razonable, sin embargo, se sugieren más estudios preclínicos y clínicos controlados antes de sugerir su uso en la clínica.



Figura 23. Representación es quemática del efecto multivariable de la stevia sobre la lesión hepática experimental. La stevia puede actuar a diversos niveles para prevenir el establecimiento del daño hepático. El amplio espectro de las actividades exhibidas por la stevia se puede resumir en tres categorías principales: los efectos antioxidantes, los inmunomoduladores y los antifibróticos. Los efectos antioxidantes pueden explicarse por las propiedades directas de eliminación de los radicales libres, al aumentar a: 1) el factor nuclear (eritroide-2) relacionado con el factor 2 (Nrf2), 2) la enzima antioxidante glutatión peroxidasa (GPx) y 3)el glutatión reducido (GSH). Las propiedades in munomoduladoras de la stevia están asociadas con su capacidad para bloquear al factor nuclear kappa B (NF-κB) y, por lo tanto, las citoquinas proinflamatorias. La stevia posee diversos mecanismos antifibróticos que implican la regulación a la baja de la vía canónica del factor de crecimiento tisular beta (TGF-β) y atenúan significativamente la ruta no canónica del TGF-β inhibiendo la fosforilación de las proteínas MAPK, y previniendo la activación de las células estelares hepáticas (CEH) evitando la producción de matriz extracelular (MEC); además, la stevia previene la fibrosis regulando positivamente la proteína inhibidora Smad7. En conjunto, estos efectos conducen a la prevención de la fibrosis experimental.

9. PERSPECTIVAS

Para comprender a profundidad los mecanismos de la stevia en el daño hepático se podrían analizar los componentes aislados de esta planta. Asimismo, se sugeriría diseñar un modelo de daño en donde previamente se establezca el daño para posteriormente probar el efecto farmacológico de los componentes aislados de la stevia. Además, la stevia y sus glucósidos podrían ser una herramienta terapéutica en la clínica en pacientes con NASH, porque representaría un fármaco seguro debido a la clasificación de GRAS por la FDA, pero se requeriría desarrollar un modelo de daño en animales de experimentación, similar a la esteatohepatitis humana y posteriormente probar los compuestos ya mencionados.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Muriel P. The liver: general aspects and epidemiology. In: Muriel P, ed. Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants. Waltham, MA: Elsevier; 2017. p. 3–22. doi:10.1016/B978-0-12-804274-8.00001-1

2. Giannandrea M, Parks WC. Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Dis Model Mech.* 2014;7:193–203.

 Tanimizu N, Mitaka T. Morphogenesis of liver epithelial cells. *Hepatol Res.* 2016;46:964– 976.

4. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. J Clin Invest. 2005;115:209-218.

5. Godoy P, Hewitt NJ, Albrecht U, et al. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol.* 2013;87:1315–1530.

6. Kolios G. Role of Kupffer cells in the pathogenesis of liver disease. *World J Gastroenterol*. 2006;12:7413.

7. Weiskirchen R, Tacke F. Cellular and molecular functions of hepatic stellate cells in inflammatory responses and liver immunology. *Hepatobiliary Surg Nutr.* 2014;3:344–363.

8. Jenne CN, Kubes P. Immune surveillance by the liver. Nat Immunol. 2013;14:996–1006.

9. Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2011;25:195–206.

10. Sarem M, Znaidak R, Macías M, Rey R. Las células estrelladas del hígado: Su importancia en condiciones normales y patológicas. *Gastroenterología y Hepatología*. 2006;29:93–101.

11. Li S, Tan H-Y, Wang N, et al. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int J Mol Sci.* 2015;16:26087–26124.

12. Muriel P, Reyes-Gordillo K. Role of oxidative stress in liver health and disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:1–2.

13. Muriel P, Ramos-Tovar E, Montes-Páez G, Buendía-Montaño LD. Experimental models of liver damage mediated by oxidative stress. In: Muriel P, ed. Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants. Waltham, MA: Elsevier; 2017. p. 529–546. doi:10.1016/B978-0-12-804274-8.00040-0

14. Liedtke C, Luedde T, Sauerbruch T, et al. Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2013;6:1–24.

15. Wallace M, Hamesch K, Lunova M, et al. Standard operating procedures in experimental liver research: thioacetamide model in mice and rats. *Lab Anim*. 2015;49:21–29.

16. Siow RCM, Ishii T, Mann GE. Modulation of antioxidant gene expression by 4hydroxynonenal: atheroprotective role of the Nrf2/ARE transcription pathway. *Redox Rep.* 2007;12:11–15.

17. Arauz J, Ramos-Tovar E, Muriel P. Redox state and methods to evaluate oxidative stress in liver damage: From bench to bedside. *Ann Hepatol*. 2016;15:160–173.

18. Ramos-Tovar E, Hernández-Aquino E, Casas-Grajales S, et al. Stevia prevents acute and chronic liver injury induced by carbon tetrachloride by blocking oxidative stress through Nrf2 upregulation. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:12.

19. Ramos-Tovar E, Muriel P. Stevia as a putative hepatoprotector. In: Muriel P, ed. Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants. Waltham, MA: Elsevier; 2017. p. 715–727. doi:10.1016/B978-0-12-804274-8.00051-5

20. Sarkar FH, Li Y, Wang Z, Kong D. NF-κB signaling pathway and its therapeutic implications in human diseases. *Int Rev Immunol*. 2008;27:293–319.

21. Ren H, Wang Z, Zhang S, et al. IL-17A promotes the migration and invasiveness of colorectal cancer cells through NF-κB-mediated MMP expression. *Oncol Res Featur Preclin Clin Cancer Ther*. 2016;23:249–256.

22. Xu F, Liu C, Zhou D, Zhang L. TGF-β/SMAD pathway and its regulation in hepatic fibrosis. *J Histochem Cytochem*. 2016;64:157–167.

23. Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. *Compr Physiol*. 2013;3:1473–1492.

24. Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobin LH. The morphology of cirrhosis: definition, nomenclature, and classification. *Bull World Health Organ*. 1977;55:521–540.

25. Laennec RTH. Traité de l'auscultation médiate, et des maladies des poumons et du coeur. Société Typographique Belge; 1837.

26. Chagoya de Sánchez V, Suárez-Cuenca JA, Hernández-Muñoz R. IV. Nuevo fármaco para el tratamiento de la cirrosis. *Gac Med Mex.* 2007;143:1–7.

27. Fullár A, Firneisz G, Regős E, et al. Response of hepatic stellate cells to TGFB1 differs from the response of myofibroblasts. Decorin protects against the action of growth factor. *Pathol Oncol Res.* 2016;23:287–294.

28. Gressner AM. Transdifferentiation of hepatic stellate cells (Ito cells) to myofibroblasts: A key event in hepatic fibrogenesis. *Kidney Int.* 1996;54:S39–S45.

29. Novo E, Valfrè di Bonzo L, Cannito S, Colombatto S, Parola M. Hepatic myofibroblasts: A heterogeneous population of multifunctional cells in liver fibrogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009;41:2089–2093.

30. Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*. 2008;134:1655–1669.

31. Aldaba-Muruato LR, Moreno Gil M, Shibayama M, Tsutsumi V, Muriel P. Protective effects of allopurinol against acute liver damage and cirrhosis induced by carbon tetrachloride: modulation of NF-κB, cytokine production and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1820:65–75.

32. Bauvois B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: Outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochim Biophys*

Acta. 2012;1825:29-36.

33. Verrecchia F, Chu M-L, Mauviel A. Identification of novel TGF- β /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. *J Biol Chem.* 2001;276:17058–17062.

34. Yoshida K, Matsuzaki K. Differential regulation of TGF- β /Smad signaling in hepatic stellate cells between acute and chronic liver injuries. *Front Physiol*. 2012;3:1–7.

35. Matsuzaki K. Smad phosphoisoform signals in acute and chronic liver injury: similarities and differences between epithelial and mesenchymal cells. *Cell Tissue Res.* 2012;347:225–243.

36. Matsuzaki K. Smad phospho-isoforms direct context-dependent TGF-β signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013;24:385–399.

37. Kamato D, Burch ML, Piva TJ, et al. Transforming growth factor- β signalling: Role and consequences of Smad linker region phosphorylation. *Cell Signal*. 2013;25:2017–2024.

38. Dooley S, Hamzavi J, Breitkopf K, et al. Smad7 prevents activation of hepatic stellate cells and liver fibrosis in rats. *Gastroenterology*. 2003;125:178–191.

39. Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology*. 2016;64:73–84.

40. Goldberg D, Ditah IC, Saeian K, et al. Changes in the prevalence of hepatitis C virus infection, nonalcoholic steatohepatitis, and alcoholic liver disease among patients with cirrhosis or liver failure on the waitlist for liver transplantation. *Gastroenterology*. 2017;152:1090–1099.

41. Gómez-Dantés H, Fullman N, Lamadrid-Figueroa H, et al. Dissonant health transition in the states of Mexico, 1990–2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2016;388:2386–2402.

42. Mokdad A, López A, Shahraz S, et al. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *BMC Med*. 2014;12:1–24.

43. Zhang C-Y, Yuan W-G, He P, Lei J-H, Wang C-X. Liver fibrosis and hepatic stellate cells: etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets. *World J Gastroenterol*. 2016;22:10512–10522.

44. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2012;380:2095–2128.

45. Gaweł-Bęben K, Bujak T, Nizioł-Łukaszewska Z, et al. Stevia rebaudiana Bert. leaf extracts as a multifunctional source of natural antioxidants. *Molecules*. 2015;20:5468–5486.

46. Kim I, Yang M, Lee O, Kang S. The antioxidant activity and the bioactive compound content of Stevia rebaudiana water extracts. *Food Sci Technol*. 2011;44:1328–1332.

47. Muanda FN, Soulimani R, Diop B, Dicko A. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from Stevia rebaudiana Bertoni leaves. *Food Sci Technol.* 2011;44:1865–1872.

48. Vaško L, Vašková J, Fejerčáková A, Mojžišová G, Poráčová J. Comparison of some antioxidant properties of plant extracts from Origanum vulgare, Salvia officinalis, Eleutherococcus senticosus and Stevia rebaudiana. *Vitr Cell Dev Biol Anim.* 2014;50:614–622.

49. Shivanna N, Naika M, Khanum F, Kaul VK. Antioxidant, anti-diabetic and renal protective properties of Stevia rebaudiana. *J Diabetes Complications*. 2013;27:103–113.

50. Singh S, Garg V, Yadav D. Antihyperglycemic and antioxidative ability of Stevia rebaudiana (Bertoni) leaves in diabetes induced mice. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2013;5:297–302.

51. Ghanta S, Banerjee A, Poddar A, Chattopadhyay S. Oxidative DNA damage preventive activity and antioxidant potential of Stevia rebaudiana (Bertoni) Bertoni, a natural sweetener. *J Agric Food Chem.* 2007;55:10962–10967.

52. Paul S, Sengupta S, Bandyopadhyay T, Bhattacharyya A. Stevioside induced ROSmediated apoptosis through mitochondrial pathway in human breast cancer cell line MCF-7. *Nutr Cancer*. 2012;64:1087–1094. 53. Wang Z, Xue L, Guo C, et al. Stevioside ameliorates high-fat diet-induced insulin resistance and adipose tissue inflammation by downregulating the NF-κB pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;417:1280–1285.

54. Boonkaewwan C, Burodom A. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of stevioside and steviol on colonic epithelial cells. *J Sci Food Agric*. 2013;93:3820–3825.

55. Fengyang L, Yunhe F, Bo L, et al. Stevioside suppressed inflammatory cytokine secretion by downregulation of NF-κB and MAPK signaling pathways in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Inflammation*. 2012;35:1669–1675.

56. Potočnjak I, Broznić D, Kindl M, Kropek M, Vladimir-Knežević S, Domitrović R. Stevia and stevioside protect against cisplatin nephrotoxicity through inhibition of ERK1/2, STAT3, and NF-κB activation. *Food Chem Toxicol*. 2017;107:215–225.

57. Latha S, Chaudhary S, Ray RS. Hydroalcoholic extract of Stevia rebaudiana Bert. leaves and stevioside ameliorates lipopolysaccharide induced acute liver injury in rats. *Biomed Pharmacother*. 2017;95:1040–1050.

58. Das K, Kathiriya AK. Hepatoprotective activity of Stevia rebaudiana Bert. leaves against thioacetamide induced toxicity. *Turkish J Pharm Sci.* 2012;9:343–352.

59. Aranda-González I, Barbosa-Martín E, Toraya-Avilés R, Segura-Campos M, Moguel-Ordóñez Y, Betancur-Ancona D. Safety assessment of stevia rebaudiana Bertoni grown in southeastern Mexico as food sweetener. *Nutr Hosp.* 2014;30:594–601.

60. Segura-Campos M, Barbosa-Martín E, Matus-Basto Á, et al. Comparison of chemical and functional properties of Stevia rebaudiana (Bertoni) varieties cultivated in Mexican Southeast. *Am J Plant Sci.* 2014;5:286–293.

61. Aranda-González I, Moguel-Ordóñez Y, Betancur-Ancona D. Determination of rebaudioside A and stevioside in leaves of S. rebaudiana Bertoni grown in Mexico by a validated HPLC method. *Am J Anal Chem.* 2015;06:878–885.

62. Moguel-Ordóñez YB, Cabrera-Amaro DL, Segura-Campos MR, Ruiz-Ruiz JC. Studies on drying characteristic, nutritional composition, and antioxidant properties of Stevia rebaudiana (Bertoni) leaves. *Int Agrophysics*. 2015;29:323–331.

63. Ruiz-Ruiz JC, Moguel-Ordóñez YB, Matus-Basto AJ, Segura-Campos MR. Antidiabetic and antioxidant activity of Stevia rebaudiana extracts (Var. Morita) and their incorporation into a potential functional bread. *J Food Sci Technol*. 2015;52:7894–7903.

64. Berger L, Rudolph G. Alkaline and acid phosphatase. *Stand Methods Clin Chem*. 1963;5:56–73.

65. Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol*. 1957;28:56–63.

66. Glossmann H, Neville DM. γ-Glutamyltransferase in kidney brush border membranes. *FEBS Lett.* 1972;19:340–344.

67. Pearlman FC, Lee RT. Detection and measurement of total bilirubin in serum, with use of surfactants as solubilizing agents. *Clin Chem.* 1974;20:447–453.

68. Seifter S, Dayton S. The estimation of glycogen with the anthrone reagent. *Arch Biochem*. 1950;25:191–200.

69. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979;95:351–358.

70. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;25:248–254.

71. Tecles F, Gutiérrez-Panizo C, Martínez-Subiela S, Bolio M, Parra M. Comparación de la 2,2'-ditiodipiridina y el ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico en la determinación de colinesterasa en sangre de perro. *Ann Vet.* 2000;16:41–53.

72. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 1976;74:214–226.

73. Rojkind M, González E. An improved method for determining specific radioactivities of proline-14C and hydroxyproline-14C in collagen and in noncollagenous proteins. *Anal Biochem.* 1974;57:1–7.

74. Suvik A, Effendy A. The use of modified Masson 's trichrome staining in collagen evaluation in wound healing study. *Malaysian J Vet Res.* 2012;3:39–47.

75. Fischer A, Jacobson K, Rose J, Zeller R. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Cold Spring Harb Protoc*. 2008;3:4986.

76. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985;150:76–85.

77. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;9:671–675.

78. Livak F, Schatz DG. T-cell receptor alpha locus V(D)J recombination by-products are abundant in thymocytes and mature T cells. *Mol Cell Biol*. 1996;16:609–618.

79. Rosen H, Keefe E. Evaluation of abnormal liver enzymes, use of liver test, and the serology of viral hepatitis. In: Bacon BR, Bisceglie AM Di, eds. Liver disease diagnosis and management. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone; 2000. p. 24–35.

80. Manibusan MK, Odin M, Eastmond DA. Postulated carbon tetrachloride mode of action: A review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2007;25:185–209.

81. Muriel P, Deheza R. Fibrosis and glycogen stores depletion induced by prolonged biliary obstruction in the rat are ameliorated by metadoxine. *Liver Int*. 2003;23:262–268.

82. Muriel P. Role of free radicals in liver diseases. *Hepatol Int.* 2009;3:526–536.

83. Thuy le TT, Thuy TTV, Hai H, Kawada N. Role of oxidative and nitrosative stress in hepatic fibrosis. In: Muriel P, ed. Liver Pathophysiology. Waltham, MA: Elsevier; 2017. p. 213–224. doi:10.1016/B978-0-12-804274-8.00016-3

84. Carillon J, Rouanet J-M, Cristol J-P, Brion R. Superoxide dismutase administration, a potential therapy against oxidative stress related diseases: several routes of supplementation and proposal of an original mechanism of action. *Pharm Res.* 2013;30:2718–2728.

85. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and Biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol and Med.* 1991;11:81–128.

86. Zarkovic N. 4-Hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Mol Aspects Med.* 2003;24:281–291.

87. Kim KM, Ki SH. Nrf2: a key regulator of redox signaling in liver diseases. In: Muriel P,

ed. Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants. Waltham, MA: Elsevier; 2017. p. 355–374. doi:10.1016/B978-0-12-804274-8.00028-X

88. Surh YJ, Kundu JK, Na HK. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. *Planta Med.* 2008;74:1526–1539.

89. Muriel P. NF-kappaB in liver diseases: a target for drug therapy. *J Appl Toxicol*. 2009;29:91–100.

90. Fukui H. Cytokines in hepatic injury. In: Muriel P, ed. Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants. Waltham, MA: Elsevier; 2017. p. 341–354. doi:10.1016/B978-0-12-804274-8.00027-8

91. Schuppan D, Afdhal NH, Israel B. Liver cirrhosis. Lancet. 2008;371:838-851.

92. Paradis V, Dargere D, Bonvoust F, Vidaud M, Segarini P, Bedossa P. Effects and regulation of connective tissue growth factor on hepatic stellate cells. *Lab Investig*. 2002;82:767–774.

93. Olaso E, Ikeda K, Eng FJ, et al. DDR2 receptor promotes MMP-2-mediated proliferation and invasion by hepatic stellate cells. *J Clin Invest*. 2001;108:1369–1378.

94. Hemmann S, Graf J, Roderfeld M, Roeb E. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - A systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol*. 2007;46:955–975.

95. Hayashi H, Sakai T. Biological significance of local TGF-β activation in liver diseases. *Front Physiol*. 2012;3:12.

96. Hermenean A, Ardelean A, Stan M, et al. Antioxidant and hepatoprotective effects of naringenin and its β -cyclodextrin formulation in mice intoxicated with carbon tetrachloride: A comparative study. *J Med Food*. 2014;17:670–677.

97. Imamura T, Oshima Y, Hikita A. Regulation of TGF- β family signalling by ubiquitination and deubiquitination. *J Biochem*. 2013;154:481–489.

98. Yoshida K, Murata M, Yamaguchi T, Matsuzaki K, Okazaki K. Reversible human TGF-

 β signal shifting between tumor suppression and fibro-carcinogenesis: implications of Smad phospho-isoforms for hepatic epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Med.* 2016;5:1–19.

99. Meng F, Wang K, Aoyama T, et al. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. *Gastroenterology*. 2012;143:765–776.

100. Duarte S, Baber J, Fujii T, Coito AJ. Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis. *Matrix Biol*. 2015;44:147–156.

101. Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J Clin Invest*. 2007;117:524–529.

102. Pérez-Tamayo R. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl4 an adequate model of human cirrhosis? *Hepatology*. 1983;3:112–120.

103. Liu F, Chen L, Rao H-Y, et al. Automated evaluation of liver fibrosis in thioacetamide, carbon tetrachloride and bile duct ligation rodent models using second-harmonic generation/two-photon excited fluorescence microscopy. *Lab Investig.* 2017;97:84–92.

104. Thapa BR, Walia A. Liver function tests and their interpretation. *Indian J Pediatr*. 2007;74:663–671.

105. Hoekstra LT, de Graaf W, Nibourg GAA, et al. Physiological and biochemical basis of clinical liver function tests. *Ann Surg*. 2013;257:27–36.

106. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:31.

107. Hirano A, Kaplowitz N, Tsukamoto H, Kamimura S, Fernández-Checa JC. Hepatic mitochondrial glutathione depletion and progression of experimental alcoholic liver disease in rats. *Hepatology*. 1992;16:1423–1427.

108. Yoshida K, Matsuzaki K, Mori S, et al. Transforming growth factor-beta and plateletderived growth factor signal via c-Jun N-terminal kinase-dependent Smad2/3 phosphorylation in rat hepatic stellate cells after acute liver injury. *Am J Pathol.* 2005;166:1029-1039.

109. Ma Q. Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications. *Pharmacol Ther*. 2010;125:376–393.

110. Shin SM, Yang JH, Ki SH. Role of the Nrf2-ARE pathway in liver diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:9.

111. Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Rev Neurosci.* 2004;10:S18–S25.

112. Haigis MC, Yankner BA. The aging stress response. Mol Cell. 2010;40:333–344.

113. Paravicini T, Touyz R. Redox signaling in hypertension. *Cardiovasc Res.* 2006;71:247–258.

114. Shukla V, Mishra SK, Pant HC. Oxidative stress in neurodegeneration. *Adv Pharmacol Sci.* 2011;2011:1–13.

115. Casas-Grajales S, Muriel P. The liver, oxidative stress and antioxidants. In: Muriel P, ed. Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants. Waltham, MA: Elsevier; 2017. p. 583–604.

116. Ceni E, Mello T, Galli A. Pathogenesis of alcoholic liver disease: role of oxidative metabolism. *World J Gastroenterol*. 2014;20:17756–17772.

117. Zhong H, Yin H. Role of lipid peroxidation derived 4-hydroxynonenal (4-HNE) in cancer: Focusing on mitochondria. *Redox Biol*. 2015;4:193–199.

118. Andringa KK, Udoh US, Landar A, Bailey SM. Proteomic analysis of 4hydroxynonenal (4-HNE) modified proteins in liver mitochondria from chronic ethanol-fed rats. *Redox Biol.* 2014;2:1038–1047.

119. Luckey SW, Petersen DR. Activation of kupffer cells during the course of carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in rats. *Exp Mol Pathol*. 2001;71:226–240.

120. Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of liver injury. I. TNF-α-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Liver Physiol*. 2006;290:G583–G589.

121. Girish C, Pradhan SC. Herbal drugs on the liver. In: Muriel P, ed. Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants. Waltham, MA: Elsevier; 2017. p. 605–620.

122. Vázquez-Flores LF, Casas-Grajales S, Hernández-Aquino E, Vargas-Pozada EE, Muriel
P. Antioxidant, antiinflammatory, and antifibrotic properties of quercetin in the liver. In:
Muriel P, ed. Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants. Waltham, MA: Elsevier;
2017. p. 653–674.

123. Assaei R, Mokarram P, Dastghaib S, et al. Hypoglycemic effect of aquatic extract of stevia in pancreas of diabetic rats: PPARγ-dependent regulation or antioxidant potential. *Avicenna J Med Biotechnol*. 8:65–74.

124. Mathers J, Fraser JA, McMahon M, Saunders RDC, Hayes JD, McLellan LI. Antioxidant and cytoprotective responses to redox stress. *Biochem Soc Symp.* 2004;157–176. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15777020

125. Kobayashi M, Yamamoto M. Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7:385–394.

126. Chan JY, Kwong M. Impaired expression of glutathione synthetic enzyme genes in mice with targeted deletion of the Nrf2 basic-leucine zipper protein. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1517:19–26.

127. Wang Y, Li L, Wang Y, et al. New application of the commercial sweetener rebaudioside as a hepatoprotective candidate: induction of the Nrf2 signaling pathway. *Eur J Pharmacol.* 2018;822:128–137.

128. Esmaeili MA, Alilou M. Naringenin attenuates CCl₄ -induced hepatic inflammation by the activation of an Nrf2-mediated pathway in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2014;41:416–22.

129. Novo E, Busletta C, Bonzo LV di, et al. Intracellular reactive oxygen species are required for directional migration of resident and bone marrow-derived hepatic profibrogenic cells. *J Hepatol*. 2011;54:964–974.

130. Novo E, Parola M. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2008;1:1–58.

131. Uchida K, Shiraishi M, Naito Y, Torii Y, Nakamura Y, Osawa T. Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. *J Biol Chem*. 1999;274:2234–2242.

132. Karin M, Lin A. NF-κB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*. 2002;3:221–227.

133. Cao S, Zhang X, Edwards JP, Mosser DM. NF-κB1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem*. 2006;281:26041–26050.

134. Afonina IS, Zhong Z, Karin M, Beyaert R. Limiting inflammation—the negative regulation of NF-κB and the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol*. 2017;18:861–869.

135. Dooley S, Dijke ten P. TGF- β in progression of liver disease. *Cell Tissue Res.* 2012;347:245–256.

136. Ben-Neriah Y, Karin M. Inflammation meets cancer, with NF-κB as the matchmaker. *Nat Immunol*. 2011;12:715–723.

137. Pires B, Silva R, Ferreira G, Abdelhay E. NF-kappaB: two sides of the same coin. *Genes*.2018;9:24.

138. Diehl A. Cytokine regulation of liver injury and repair. *Immunol Rev.* 2000;174:160–171.

139. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-κB - A pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*. 1997;336:1066–1071.

140. Tak PP, Firestein GS. NF-κB: A key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*. 2001;107:7–11.

141. Han D, Ybanez MD, Ahmadi S, Yeh K, Kaplowitz N. Redox regulation of tumor necrosis factor signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11:2245–2263.

142. Lingappan K. NF-κB in oxidative stress. Curr Opin Toxicol. 2018;7:81-86.

143. Li N, Karin M. Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress? *FASEB J*. 1999;13:1137–1143.

144. Wang T, Guo M, Song X, et al. Stevioside plays an anti-inflammatory role by regulating the NF-κB and MAPK pathways in S. aureus-infected mouse mammary glands. *Inflammation*. 2014;37:1837–1846.

145. Bayat E, Dastgheib S, Egdar S, Mokarram P. Effect of the aquatic extract of stevia on the serum level of interleukin-6 in streptozotocin-nicotinamide induced diabetic rats. *Shiraz E-Medical J*. 2017;18.

146. Cho BO, Ryu HW, So Y, et al. Anti-inflammatory effect of austroinulin and 6-O-acetylaustroinulin from Stevia rebaudiana in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol*. 2013;62:638–644.

147. Luedde T, Schwabe RF. NF-κB in the liver-linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;8:108–118.

148. Higashi T, Friedman SL, Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017;121:27–42.

149. Cannito S, Novo E, Parola M. Therapeutic pro-fibrogenic signaling pathways in fibroblasts. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017;121:57–84.

150. Yu M, Li H, Liu Q, et al. Nuclear factor p65 interacts with Keap1 to repress the Nrf2-ARE pathway. *Cell Signal*. 2011;23:883–892.

151. Dible JH. Degeneration, necrosis, and fibrosis in the liver. Br Med J. 1951;1:839-841.

152. Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest*. 2007;117:539–548.

153. Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, et al. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med*. 2007;13:1324–1332.

154. Gressner OA, Lahme B, Siluschek M, et al. Activation of TGF- β within cultured hepatocytes and in liver injury leads to intracrine signaling with expression of connective tissue growth factor. *J Cell Mol Med*. 2008;12:2717–2730.

155. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14:397–411.

156. Cheng K, Yang N, Mahato RI. TGF-β1 gene silencing for treating liver fibrosis. *Mol Pharm*. 2009;6:772–779.

157. Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci.* 2002;7:793–807.

158. Yamamura Y, Hua X, Bergelson S, Lodish HF. Critical role of Smads and AP-1 complex in transforming growth factor- β -dependent apoptosis. *J Biol Chem*. 2000;275:36295–36302.

159. Gressner OA, Gressner AM. Connective tissue growth factor: A fibrogenic master switch in fibrotic liver diseases. *Liver Int*. 2008;28:1065–1079.

160. Rachfal A. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in hepatic fibrosis. *Hepatol Res.* 2003;26:1–9.

161. Sakai K, Jawaid S, Sasaki T, Bou-Gharios G, Sakai T. Transforming growth factor- β independent role of connective tissue growth factor in the development of liver fibrosis. *Am J Pathol.* 2014;184:2611–2617.

162. Wu S-H, Lu C, Dong L, Chen Z-Q. Signal transduction involved in CTGF-induced production of chemokines in mesangial cells. *Growth Factors*. 2008;26:192–200.

163. Elpek GÖ. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update. *World J Gastroenterol*. 2014;20:7260–7276.

164. Lipson KE, Wong C, Teng Y, Spong S. CTGF is a central mediator of tissue remodeling and fibrosis and its inhibition can reverse the process of fibrosis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2012;5:S24–S31.

165. Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine and Growth Factor Rev.* 2004;15:255–273.

166. Kocabayoglu P, Lade A, Lee YA, et al. β -PDGF receptor expressed by hepatic stellate cells regulates fibrosis in murine liver injury, but not carcinogenesis. *J Hepatol*. 2015;63:141–147.

167. Arauz J, Rivera-Espinoza Y, Shibayama M, Favari L, Flores-Beltrán RE, Muriel P.

Nicotinic acid prevents experimental liver fibrosis by attenuating the prooxidant process. *Int Immunopharmacol.* 2015;28:244–251.

168. Pérez-Vargas JE, Zarco N, Vergara P, et al. L-Theanine prevents carbon tetrachlorideinduced liver fibrosis via inhibition of nuclear factor κ B and down-regulation of transforming growth factor β and connective tissue growth factor. *Hum Exp Toxicol*. 2016;35:135–146.

169. Casas-Grajales S, Vázquez-Flores LF, Ramos-Tovar E, et al. Quercetin reverses experimental cirrhosis by immunomodulation of the proinflammatory and profibrotic processes. *Fundam Clin Pharmacol*. 2017;31:610–624.

170. Hernández-Aquino E, Zarco N, Casas-Grajales S, et al. Naringenin prevents experimental liver fibrosis by blocking TGFβ-Smad3 and JNK-Smad3 pathways. *World J Gastroenterol*. 2017;23:4354.

171. Arthur MJ, Mann DA, Iredale JP. Tissue inhibitors of metalloproteinases, hepatic stellate cells and liver fibrosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 1998;13:S33–S38.

172. George J, Tsutsumi M, Tsuchishima M. MMP-13 deletion decreases profibrogenic molecules and attenuates N -nitrosodimethylamine-induced liver injury and fibrosis in mice. *J Cell Mol Med*. 2017;21:3821–3835.

173. Kurzepa J, Mdro A, Czechowska G, et al. Role of MMP-2 and MMP-9 and their natural inhibitors in liver fibrosis, chronic pancreatitis and non-specific inflammatory bowel diseases. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int.* 2014;13:570–579.

174. Iredale JP, Pellicoro A, Fallowfield JA. Liver fibrosis: understanding the dynamics of bidirectional wound repair to inform the design of markers and therapies. *Dig Dis*. 2017;35:310–313.

175. Dooley S, Hamzavi J, Ciuclan L, et al. Hepatocyte-specific Smad7 expression attenuates TGF-β–mediated fibrogenesis and protects against liver damage. *Gastroenterology*. 2008;135:642–659.

176. Liu T, Feng X-H. Regulation of TGF- β signalling by protein phosphatases. *Biochem J*. 2010;430:191–198.

177. Yan X, Liao H, Cheng M, et al. Smad7 protein interacts with receptor-regulated Smads (R-Smads) to inhibit transforming growth factor- β (TGF- β)/Smad signaling. *J Biol Chem*. 2016;291:382–392.

178. Yan X, Liu Z, Chen Y. Regulation of TGF- signaling by Smad7. *Acta Biochim Biophys*. 2009;41:263–272.

179. Li Q, Liu G, Yuan H, et al. Mucin1 shifts Smad3 signaling from the tumor-suppressive pSmad3C/p21WAF1 pathway to the oncogenic pSmad3L/c-Myc pathway by activating JNK in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget*. 2015;6:4253–4265.

180. Ozaki I, Hamajima H, Matsuhashi S, Mizuta T. Regulation of TGF-B1-induced proapoptotic signaling by growth factor receptors and extracellular matrix receptor integrins in the liver. *Front Physiol*. 2011;2:1–8.

181. Marra F, Arrighi MC, Fazi M, et al. Extracellular signal-regulated kinase activation differentially regulates platelet-derived growth factor's actions in hepatic stellate cells, and is induced by *in vivo* liver injury in the rat. *Hepatology*. 1999;30:951–958.

182. Borkham-Kamphorst E, Weiskirchen R. The PDGF system and its antagonists in liver fibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016;28:53–61.

183. Kisseleva T, Xu J, Liu X, Brenner D. Novel perspectives on the origins of the hepatic myofibroblasts. *Cell Health Cytoskelet*. 2015;2015:111–116.

184. Rao KM. MAP kinase activation in macrophages. J Leukoc Biol. 2001;69:3-10.

185. Wynn T, Barron L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis.* 2010;30:245–257.

186. Bissell DM, Wang SS, Jarnagin WR, Roll FJ. Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J Clin Invest*. 1995;96:447–455.

187. Sprenger H, Kaufmann A, Garn H, Lahme B, Gemsa D, Gressner A. Induction of neutrophil-attracting chemokines in transforming rat hepatic stellate cells. *Gastroenterology*. 1997;113:277–285.

188. Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy-from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1754:253–262.

189. Mann DA, Marra F. Fibrogenic signalling in hepatic stellate cells. *J Hepatol*. 2010;52:949–950.

190. Seki E, Brenner DA, Karin M. A liver full of JNK: signaling in regulation of cell function and disease pathogenesis, and clinical approaches. *Gastroenterology*. 2012;143:307–320.

191. Parola M, Robino G, Marra F, et al. HNE interacts directly with JNK isoforms in human hepatic stellate cells. *J Clin Invest*. 1998;102:1942–1950.

192. Hong IH, Park SJ, Goo MJ, et al. JNK1 and JNK2 regulate α -SMA in hepatic stellate cells during CCl₄ -induced fibrosis in the rat liver. *Pathol Int*. 2013;63:483–491.