



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

Efectos de la cafeína y el ácido acetilsalicílico en el
daño hepático experimental.

Tesis

Que para obtener el grado de:
Maestría en Ciencias de la salud

Presenta

QFB. Jazmin Loera Ramos

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Jonathan I. Arauz Cabrera

Mexicali, Baja California.

Octubre, 2019

INDICE

1. ABSTRACT.....	1
2. RESUMEN.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1. Generalidades del hígado.....	3
3.2. Lobulillo hepático.....	4
3.3. Tipos celulares.....	6
3.3.1. Células parenquimatosas.....	6
3.3.2. Células no parenquimatosas.....	6
3.3.3. Células endoteliales.....	7
3.3.4. Células de Kupffer.....	7
3.3.5. Células de Pit.....	7
3.3.6. Células estelares (HSC).....	8
3.4. Funciones principales del hígado.....	9
4. DAÑO HEPÁTICO.....	10
4.1. Fibrosis y Cirrosis.....	10
4.2. Daño hepático y TGF- β	12
4.3. El papel del estrés oxidativo en el daño hepático.....	13
4.4. Mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo.....	14
4.4.1. Antioxidantes enzimáticos.....	14
4.4.2. Antioxidantes no enzimáticos.....	15
4.5. La cafeína y las enfermedades hepáticas.....	17
4.6. Ciclooxygenasas en el daño hepático.....	18
4.7. Ácido acetilsalicílico.....	19
5. MODELOS EXPERIMENTALES DE DAÑO HEPÁTICO.....	20
5.1. Modelo de Tioacetamida (TAA).....	21
6. PLANTEAMIENTO DEL PROBELMA Y JUSTIFICACIÓN.....	22
7. HIPÓTESIS.....	24
8. OBJETIVOS.....	24
8.1. Objetivo general.....	24
8.2. Objetivos específicos.....	24
9. METODOLOGIA.....	25
9.1. Procedimiento experimental.....	25
9.2. Actividad de alanino aminotransferasa (ALT).....	27
9.3. Determinación de la actividad de la gamma glutamil transpeptidasa (γ -GTP).....	27
9.4. Determinación de fosfatasa alcalina (FA).....	28
9.5. Determinación de glucógeno hepático.....	28
9.6. Determinación del grado de peroxidación lipídica.....	29
9.7. Determinación de proteínas por el método de Bradford.....	29

9.8. Determinación de glutatión reducido (GSH)	29
9.9. Determinación del contenido de colágena (Hidroxi prolina).....	30
9.10. Histologías.....	31
9.11. Western Blot de las citocinas: TGF- β , α -SMA, IL-10, COX-2.....	32
9.12. Análisis estadístico.....	33
10. RESULTADOS.....	34
10.1. Actividad enzimática de ALT.....	34
10.2. Actividad enzimática de FA y γ -GTP.....	35
10.3. Contenido de glucógeno hepático.....	36
10.4. Peroxidación lipídica.....	37
10.5. Contenido de GSH.....	38
10.6. Contenido de colágena.....	39
10.7. Histologías de H&E y Tricromica.....	40
10.8. Expresión de la citocina TGF- β	42
10.9. Expresión de la citocina α -SMA.....	43
10.10. Expresión de la citocina IL-10.....	44
10.11. Expresión de COX-2.....	45
11. DISCUSIÓN.....	46
12. CONCLUSIONES.....	51
13. BIBLIOGRAFIA.....	52

Este trabajo se realizó en el Departamento de Farmacología, pertenece a la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Baja California, bajo la tutoría del Doctor Jonathan Isaac Arauz Cabrera. Se contó además con una beca del CONACYT para estudios de posgrado con la clave de registro: 757219.

1. ABSTRACT

Several studies have shown that caffeine and acetylsalicylic acid (ASA) have hepatoprotective properties; both drugs in turn decrease liver enzymes and reduce the risk of developing a chronic liver disease such as cirrhosis. However, they have not been able to avoid hepatic fibrosis establishment by themselves. The aim of this study was to evaluate the hepatoprotective properties of caffeine and the concomitant use of ASA in a model of liver damage induced by the chronic administration of thioacetamide (TAA) in male Wistar rats. Chronic damage was induced by TAA 200 mg/kg (ip), three times a weekly for 8 weeks, concomitantly on a daily basis caffeine was administered orally in 20 mg/kg, ASA was administered at a dose of 100 mg/kg in a similar way. Caffeine and ASA were administered separately, together, and their respective controls on a daily basis. Liver injury was assessed by serological analysis, glycogen and collagen content, as well as Hematoxylin and Eosin (H&E) and Masson's stains. Oxidative stress was evaluated by lipid peroxidation and glutathione (GSH). Whole liver lysates were analyzed for COX-2, TGF- β , α -SMA and IL-10 by Western blot. TAA administration elevated serum alkaline phosphatase, γ -glutamyl transpeptidase and alanine aminotransferase, liver lipid peroxidation, collagen content and depleted liver glycogen and glutathione. Additionally there were increased expressions of proteins: TGF- β , α -SMA, IL-10 and COX-2. Histopathological analysis was in agreement with biochemical and molecular findings. Administration of caffeine suppressed most of the changes produced by TAA, this results indicate that caffeine prevents experimental cirrhosis; the action mechanisms are probably associated to its antioxidant properties and mainly by its ability of blocking the profibrogenic cytokine TGF- β . Interestingly, the treatment with ASA showed beneficial effects due to its anti-inflammatory properties and the inhibition of COX-2, consequently it reduces the overexpression of TGF- β which results in a reduction in the activation of the hepatic stellate cells (HSC). The use of the combination drugs showed a protective effect against chronic damage, however, no synergism or significant difference was observed comparing with each of the drugs separately.

2. RESUMEN

Diversas investigaciones muestran que tanto la cafeína como el ácido acetil salicílico (AAS) poseen propiedades hepatoprotectoras, ambos fármacos por su parte disminuyen las enzimas hepáticas y reducen el riesgo de desarrollar una enfermedad hepática crónica como cirrosis. Sin embargo, por si solos no han evitado el establecimiento de la fibrosis hepática. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la cafeína y el uso concomitante del AAS en un modelo de daño hepático inducido por la administración crónica de tioacetamida (TAA) en ratas Wistar macho. El daño crónico se indujo por la administración de 200 mg/Kg de TAA vía i.p. cada tercer día durante 8 semanas, concomitantemente de manera diaria se administró cafeína en una dosis de 20 mg/Kg v.o., de forma similar se administró el AAS a una dosis de 100 mg/Kg. La cafeína y el ácido acetil salicílico fueron administrados por separado, en conjunto, y sus respectivos controles. El daño hepático fue determinado por la cuantificación de enzimas serológicas, glucógeno y contenido de colágeno, así como tinciones de hematoxilina-eosina y de Masson. El estrés oxidativo fue evaluado por peroxidación lipídica y glutatión. Por medio Western Blot se midió la expresión de TGF- β , α SMA, IL-10 y COX-2. La administración crónica de TAA aumentó los niveles de las enzimas ALT, γ -GTP y FA, en hígado se muestra un aumento de la peroxidación lipídica y del contenido de colágena, así como una disminución del glucógeno y la declinación de la actividad de la GSH. Además hubo un incremento en la expresión de las proteínas TGF- β , α -SMA, IL-10 y COX-2, el resultado del estudio histopatológico se correlacionó con los hallazgos bioquímicos y moleculares. La cafeína previno la mayoría de los cambios producidos por TAA, su mecanismo de acción se asocia a sus propiedades antioxidantes y a su capacidad de bloquear TGF- β . Interesantemente, el tratamiento con AAS tuvo efectos beneficiosos debido a su propiedad antiinflamatoria e inhibición de COX-2, consecuentemente reduce la sobreexpresión de TGF- β lo cual resulta en una reducción en la activación de CEH.

3. INTRODUCCIÓN.

3.1. Generalidades del Hígado

El hígado es uno de los órganos más grandes del cuerpo humano, representa aproximadamente el 2.5% del peso corporal (alrededor de 1500 g en el adulto) está constituido de un tejido blando café-rosado y se encuentra rodeado de una capsula de tejido conectivo (capsula de Glisson) [Muriel P. 2017]

El hígado es el centro de la actividad bioquímica del cuerpo, se sitúa en la parte superior derecha del abdomen detrás de las costillas y cartílagos costales, separado de la cavidad pleural y de los pulmones por el diafragma, está dividido en dos lóbulos principales el derecho y el izquierdo, los cuales se subdividen por los ligamentos, falciforme y redondo. Presenta una posición estratégica ya que se encuentra entre la circulación intestinal y la general recibiendo doble irrigación a través del hilio hepático o porta hepático; recibe del 30-45% sangre rica en oxígeno de la arteria hepática y del 60-70% de la vena porta que transporta nutrientes, toxinas y otras sustancias absorbidas desde el intestino [Theise N. 2015]. La sangre de estos dos vasos recorre el hígado a través de vasos sanguíneos más pequeños de tamaño capilar conocidos como sinusoides hepáticos los cuales conectan con las venas hepáticas eferentes (venas centrales) que recolectan la sangre sinusoidal llevando productos metabolizados hacia la vena hepática. Otra red de conductos en el hígado consiste en los conductos biliares que llevan la bilis a la vesícula biliar y al intestino, y junto con la vena porta y la arteria hepática forman la triada portal. [Muriel P. 2017]

La matriz extracelular (MEC) constituye alrededor del 0.5% del peso total del hígado, es el sostén para las células parenquimatosas y, a su vez refuerza la arquitectura del órgano, está compuesta de colágeno, proteoglicanos y glicoproteínas, gracias a su disposición no fibrilar hace posible el intercambio de moléculas, entre los hepatocitos, que resulta fundamental para el mantenimiento de la funciones hepáticas.

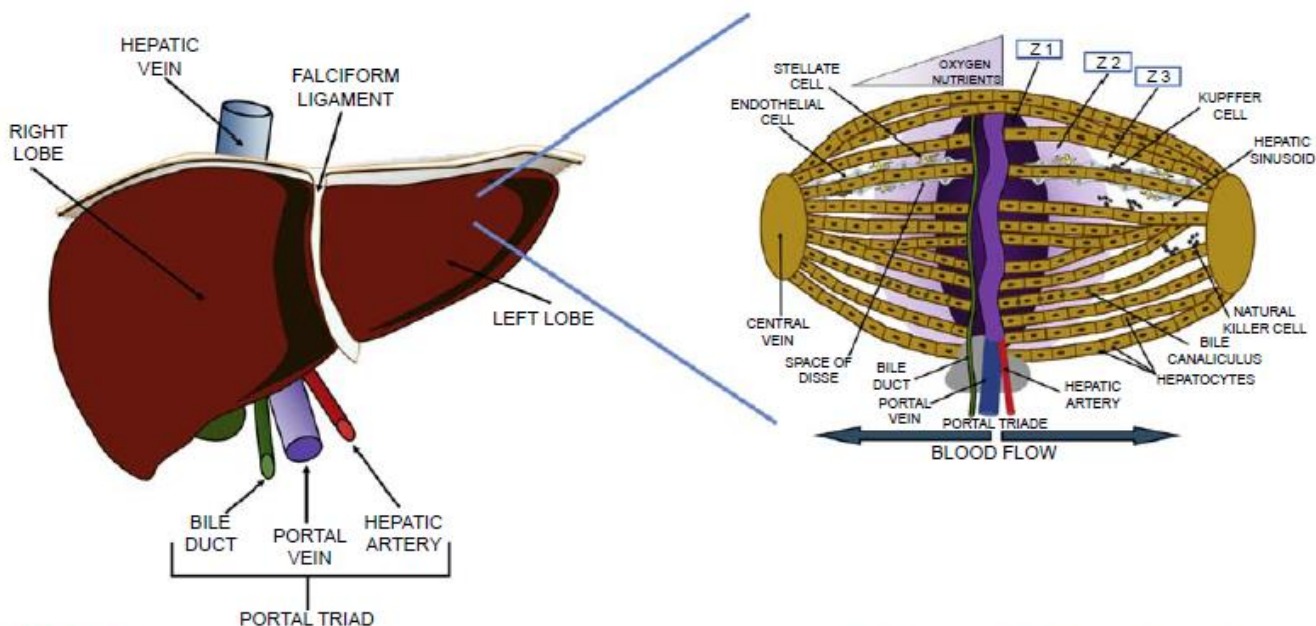


Fig. 1 Vista del hígado mostrando la triada portal y esquema del flujo sanguíneo [Muriel P. 2017].

3.2. Lobulillo hepático

El lobulillo hepático es la unidad arquitectónica básica del hígado, consiste en una estructura cilíndrica de varios milímetros de longitud y de 0.8 a 2 milímetros de diámetro, formada por hepatocitos que se organizan en hojas o placas celulares que se extienden como los radios de una rueda desde la vena central hasta la triada portal (fig. 1) [Guyton y Hall, 2001].

Cada placa hepática suele estar formada por dos células y entre las células adyacentes se encuentran pequeños canalículos biliares que drenan en los tabiques fibrosos que separan los lobulillos hepáticos adyacentes [Guyton y Hall, 2001]. Los tabiques también llevan vénulas portales que reciben, sobre todo, la sangre portal del tubo digestivo. Desde las vénulas, la sangre se dirige hacia los sinusoides hepáticos planos, ramificados, ubicados entre las placas hepáticas, y después, hacia la vena central. Así pues, la células hepáticas están constantemente expuestas a la sangre venosa portal.

(A) The Liver lobe

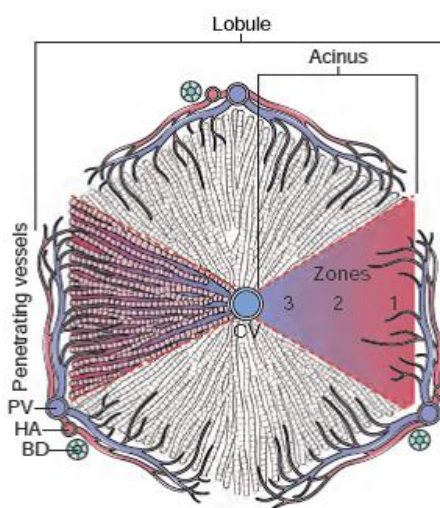
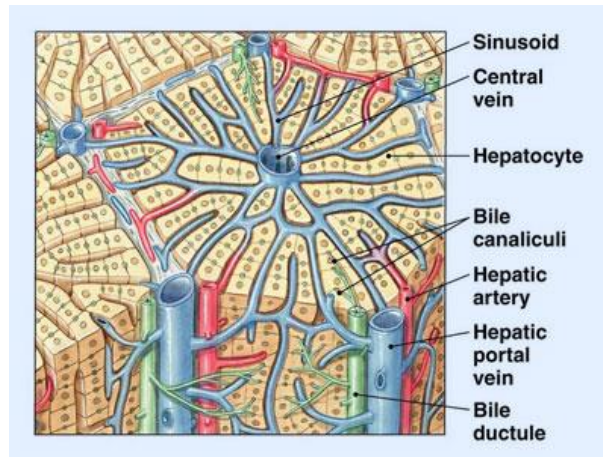
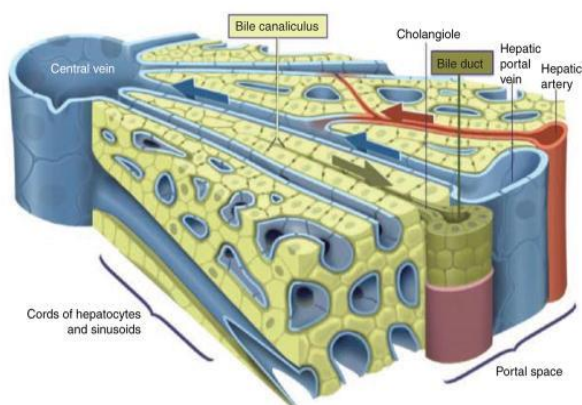


Figura 2. Vista y zonificación del lobulillo hepático [Tomado de Treyer y Müsch. 2013 y Theise N. 2015. Modificado]

Los hepatocitos que se encuentran cerca de la vena hepática terminal se llaman “centrilobulares”; Los que están cerca del tracto portal son "periportales". La división del parénquima en zonas (Z1, Z2, Z3) es un concepto útil, ya que ciertos tipos de lesión hepática tienden a afectar preferentemente a zonas particulares (Fig. 2). Esto resulta en parte del gradiente zonal de oxigenación y actividades metabólicas.

El hígado humano contiene entre 50,000 y 100,000 lobulillos, a menudo se dibujan como estructuras hexagonales, aunque en los humanos las formas son mucho más variables; No obstante, es una simplificación útil.

3.3. Tipos celulares.

El hígado contiene distintos tipos celulares; los cuales se dividen en células parenquimatosas y células no parenquimatosas.

3.3.1 Células parenquimatosas

El hígado tiene un papel vital en el organismo, presentando múltiples funciones metabólicas, digestivas, hemostáticas, inmunológicas y de reservorio; está constituido por unidades celulares denominados hepatocitos que representan el 80% de la población celular hepática.

Los hepatocitos son células epiteliales poliédricas de 30 a 40 μm de diámetro y su función es principalmente metabólica. Están dispuestos en cordones o hileras que conectan a las diferentes zonas. El espacio entre hilera e hilera se le denomina sinusoides hepáticos mientras que el espacio entre hilera y endotelio se le conoce como espacio de Disse.

3.3.2 Células no parenquimatosas

Estas incluyen a las células endoteliales, células de Kupffer, células estelares y células de Pit, como se describen en la tabla 1.

Tipo celular	%	Importancia
Células estelares hepáticas	40%	Profibrogénicas
Endoteliales (sinusoidales)	20%	Intercomunicación celular
Células de Kupffer	20%	Respuesta inflamatoria antes un estímulo
Linfocitos intrahepáticos	20%	Respuesta inmune y/o tolerancia

Tabla 1. Distintas poblaciones celulares no parenquimatosas existentes en el hígado

3.3.3 Células endoteliales

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

3.3.4 Células de Kupffer

Entre las células de los sinusoides hepáticos se encuentran la células de Kupffer las cuales son los macrófagos específicos del hígado, móviles, ligadas a las células endoteliales, representando del 80 al 90% de la población macrofágica fija del organismo [Harrison, 2000]. Su función es la de receptáculo de desechos para todo tipo de material viejo, innecesario, dañado, alterado o extraño. Después de la activación de las células de Kupffer por un agente (endotoxina u otro), ellas secretan un numero de productos con potente actividad biológica, incluyendo citocinas, fibronectina, prostaglandinas, factor activador de plaquetas y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) [Bacon y Di Bisceglie, 2000].

3.3.5 Células de Pit.

Un gran número de linfocitos también están presentes en el hígado normal, que comprende hasta el 22% de las células distintas de los hepatocitos.

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

3.3.6 Células estelares (CEH)

Dentro del espacio de Disse e incluidas en la MEC, se encuentran las células estelares hepáticas (CEH) también conocidas como células de Ito, las cuales representan el 15% de la población celular total (fig. 3). Tiene como papel el depósito de grasa y principal almacén de esteres de retinol (Vitamina A), sintetizan y modulan la degradación MEC, produciendo colágeno, glicoproteínas y proteoglicanos, participan en la intercomunicación celular, así mismo regulan el flujo sanguíneo sinusoidal por su capacidad contráctil. Por otra parte, las CEH juegan un papel muy importante en la fibrosis hepática, las proteínas liberadas por el daño a los hepatocitos pueden actuar como los primeros mitógenos paracrinos proinflamatorios de las CEH [Yin C. y cols. 2013].

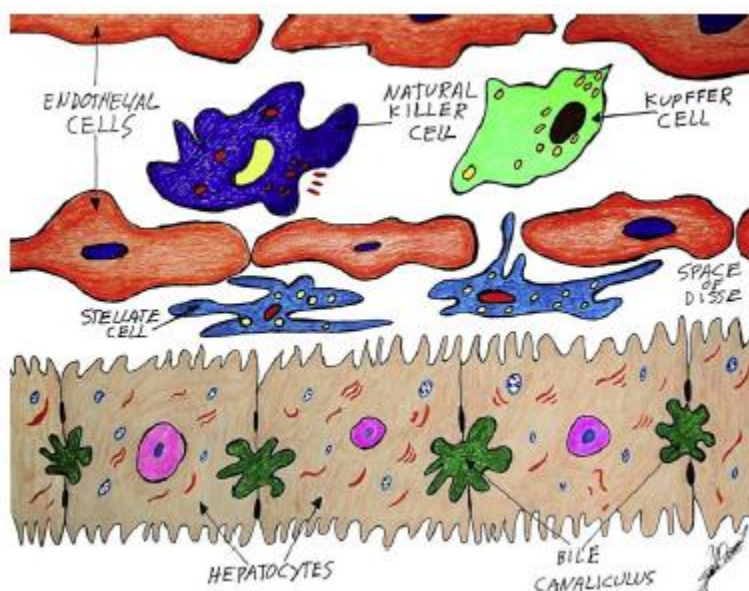


Figura 3. Diversos tipos de células hepáticas [Muriel P. 2017]

3.4 Funciones principales del hígado.

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

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

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

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

4 DAÑO HEPÁTICO.

El hígado es un órgano vital con papel central en la homeostasis metabólica, detoxificación, e inmunidad, por lo que, frecuentemente está expuesto a varias agresiones las cuales pueden generar muerte celular y disfunción hepática. Este tipo de daño puede ser agudo o crónico; el daño agudo es una ocurrencia clínica común derivada por diferentes etiologías como fármacos, toxinas, isquemia-reperfusión y patógenos, inicialmente hay hepatitis y destrucción de un gran número de hepatocitos; si esta extensiva muerte celular no es contrarrestada por la actividad regenerativa del hígado el daño progresa a fallo hepático agudo provocando la muerte; sin embargo, si el estímulo o agente etiológico que ha producido este daño desaparece, el tejido puede recuperar sus funciones puesto que se estimula la regeneración celular, lo que da lugar a la remodelación del tejido.

Por otro lado, cuando el daño es crónico y de menor intensidad, no se estimula la regeneración y el parénquima hepático es remplazado por tejido fibrótico cicatricial generando fibrosis y posteriormente cirrosis hepática [Bataller y Brenner, 2005]; este tipo de daño es el resultado de la respuesta descontrolada de reparación de tejido del hígado por varios estímulos como infecciones virales (virus de hepatitis B y C), esteatosis hepática alcohólica y no alcohólica [Duarte y cols., 2015].

4.1. Fibrosis y cirrosis

La fibrosis es el resultado del daño crónico al hígado y antecede a la cirrosis hepática, la cual es una enfermedad irreversible, mientras que la fibrosis es un proceso dinámico bidireccional en el cual puede ocurrir reversión y remodelación del tejido cicatricial fundamentalmente en las etapas iniciales. Las causas más frecuentes de este padecimiento son las infecciones crónicas por virus de la hepatitis B y C (VHB y VHC), abuso en el consumo de alcohol, esteatosis hepática no alcohólica, fármacos y enfermedad biliar crónica, entre otros [Bataller y Brenner, 2005; Iredale 2003].

La fibrosis hepática es considerada un modelo de reparación de tejido en respuesta al daño crónico, cuya principal característica es la acumulación desordenada de MEC de tipo fibrilar (principalmente colágenas tipo I y III) que reduce las fenestraciones entre las células sinusoidales hasta eliminarlas por completo (capilarización del sinusoides), declinando así las funciones del hígado, con una pérdida de la arquitectura normal y formación de nódulos de regeneración. Cabe señalar que el acúmulo de proteínas fibrilares es el resultado de un desequilibrio entre la síntesis y la degradación de MEC a causa de una baja actividad de las metaloproteinasas (MMPs), una sobreexpresión de sus inhibidores (TIMPs) y de citocinas pro-fibrogénicas como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) [Elpek, 2014; David y cols., 2010].

En la cirrosis hepática, las colágenas tipo I y III se depositan en los lobulillos hepáticos creando septos irregulares que pueden llegar a ser muy gruesos y que seccionan y circundan porciones del lobulillo hepático (nódulos de regeneración). La mayor parte de la colágena depositada durante la fibrosis hepática es producto de las CEH. En un hígado normal las CEH se encuentran en un estado quiescente, sin embargo, en el curso de las hepatopatías crónicas, las CEH sufren cambios morfológicos adquiriendo un fenotipo parecido a los miofibroblastos, proceso conocido como activación, resultando en un incremento en la proliferación celular y sobreproducción de colágena, así como de TGF- β e inhibidores de metaloproteinasas (TIMP-1, TIMP-2) [Friedman, 2003]. Las CEH activadas migran y proliferan en los focos de necrosis hepatocelular, donde depositan matriz extracelular y participan en el reclutamiento de células inflamatorias.

Todos los tipos de colágena hepática están aumentados en la cirrosis; en especial, en bandas de tejido conectivo que rodean a los hepatocitos. El aumento del contenido de tejido conectivo hepático puede deberse a un incremento en su síntesis, a una disminución en su degradación o a una combinación de ambos factores.

Actualmente se ha considerado que la evolución de la fibrosis a cirrosis es irreversible aunque no ha sido posible determinar el punto de no retorno de este proceso. Recientes avances han demostrado que la síntesis de colágena por parte de las CEH, el desequilibrio en las concentraciones de matriz extracelular, las alteraciones en las concentraciones tisulares de metaloproteinasas y la activación de cascada de citocinas son factores determinantes en la génesis de esta enfermedad. Los tratamientos para la fibrosis hepática son paliativos. La manera más efectiva de prevenir la progresión de la fibrosis es remover el agente causal, sin embargo, esto no es siempre posible. Los nuevos abordajes terapéuticos deben orientarse hacia la reducción de la inflamación, la inhibición de la proliferación de las células estelares y el incremento de la degradación del tejido fibroso.

4.2 Daño hepático y TGF- β .

La mayor parte de las sustancias que regulan la transformación fenotípica y la proliferación de las células estelares se derivan de los hepatocitos dañados, de las células de Kupffer activadas y del propio infiltrado inflamatorio. Diversos factores de crecimiento como el TGF- β y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), además de sustancias vasoactivas como vasopresina, trombina, angiotensina II y endotelina 1, contribuyen a la acumulación de células estelares activadas y en consecuencia ejercen una acción profibrogénica en el daño crónico [Méndez y Uribe, 2003].

El TGF- β 1 desempeña también un papel importante en la reparación tisular normal pero deja de formarse al completarse el proceso de curación, mientras esto no ocurre cuando las lesiones son crónicas [Gressner y cols 2002]. Existen numerosos reportes que muestran que el proceso fibrótico hepático está regulado por el TGF- β , por su acción profibrogénica. Las células estelares hepáticas son inducidas por el TGF- β para diferenciarse en miofibroblastos y producir mayores cantidades de proteínas de MEC [Wells, 2000].

4.3 El papel del estrés oxidativo en el daño hepático

Las especies reactivas de oxígeno, tales como H_2O_2 , OH^\bullet , O_2^\bullet , conocidos por sus siglas en inglés como ROS (reactive oxygen species) desempeñan importantes funciones fisiológicas y también pueden originar un extenso daño celular. Los seres vivos poseen un conjunto de sistemas fisiológicos que se encargan de eliminar las ROS ocupándose de mantener el estado de equilibrio que existe entre oxidantes y antioxidantes [Heffner y Repine, 1989]. Se define al estrés oxidativo como un desequilibrio entre la generación de ROS y la capacidad de defensa antioxidante de la célula, el cual afecta a los principales componentes celulares, incluyendo los lípidos, proteínas y ADN (figura 4) [Evans y Halliwell, 2001].

La fibrosis y la cirrosis hepática están asociadas con el consumo de alcohol e infección de VHB y VHC. En ambos agentes etiológicos, se ha demostrado que aumentan la producción de ROS independiente y sinérgicamente. Interessantemente las ROS están implicadas en el desarrollo de fibrosis y cirrosis hepática en estas condiciones patológicas [Perlemuter y cols., 2003].

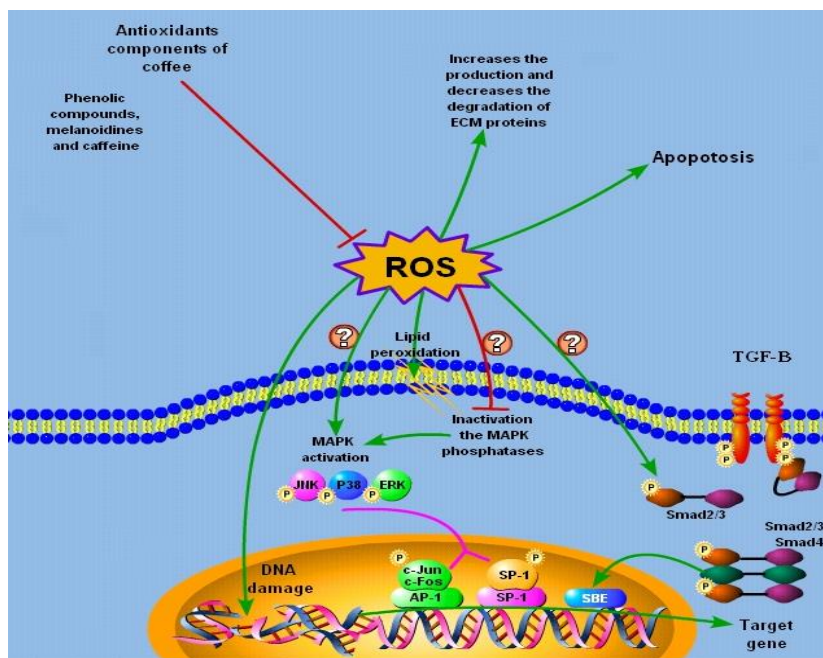


Figura 4. Modelo de ROS induce síntesis de matriz extracelular y fibrogénesis [Muriel y Arauz, 2012]

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

4.4. Mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo.

Los seres vivos poseen un conjunto de sistemas fisiológicos que se encargan de eliminar las ROS ocupándose de mantener el estado de equilibrio que existe entre oxidantes y antioxidantes [Heffner y Repine, 1989; Evans y Halliwell, 2001]. La gran diversidad en la vida media de los distintos pro-oxidantes, desde nanosegundos para el caso del radical hidroxilo, hasta varios segundos para los radicales peroxilo o el óxido nítrico y peroxinitrito pone de manifiesto la gran variedad de sistemas de defensa necesarios para hacerles frente [Arauz y cols. 2016].

4.4.1 Antioxidantes enzimáticos.

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

- *Catalasa*. La catalasa es una hemoproteína tetramérica cuya función es reducir el peróxido de hidrógeno para formar oxígeno molecular y agua. Así mismo, posee actividad peroxidasa [Nohl y Hegner, 1978].
- *Superóxido dismutasa*. Son un grupo de enzimas que catalizan la dismutación del radical superóxido para formar peróxido de hidrógeno [Weiss, 1986].
- *Glutación peroxidasa*. Complementa la actividad de la catalasa como sistema reductor del peróxido de hidrógeno. Esta enzima clave del ciclo

del glutatión, actúa además sobre grandes moléculas de peróxidos lipídicos y sobre productos derivados de las reacciones catalizadas por la lipooxigenasa.

4.4.2 Antioxidantes no enzimáticos.

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

- **Vitamina C.**

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

- **Glutatión.**

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

peroxidasa selenio-dependiente, reduce a los peróxidos producidos de manera endógena (Figura 5). Como resultado de esto, el GSH se oxida a GSSG, que es nuevamente reducido a GSH por la GSSG reductasa, a expensas del NADPH, formando así un ciclo redox.

- Vitamina A y β -CAROTENOS.

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

- Vitamina E.

El tocoferol es el compuesto principal de esta vitamina, corresponde químicamente a un derivado metil-6-hidroxicromano, con una cadena alifática de 16 carbonos laterales. La vitamina E se encuentra ampliamente distribuida en los alimentos, de estos las grasas y aceites contienen más vitamina E, otras fuentes son los cereales, aves, carnes, pescados, etc. Esta vitamina tiene diversas funciones metabólicas, entre ellas tal vez la más importante y mejor estudiada es el papel protector de las membranas biológicas, ya sea evitando la oxidación de sus componentes celulares esenciales o evitando la formación de productos tóxicos de oxidación como los peróxidos de ácidos grasos, actuando así como estabilizador de la estructura lipídica de los tejidos [Evans y Kayle, 1999].

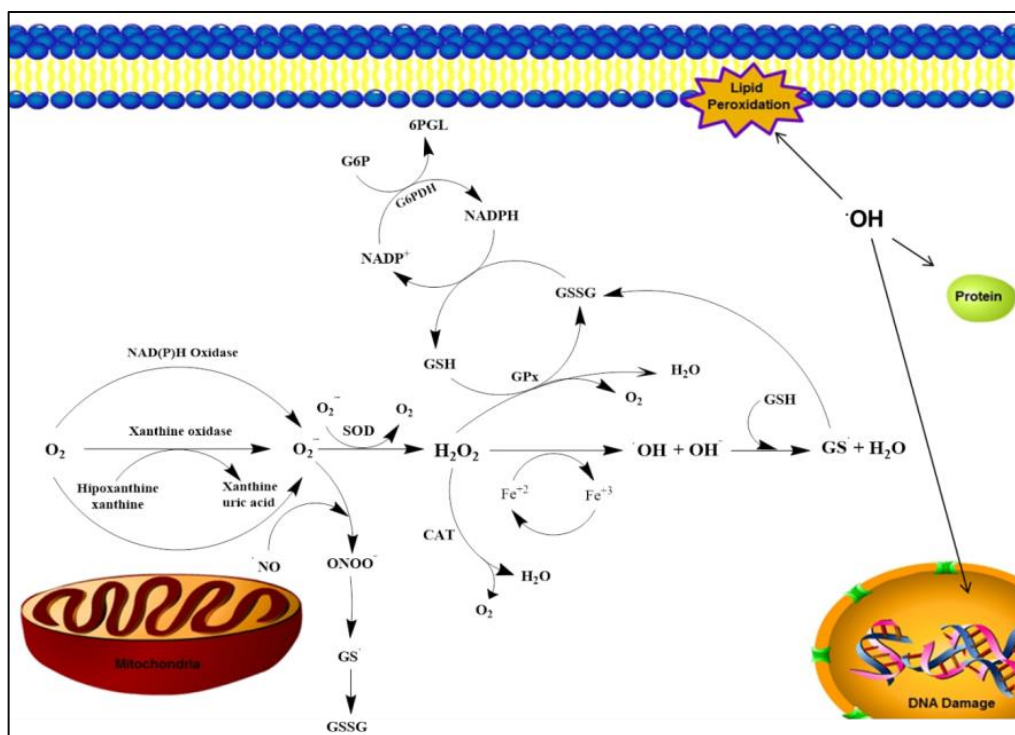


Figura 5. Esquema de formación de ROS [Arauz y cols. 2016]

4.5. La cafeína y las enfermedades hepáticas.

La cafeína (1,3,7-trimetilxantina) es un alcaloide y es el principal compuesto farmacológicamente activo del café, bebida conocida por promover la estimulación del sistema nervioso central. Existe una creciente evidencia que muestra que la cafeína tiene efectos benéficos en el hígado. Por ejemplo, el consumo de café ha sido asociado con la disminución del progreso de fibrogénesis en modelos experimentales [Arauz y cols., 2013] y en pacientes con enfermedades crónicas hepáticas (VHC y abuso de alcohol), en las cuales se muestra una reducción en la incidencia de cirrosis [Liu y cols 2015].

Los primeros reportes de la relación entre el café y la bioquímica del hígado datan desde hace 20 años. Desde entonces varios estudios han reportado la asociación del consumo de café con la reducción de los niveles de enzimas hepáticas; la administración de cafeína previene significativamente la muerte de hepatocitos, así como interfiere en la reducción de la actividad de ALT [Muriel y Arauz 2010]. La cafeína tiene propiedades antioxidantes, las cuales son

similares los antioxidantes biológicos como el glutatión y significativamente más alto que el ácido ascórbico. Una reciente investigación demostró que el tratamiento con cafeína previene la fibrosis experimental inducida por TAA, este efecto es mayormente causado por el bloqueo de la expresión de la citoquina fibrogenica TGF- β , lo cual resulta en una atenuación del proceso inflamatorio [Arauz y cols., 2014].

4.6. Ciclooxygenasas en el daño hepático.

La ciclooxigenasa (COX) o prostaglandina H₂ sintasa, es la enzima que cataliza los dos primeros pasos en la biosíntesis de las prostaglandinas (PGs), prostaciclina y tromboxanos a partir del ácido araquidónico. Existen dos isoformas de COX, nombradas ciclooxigenasa-1(COX-1) y ciclooxigenasa-2 (COX-2). La COX-1 está constitutivamente expresada en varios tejidos y tiene un papel fisiológico en condiciones normales sintetizando varios tipos de PGs para mantener la homeostasis. La COX-2 es inducible y responsable de la producción de un gran número de PGs resultado de las vías mediadas por IL-1, IL-2, TNF- α y lipopolisacáridos (LPS) [Smith y cols., 2000].

En el hígado, la expresión de COX-2 y las PGs se ha implicado en la regeneración hepática, la remodelación tisular y la hipertensión portal. En modelos animales de hepatopatía alcohólica se ha demostrado su relación con la intensidad de la lesión necroinflamatoria. En hepatopatías de origen viral se ha observado la expresión de COX-2 en el hepatocito y se ha relacionado principalmente con la progresión de la fibrosis [Jiang y cols., 2016]. Ha sido de gran interés la demostración, tanto en modelos experimentales como en muestras procedentes de pacientes, del papel de la COX-2 en el desarrollo del hepatocarcinoma y del colangiocarcinoma.

Se ha demostrado que la COX-2 está implicada en la carcinogénesis mediante la inhibición de la apoptosis y el aumento de la proliferación de las células tumorales [Poujol-Robert y cols., 2014]. Sobre la base de evidencias experimentales la inhibición selectiva de COX-2 pudiera ser útil en la

quimiopreención de los tumores hepáticos primarios, sin embargo no se tiene bien dilucidado el mecanismo de acción de esta proteína en la fibrosis hepática [Ke-Qin Hu, 2003].

4.7. Ácido acetilsalicílico (AAS)

El AAS es uno de los fármacos más utilizados perteneciente al grupo de los anti inflamatorios no esteroideos (AINES), sus efectos benéficos como analgésico y antiagregante plaquetario se deben a la inhibición no selectiva de las COX-1 y COX-2 (fig. 6). Estudios recientes muestran que la administración de AAS a bajas dosis puede estar asociado a una disminución del riesgo del progreso de fibrosis en pacientes con VHC [Poujol-Robert y cols., 2014; Jiang y cols., 2016]. Sin embargo, los mecanismos moleculares por el cuales el AAS ejerce estos efectos no se han demostrado, por esta razón resulta interesante evaluar los efectos de AAS en la fibrosis experimental.

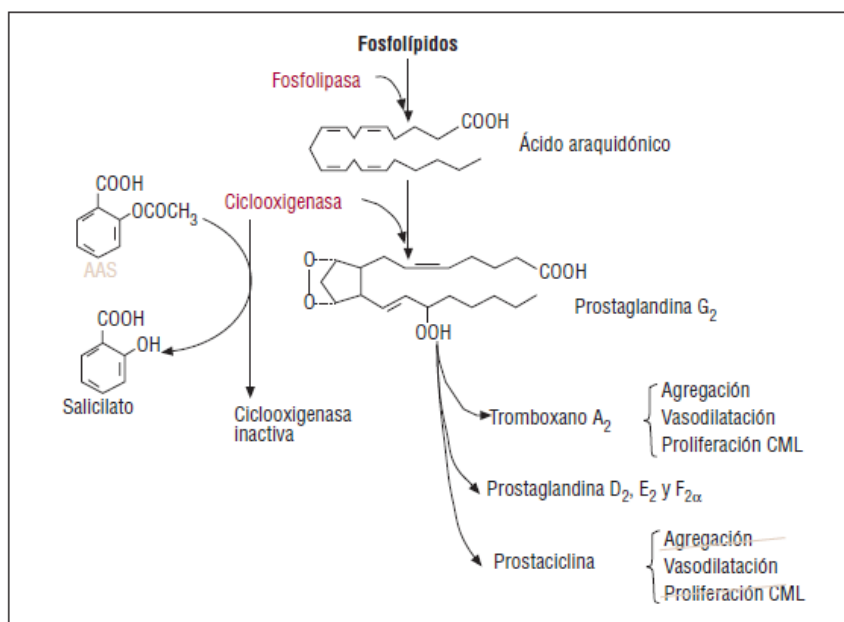


Figura 6. Mecanismo de acción de AAS [Arzamendi y cols. 2006]

5. MODELOS EXPERIMENTALES DE DAÑO HEPÁTICO

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

5.1. Modelo de Tioacetamida (TAA)

La TAA (CH_3CSNH_2), comenzó a utilizarse como fungicida de los naranjos y cobro importancia en 1943 cuando se detectó su presencia en el jugo con el consiguiente riesgo para la salud. La tioacetamida ha sido muy utilizada en la investigación desde 1948, fecha en la que se afirmó que su administración crónica producía cirrosis hepática [Fitzhugh y Nelson, 1948]. Se ha demostrado que son varios los productos resultantes del metabolismo de la TAA: T. oxido ($\text{CH}_3\text{CSONH}_2$) y T. dióxido ($\text{CH}_3\text{CSO}_2\text{NH}_2$) (figura 7).

El primero de ellos (T. oxido) no produce lesiones hepáticas, ni siquiera en dosis muy altas. El T. dióxido en cambio, posee una elevada capacidad para originar necrosis en hígado; resulta por la acción de una mono-oxigenasa microsomal ligada al citocromo P450 sobre la TAA. Precisamente los niveles microsomales de citocromo P450 descienden como consecuencia de la administración de la TAA [Hunter y cols., 1977]. La mayoría de los estudios aceptan que la cirrosis producida por la TAA es similar a la enfermedad humana, ya que existe bastante similitud en los cambios histológicos y bioquímicos entre ambos tipos de cirrosis.

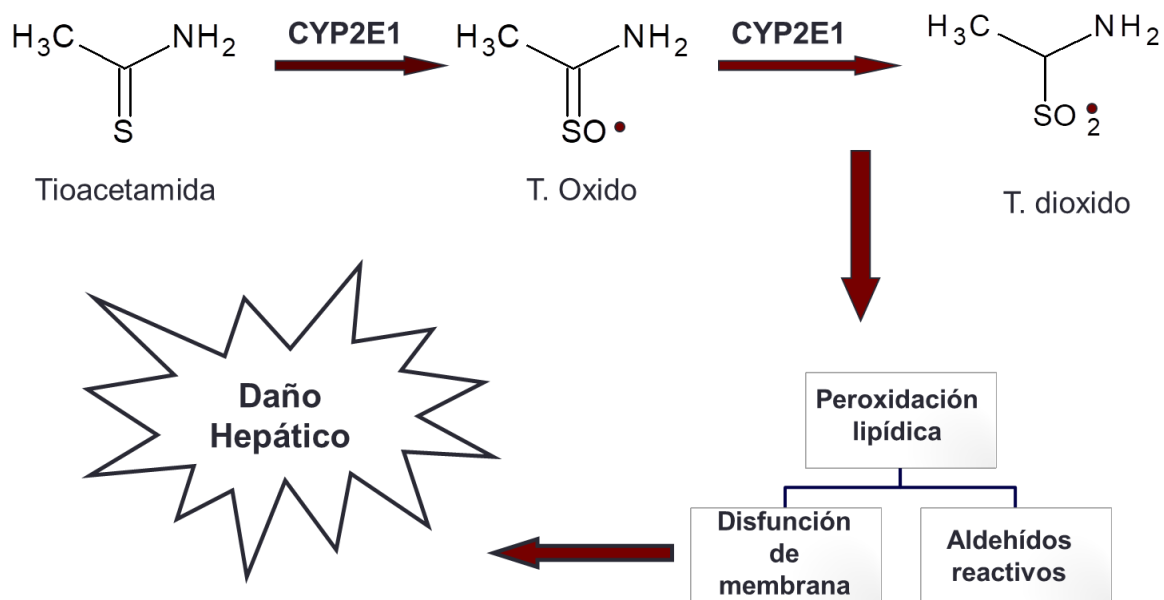


Figura 7. Metabolismo de TAA y daño hepático.

En general se puede afirmar que la cirrosis producida por TAA reproduce las alteraciones morfológicas y bioquímicas de la cirrosis humana: la hipertensión portal, las disminuciones en el flujo sanguíneo portal, en la excreción hepática y los contenidos del citocromo P450 y de glucógeno hepáticos, la elevación de la fosfatasa alcalina sérica, así como las alteraciones histológicas y del metabolismo lipídico producidas por la administración de TAA.

Sin embargo, no se puede dejar de señalar que, por supuesto, existen diferencias con la enfermedad humana. Entre ellas destacan dos: el agente etiológico y la reversibilidad de las lesiones. En efecto, las alteraciones debidas a la TAA acaban desapareciendo, algunas en cuestión de días o semanas y otras al cabo de varios meses [Zimmermann y cols., 1987].

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

En México las enfermedades crónicas del hígado están entre las principales causas de muerte. Un reporte del Consejo Nacional de Población (CONAPO) de 2012 indica que la cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado escalaron hasta la segunda posición como causas de muerte en la población de 30 a 59 años de edad (solo superadas por los casos de diabetes); en el caso de los hombres ocupan el tercer lugar y el séptimo en mujeres. Las principales causas son por hepatitis B y C, colestasis, fármacos hepatotóxicos, abuso en el consumo del alcohol, los cuales son los principales factores que culminan en fibrosis y posteriormente en cirrosis hepática, cáncer hepatocelular, falla renal y pulmonar, entre muchas complicaciones mortales.

En la actualidad el número de fármacos utilizados en el tratamiento de las enfermedades hepáticas es reducido y únicamente son útiles para disminuir los síntomas de la enfermedad. Cuando la cirrosis hepática se encuentra en una etapa avanzada, el trasplante de este órgano es el último recurso; desafortunadamente la disponibilidad de órganos es limitada, además de presentarse otros inconvenientes como la falta de compatibilidad entre el donador y receptor entre otros. Con base en lo anterior, es necesario ampliar el conocimiento sobre los mecanismos moleculares por los que se establecen las enfermedades hepáticas, con el fin de diseñar y generar terapias para estos padecimientos. Actualmente se cuenta con modelos murinos de daño hepático experimentales útiles que mimetizan algunos estados patológicos clínicos en humanos.

La fibrosis hepática está asociada al incremento del estrés oxidativo y al aumento de la citocina profibrogénica TGF- β , así como la expresión de la COX-2 la cual promueve el proceso inflamatorio. Actualmente existen inhibidores de COX que poseen propiedades antiinflamatorias, antitumorales y antiangiogénicas. El AAS es un inhibidor no selectivo de ambas isoformas de COX; pertenece al grupo de los AINES y es utilizado como antiinflamatorio, analgésico, antipirético y antiagregante plaquetario.

El café es una bebida de alto consumo a la cual se le han atribuido acciones benéficas en el hígado, y uno de sus componentes, la cafeína, ha mostrado poseer propiedades hepatoprotectoras.

En el mercado se cuenta con una formulación comercial de cafeína combinada con AAS para el tratamiento de cefaleas de leves a moderadas, en este proyecto se pretende evaluar el posible efecto de esta misma combinación de fármacos en un modelo de daño hepático experimental la cual podría arrojar resultados que permitan en el futuro proponerla como una opción terapéutica para la fibrosis hepática.

7. HIPÓTESIS

El tratamiento con cafeína en conjunto con AAS promoverán un efecto preventivo sobre la fibrosis en el daño hepático experimental inducido por tioacetamida (TAA).

8. OBJETIVOS

8.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la cafeína y el AAS en la prevención del daño hepático experimental inducido por TAA.

8.2. Objetivos específicos

- 1) Estandarización del establecimiento de daño hepático experimental inducido por la administración de TAA.
- 2) Establecer si la inhibición de COX-1 y COX-2, por el ácido AAS tiene efectos en la fibrosis hepática.
- 3) Evaluar el efecto de la cafeína sobre el estrés oxidativo causado por la TAA en el modelo experimental.
- 4) Caracterizar el posible efecto antifibrótico de la cafeína y AAS en el daño hepático tras administración de TAA.
- 5) Comparar los resultados de los fármacos de forma individual y combinados en el modelo de daño hepático crónico.

9. METODOLOGÍA

9.1. Procedimiento experimental

Se utilizaron ratas macho Wistar (*Rattus norvegicus*) con un peso inicial de 100-110 g provenientes del bioterio de la UAM Iztapalapa. Las ratas se mantuvieron bajo condiciones controladas (22 ± 2 °C, humedad relativa de 50-60% y ciclos de 12 h luz-oscuridad) en cajas de policarbonato. Fueron alimentadas con LABDIET® FORMULAB DIET y agua *ad libitum*.

La fibrosis se indujo por la administración de 200 mg/kg de TAA por vía intraperitoneal (i.p.) cada tercer día durante 8 semanas. Para evaluar los efectos de la cafeína y AAS en la prevención de la fibrosis, las ratas se dividieron en 7 grupos los cuales se trataron de la siguiente manera (Tabla 2):

n	Grupo	Tratamiento
10	1	H ₂ O
20	2	TAA
20	3	TAA + AAS
20	4	TAA + CAFEÍNA
20	5	TAA+ AAS + CAFEÍNA
10	6	CAFEÍNA
10	7	AAS



Tabla 2. Esquema de tratamiento en el modelo de prevención.

	Dosis	Vía	días
TAA	200 mg/kg	Intraperitoneal	Cada tercer día
AAS	100 mg/kg	Oral	Diario
Cafeína	20 mg/kg	Oral	Diario
H₂O	1 mL	Intraperitoneal	Cada tercer día

Tabla 3. Esquema de dosis

La cafeína y el AAS se administraron de manera diaria con sus respectivos controles, al grupo control se le administro agua destilada (vehículo con el cual se administró la TAA) tabla 3.

Al término del tratamiento los animales fueron sacrificados bajo ligera anestesia con pentobarbital para obtener una muestra de sangre por punción cardiaca y extraer el hígado a partir de los cuales realizaron las determinaciones experimentales mostradas en la figura 8:

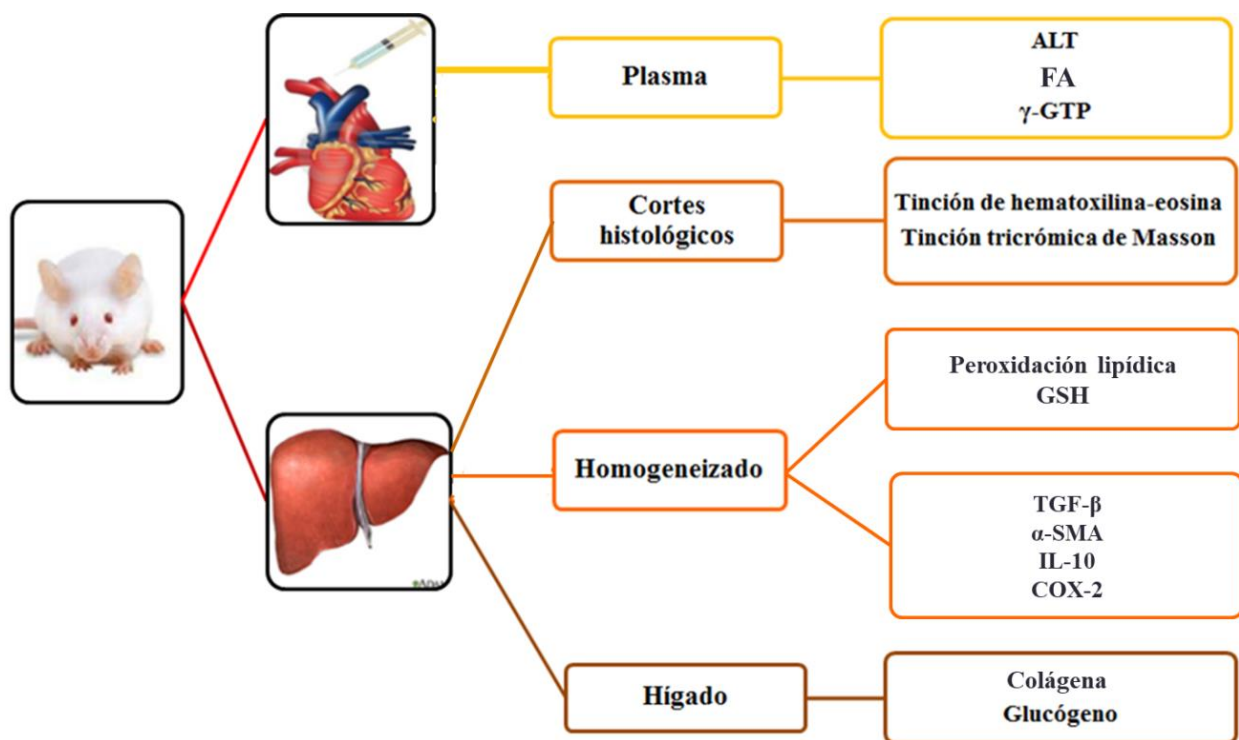


Figura 8. Pruebas analíticas

9.2. Actividad de la Alanina amino transferasa (ALT).

La actividad de la enzima alanina aminotransferasa se determina por el método de [Reitman y Frankl, 1957], en el que se mide el complejo colorido formado por el piruvato y la 2,4 dinitrofenilhidrazina, que se absorbe a 515 nm. Se rotularon los tubos tomando en cuenta un blanco por cada muestra y las muestras por duplicado. La determinación se lleva a cabo de la siguiente manera, a cada tubo se le colocaron 0.25 ml de la solución de sustrato y 0.05 de suero problema excepto al blanco, se mezclaron e incubaron a 37°C durante 60 min. Pasado el tiempo se le agregó 0.25 ml del reactivo cromógeno a todos los tubos y 0.05 ml del suero problema solo al blanco y se incuban nuevamente por 15 min. a 37°C posteriormente se detiene la reacción con 2.5 ml de NaOH 0.4 N. Leer a una longitud de onda de 515 nm.

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

El fundamento de la determinación de la actividad enzimática de la γ -GTP es que el sustrato, la glutamil-p-nitroanilida, en presencia de la enzima γ -GTP y del receptor γ -1-glutamil, como lo es la glicil-glicina, produce γ -1-glutamilglicina y p-nitroanilina que se puede cuantificar con un espectrofotómetro a 410 nm [Glossmann y Neville, 1972]. En un tubo de ensaye de 13x100mm se agregaron los siguientes reactivos: 400 μ l de Tris-HCl 200 mM, pH 8.2, 100 μ l $MgCl_2$ 200 mM, 100 μ l Glicil-glicina 40 mM, pH 8.2, 200 μ l Gamma-glutamil-p-nitroanilida 10 mM. Previa incubación por 10 minutos a 37°C, se inicia la reacción con 200 μ l de suero y se incuban a 37°C por 30 min. (Hacer un blanco sustituyendo los 200 μ l de suero por agua) Se detuvo la reacción con 2 ml de ácido acético 1.5 M. y se leyó a 410nm. La actividad enzimática se determinó interpolando el valor de la muestra en una curva estándar de p-nitroanilina y se reporta en μ mol de sustrato hidrolizado por litro de plasma por minuto.

9.4. Determinación de fosfatasa alcalina (FA)

Se siguió la técnica que se describe a continuación. Se rotularon los tubos blancos y problemas para cada muestra agregando los siguientes reactivos a cada tubo: 0.25 ml buffer de glicina 0.1 M y $MgCl_2$ 1mM, pH 10.5, 0.25 ml de sustrato p-nitro fenilfosfato. Se colocan en baño maría a 37°C por 5 minutos, posteriormente se añaden 50 μ l de la muestra, mezclar suavemente e incubar 30 minutos a 37°C. Se para la reacción con 5 ml de NaOH 0.02 N agitando por inversión. Leer absorbancia a 410nm. El blanco se prepara de la misma manera pero colocando 50 μ l de agua en lugar de muestra.

9.5. Determinación de glucógeno hepático.

La determinación del glucógeno hepático se realiza con la técnica de la antrona [Seifter y cols, 1950]. Se pesaron 0.5 g de hígado en tubos de tapón esmerilado, adicionarles 1.5 ml de KOH al 30%, taparlos y hervir en baño de agua durante 30 minutos. Después de enfriar pasar cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 ml y aforar con agua agitando muy bien. Del matraz anterior tomar de 40 a 160 μ l con pipeta volumétrica, llevar a 1 ml en tubos de 13x100 esmerilados por duplicado, preparar un tubo blanco que contenga 1 ml de H₂O y otros 2 estándares con 20 μ l de una solución de glucosa estándar (1 mg/ml) y llevar a 1 ml con agua. Preparar solución de antrona 0.2% en H₂SO₄ concentrado. Añadir 2 ml a cada tubo agitando suavemente (con ayuda de una bureta) y enfriando sobre hielo. Tapar los tubos fríos y ponerlos en un baño de agua hirviendo por 15 min. Se enfrían de inmediato sobre agua con hielo y leer a 620nm. Expresar los resultados como gramos de glucógeno por 100 g de hígado teniendo en cuenta las diluciones realizadas.

9.6. Determinación del grado de peroxidación lipídica.

Esta técnica es colorimétrica y se basa en el método del ácido tiobarbitúrico que reacciona con el Malondialdeído y sus subespecies reactivas oxidadas [Buege y Aust, 1978]. Se pesa 0.5 g de hígado y se homogeniza con politron en 5 ml de agua. Se toman 300 μ l del homogenado y agregan 700 μ l de Tris-HCl 150 mM, 2 ml de TBA al 0.375% disuelto en TCA al 15% en tubos de rosca y poner a ebullición por 45min. Los tubos se centrifugan a 3000 rpm por 10min. y leer el sobrenadante a 532nm. Expresar como nmoles de MDA/mg proteína.

9.7. Determinación de proteínas por el método de Bradford.

Esta determinación se efectúa por el método de [Bradford, 1976], en el que las proteínas se unen al azul brillante de Coomasie. Este último presenta dos coloraciones, rojo y azul. La forma de color rojo se convierte en azul cuando se une a las proteínas. Se toman 100 μ l del homogenado al 10% y se lleva a 1,000 μ l con agua tridestilada. Se toman alícuotas para proteínas, 20 μ l de la dilución anterior más 80 μ l de agua tridestilada (el blanco se prepara poniendo 100 μ l de agua). Añadir 2.4 ml del reactivo Bradford (100ml ácido fosfórico al 85%, 50ml alcohol etílico, 100mg azul de Coomasie G-250, aforar a 1L con agua) y leer absorbancia a 595nm. Previamente se prepara una curva de calibración utilizando Albúmina sérica bovina (1mg/ml). Poniendo 0, 10, 15, 25, 20, 30, 35, 40, 45, 50 μ l de BSA y completar con agua a 100 μ l.

9.8. Determinación de glutatión reducido (GSH).

Homogenizar 0.3 g de hígado en 1.2 ml de solución precipitante (disolver EDTA 5mM en TCA 5%) y centrifugar por 20 minutos a 12,000 rpm. Tomar 0.1 ml de sobrenadante (por duplicado) agregar 2.1 ml de solución de fosfatos (Na_2HPO_4 0.3M) y 0.25 ml de reactivo Ellman (disolver 40mg de ácido 5,5'-ditiobis nitrobenzónico en 100ml de citrato de sodio al 1%), agitar y leer a 412nm.

9.9. Determinación del contenido de colágena (Hidroxiprolina).

La técnica se basa en el método de Rojkind y González [1974]. Se pesa 0.1 g de hígado de rata previamente secado con papel filtro, se coloca en una ampolleta y se agregan 2 ml de HCl 6N, se sellan con el mechero ó soplete para posteriormente colocarlas a 100°C en el horno durante 24 hrs. Una vez hidrolizada la muestra, se rompe la ampolleta y se coloca nuevamente al horno a temperatura de 60-80°C aproximadamente 24 hrs o hasta que seque. La muestra ya seca se resuspende con 2 ml de solución amortiguadora acetato de sodio - ácido cítrico, pH = 6; se agita vigorosamente en el vortex y se vacía en un tubo de ensayo, lavar la ampolleta con 1 ml de la misma solución y centrifugar a 3000 rpm durante 15 min. En un tubo conteniendo una pequeña porción de carbón activado se deposita el sobrenadante, se agita durante un minuto y centrifuga a 3000 rpm por 15 min, si se observa que el sobrenadante no queda claro repetir nuevamente este paso. Se toma 1 ml de este sobrenadante más 1 ml de H₂O y 1 ml de cloramina T (Sol. 2). Se deja reposar exactamente 20 minutos a temperatura ambiente (hacer un blanco). Transcurridos los 20 min, adicionar 0.5 ml de tiosulfato de sodio 2 M, 1 ml de NaOH 1N y aproximadamente 2 g de NaCl. Agitar inmediatamente para detener la reacción. Agregar 6 ml de tolueno y agitar 1 minuto. La fase de tolueno es utilizable para la determinación de prolina y la fase acuosa para la hidroxiprolina. Se extrae la capa de tolueno y se desecha. La porción acuosa se cubre y se coloca a un baño hirviendo durante 20 minutos. Los tubos se enfrían 15 minutos en refrigerador, ya fríos se les adiciona 6 ml de tolueno y se agitan durante 1 min. De la fase de tolueno se toman alícuotas por duplicado de 1 ml y se les agrega 4 ml del reactivo de Ehrlich, AGITAR FUERTEMENTE. Se dejan reposar durante 30 minutos para que se lleve a cabo la reacción colorida. Pasados los mismos, leer a 560 nm.

9.10. Histologías.

La técnica utilizada fue la tinción Tricrómica de Masson (TM) la que busca teñir a las bandas de colágena hepática en color azul, el núcleo celular en color negro y el citoplasma en color rojo [Masson, 1929]. Los cortes histológicos se depositan en un vial conteniendo una solución fijadora de formaldehído (formol) al 10% en PBS, el tiempo mínimo de fijación es de 24 horas. Los cortes se lavan con agua corriente, se deshidratan en alcoholes y se embeben en parafina. Se hacen cortes de 6-7 micras de grosor y se cubren con silano. Las rebanadas se desparafinan y rehidratan con xileno, alcohol absoluto y alcohol al 95% y se enjuagan con agua destilada. Se sumergen en el fijador de Bouin por 1 hr a 56 °C, o toda la noche a temperatura ambiente. Una vez frías se lavan con agua corriente hasta que el color amarillo desaparece, posteriormente se sumergen en la solución de hematoxilina de hierro de Weigert por 10 min. Se lavan con agua corriente al mismo tiempo y se sumergen en la solución de fucsina ácido-escarlata de Biebrich por 15 min. Se enjuaga con agua destilada y se colocan en la solución de ácido fosfomolibdico/ácido fosfotungstínico por 10 a 15 min antes de la solución de anilina de azul y en ácido fosfotungstínico acuoso al 5% por 15 min antes del contraste verde claro. Se desecha la solución y se colocan en la solución de anilina azul por 5 a 10 min o con la solución verde claro por 1 min. Se enjuagan con agua destilada y posteriormente se lavan con agua acética el 1% por 3 a 5 min, con alcohol al 95%, con alcohol absoluto y con xileno finalmente se montan en el polímero Permound o bálsamo.

9.11. Western Blot para: TGF- β , α -SMA, IL-10, COX-2.

El reactivo “TRIzol™ Reagent (Thermo Fisher Scientific)” fue utilizado para aislar la proteína total de las muestras de tejido de hígado de acuerdo con las instrucciones del fabricante para la obtención de una fracción enriquecida en proteínas en la cual se determinó la concentración de estas por medio el método del ácido bicinoninico (Pierce™ BCA protein Assay Kit). Posteriormente, 25 μ g de proteína de cada muestra fue cargada en un gel de poliacrilamida-SDS al 12% para su separación por electroforesis en condiciones desnaturalizantes. Una vez hecho este proceso, las proteínas separadas en el gel fueron transferidas a una membrana PVDF (BIO-RAD) por medio de una cámara de transferencia húmeda. Posteriormente, las membranas fueron tratadas durante 3 hrs. con una solución de bloqueo de leche descremada al 5% y PBS 1X-Tween 20 al 0.01%.

Las membranas fueron incubadas durante toda la noche con anticuerpos primarios dirigidos contra las citocinas TGF- β , IL-10, α -SMA (GTX110630, GTX18147 y GTX632359, respectivamente; GeneTex international Corp. CA, USA) y COX-2 (SC-376861; Santa Cruz Biotechnology Inc. TX, USA).

Al día siguiente las membranas fueron lavadas y posteriormente expuestas al anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (GeneTex) durante 2 horas. Finalmente la detección de las bandas de interés se llevó a cabo con un kit de quimioluminiscencia (Millipore). La intensidad de las bandas de señal para la proteína de interés fueron digitalizadas y analizadas por densitometría utilizando el programa ImageJ (NIH). Se llevaron a cabo correcciones de la cantidad de proteína cargadas con el gel utilizando un anticuerpo monoclonal con la proteína estructural β -actina.

9.12. Análisis estadístico.

Todas las determinaciones bioquímicas se hicieron por duplicado, para los experimentos de western blot se realizó un promedio de 3 individuos. Se obtuvo la media y el error estándar para cada uno de los diferentes indicadores medidos en los grupos de tratamiento

Para cada uno de los indicadores se aplicó un análisis de varianza de una sola variable (ANOVA de una vía), seguido de una prueba de Tukey. Se consideró que hubo una diferencia significativa cuando $p < 0.05$.

10. RESULTADOS.

10.1. Actividad enzimática de ALT.

La ALT es una enzima citoplasmática que se encuentra principalmente en las células hepáticas y un aumento en los niveles séricos de esta refleja un aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática y por tanto un daño a los hepatocitos.

El tratamiento con TAA durante 8 semanas nos mostró un daño hepático al incrementar significativamente la actividad de ALT (Fig. 9, $p < 0.05$), por otra parte, la administración de AAS y cafeína en forma individual y en combinación, atenuaron el daño hepático de manera significativa al disminuir la actividad de esta enzima ($p < 0.05$). Los grupos donde se administró solo un fármaco mostraron valores similares al grupo control.

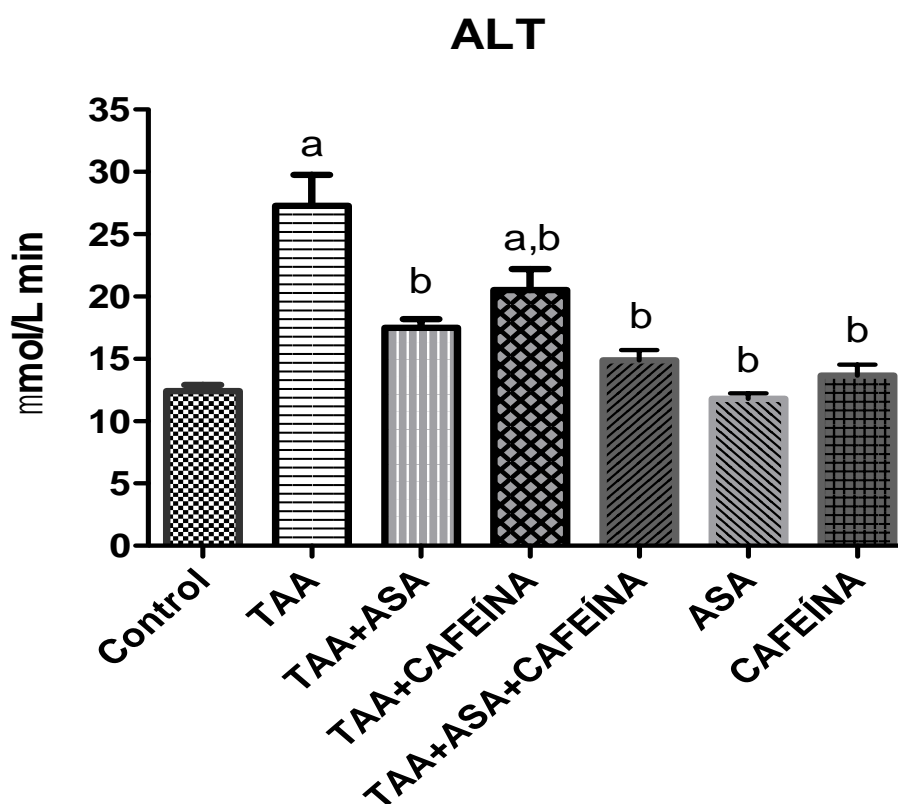


Figura 9. Actividad enzimática de la alanina aminotransferasa, ALT. La actividad de la enzima fue determinada en suero. Cada barra representa el promedio de cada grupo $6n \pm$ el error estándar. a) diferencia significativa con respecto al control b) diferencia significativa con respecto al grupo de daño (TAA) $p < 0.05$.

10.2. Actividad enzimática de γ -GTP y FA.

La figura 10 muestra la actividad enzimática de la fosfatasa alcalina (FA) y de la gamma glutamil transpeptidasa (γ -GTP), los cuales son marcadores de daño colestasico.

Las ratas tratadas crónicamente con TAA, mostraron un incremento de la actividad de forma significativa tanto para FA y γ -GTP, mostrando un daño colestasico. Sin embargo, los fármacos en estudio solo mostraron una ligera disminución mas no significativa de FA. Por otra parte, se puede observar una disminución significativa ($p \leq 0.05$) en la actividad de γ -GTP en los grupos donde se administró AAS y AAS+Cafeína, sin embargo este efecto fue parcial en el grupo TAA+Cafeína.

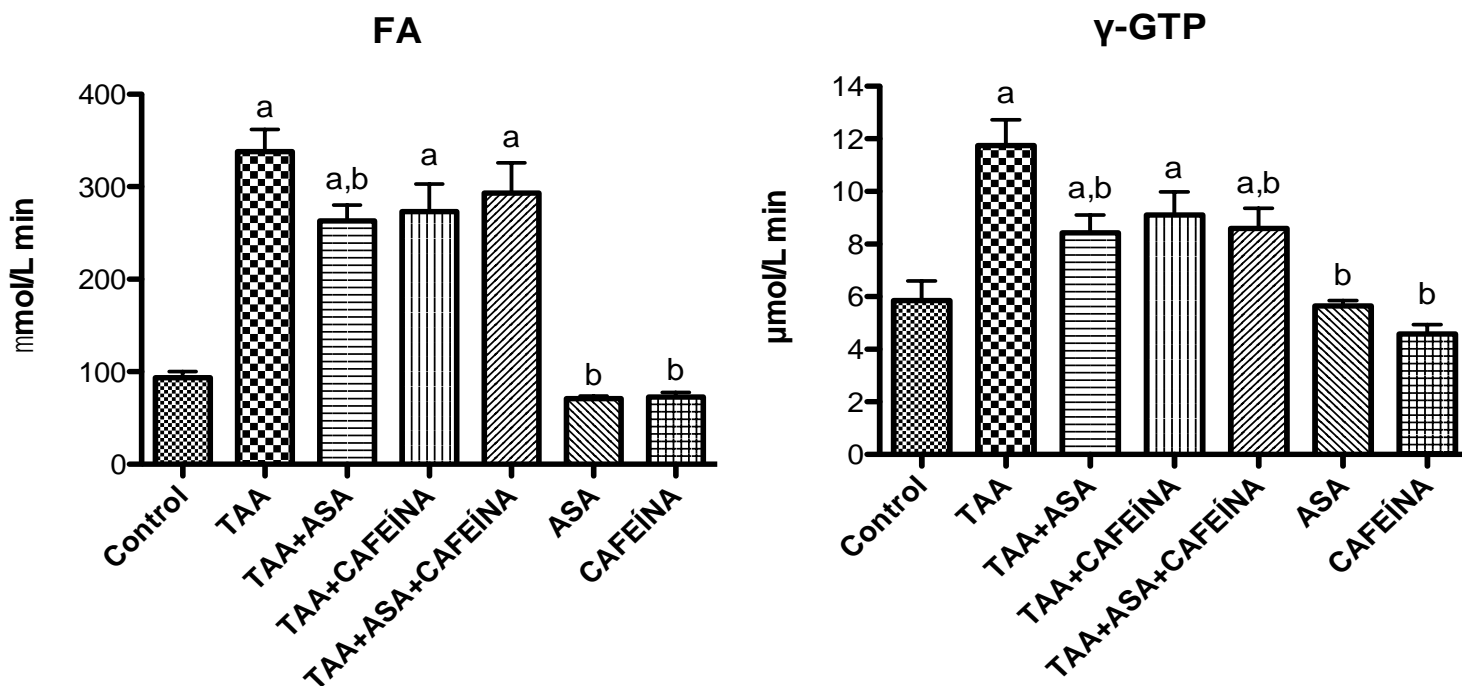


Figura 10. Actividad enzimática de FA y γ -GTP. Cada barra representa el promedio 6n de cada grupo \pm el error estándar. a) diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$. b) diferencia significativa con respecto al grupo de daño (TAA) $p < 0.05$.

10.3. Contenido de glucógeno hepático.

Una de las principales funciones del hígado es el almacenar glucosa en forma de glucógeno, siendo este la principal fuente de energía del organismo. La intoxicación crónica con TAA resultó en una disminución drástica del contenido de glucógeno en comparación con el grupo control (Fig. 11). La administración de AAS+Cafeína, así como Cafeína no mostraron un efecto hepatoprotector; sin embargo, AAS previno la depleción de glucógeno de manera significativa ($p \leq 0.05$).

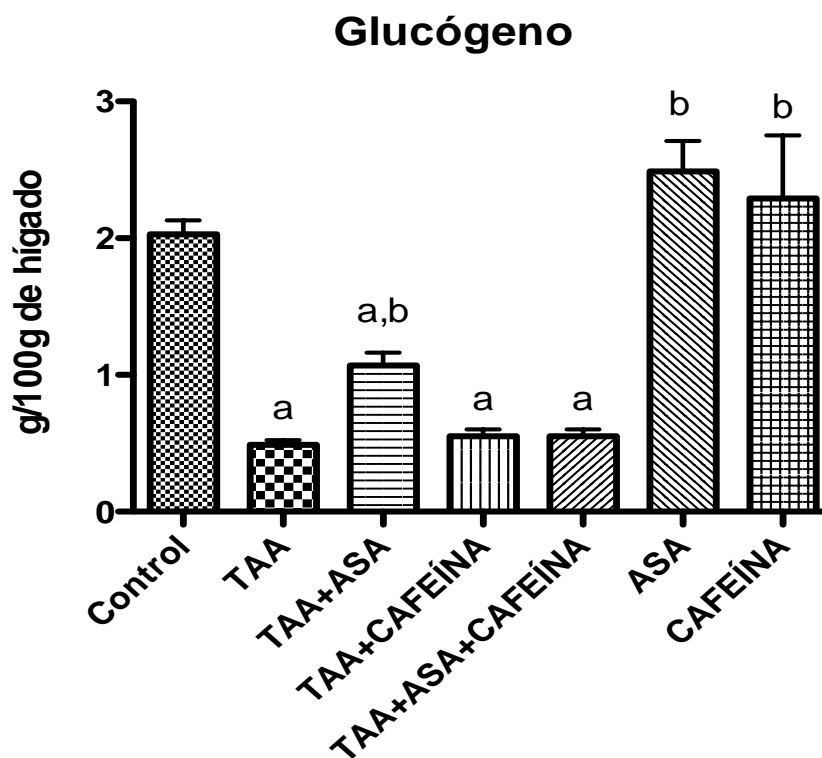


Figura 11. Contenido de glucógeno. Cada barra representa el promedio $6n$ de cada grupo \pm el error estándar. a) diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$. b) diferencia significativa con respecto al grupo de daño (TAA) $p < 0.05$.

10.4. Peroxidación lipídica.

El estrés oxidativo es un proceso importante en el establecimiento del daño hepático. La determinación de la peroxidación lipídica es un marcador de estrés oxidativo a nivel membranar, en el cual se cuantifica el malondialdehído (MDA) como uno de sus productos finales.

Se puede apreciar que el tratamiento con TAA llevo a un incremento en los niveles de MDA reflejando un estrés oxidativo, donde la administración de AAS y AAS+Cafeína disminuye significativamente los niveles de MDA, mientras que la Cafeína administrada por si sola pudo prevenir de forma total el estrés oxidativo (Fig. 12).

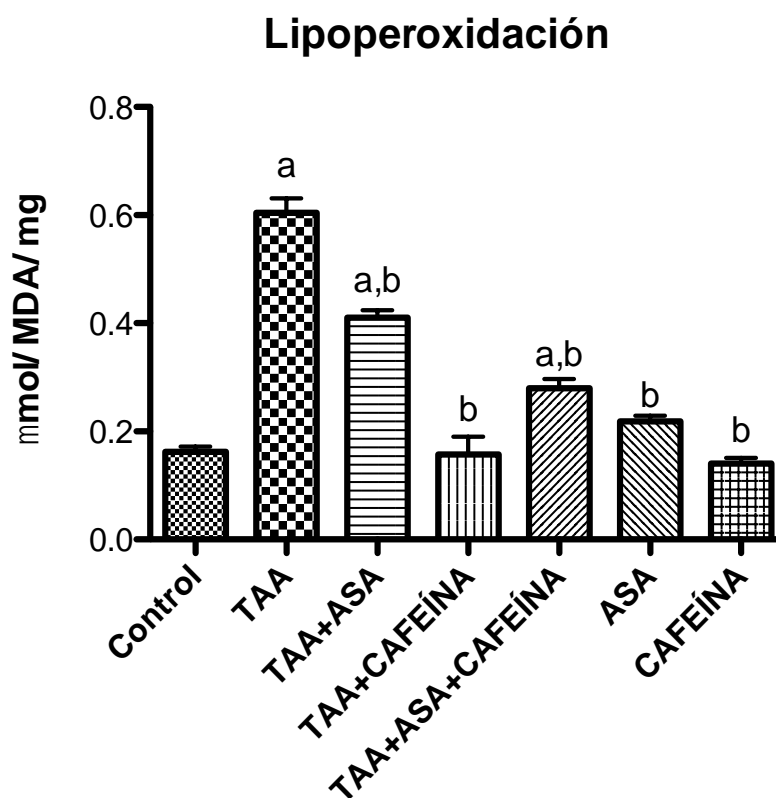


Figura 12. Determinación del grado de peroxidación lipídica. Cada barra representa el promedio \pm el error estándar. a) diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$. b) diferencia significativa con respecto al grupo de daño (TAA) $p < 0.05$.

10.5. Contenido de GSH.

El GSH es otro marcador de estrés oxidativo y es uno de los antioxidantes más importantes del sistema de defensa ante especies oxidantes, y un agotamiento en el contenido de este nos indica un desbalance en el equilibrio redox. Consistente con la peroxidación lipídica, el GSH también disminuye su contenido significativamente en el grupo tratado con TAA (Fig. 13, $p \leq 0.05$), en este caso AAS y Cafeína tanto en combinación como individualmente incrementaron el contenido de GSH significativamente.

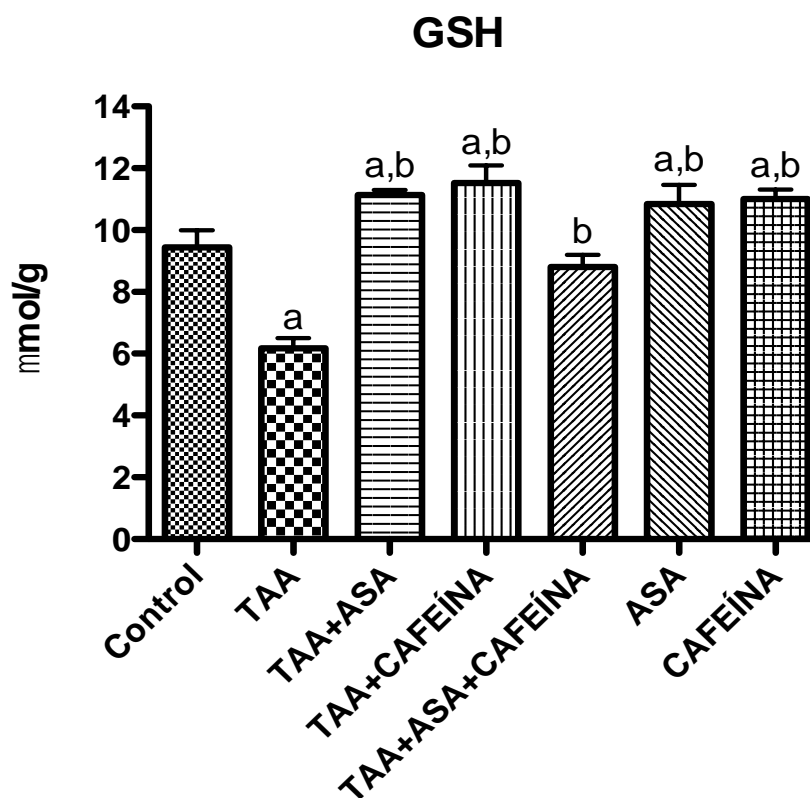


Figura 13. Determinación del contenido de GSH. Cada barra representa el promedio $6n$ de cada grupo \pm el error estándar. a) diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$. b) diferencia significativa con respecto al grupo de daño (TAA) $p < 0.05$.

10.6. Contenido de colágeno.

Una de las características de la fibrosis es el aumento en la síntesis de matriz extracelular principalmente de tipo colágeno.

En nuestro modelo con TAA se observó un aumento en el contenido de colágeno durante 8 semanas, de hasta 5 veces la cantidad de esta proteína con respecto al grupo control. De manera interesante los grupos administrados con AAS, Cafeína y AAS+Cafeína disminuyen el contenido de colágeno (Fig. 14). Este resultado lo corroboramos cuando observamos las tinciones histológicas de los diferentes grupos.

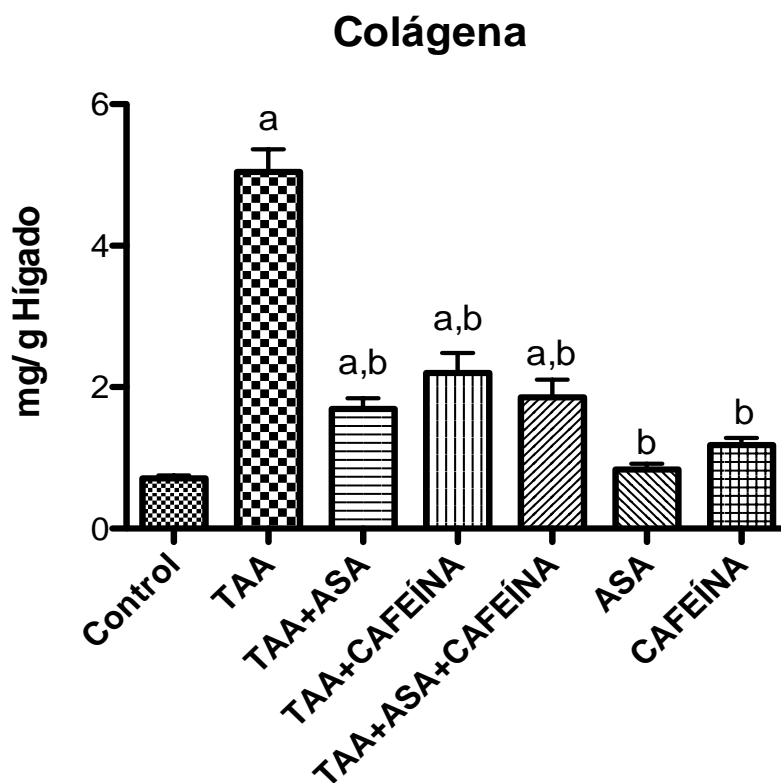


Figura 14. Determinación del contenido de colágeno. Cada barra representa el promedio $6n$ de cada grupo \pm el error estándar. a) diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$. b) diferencia significativa con respecto al grupo de daño (TAA) $p < 0.05$.

10.7. Histologías.

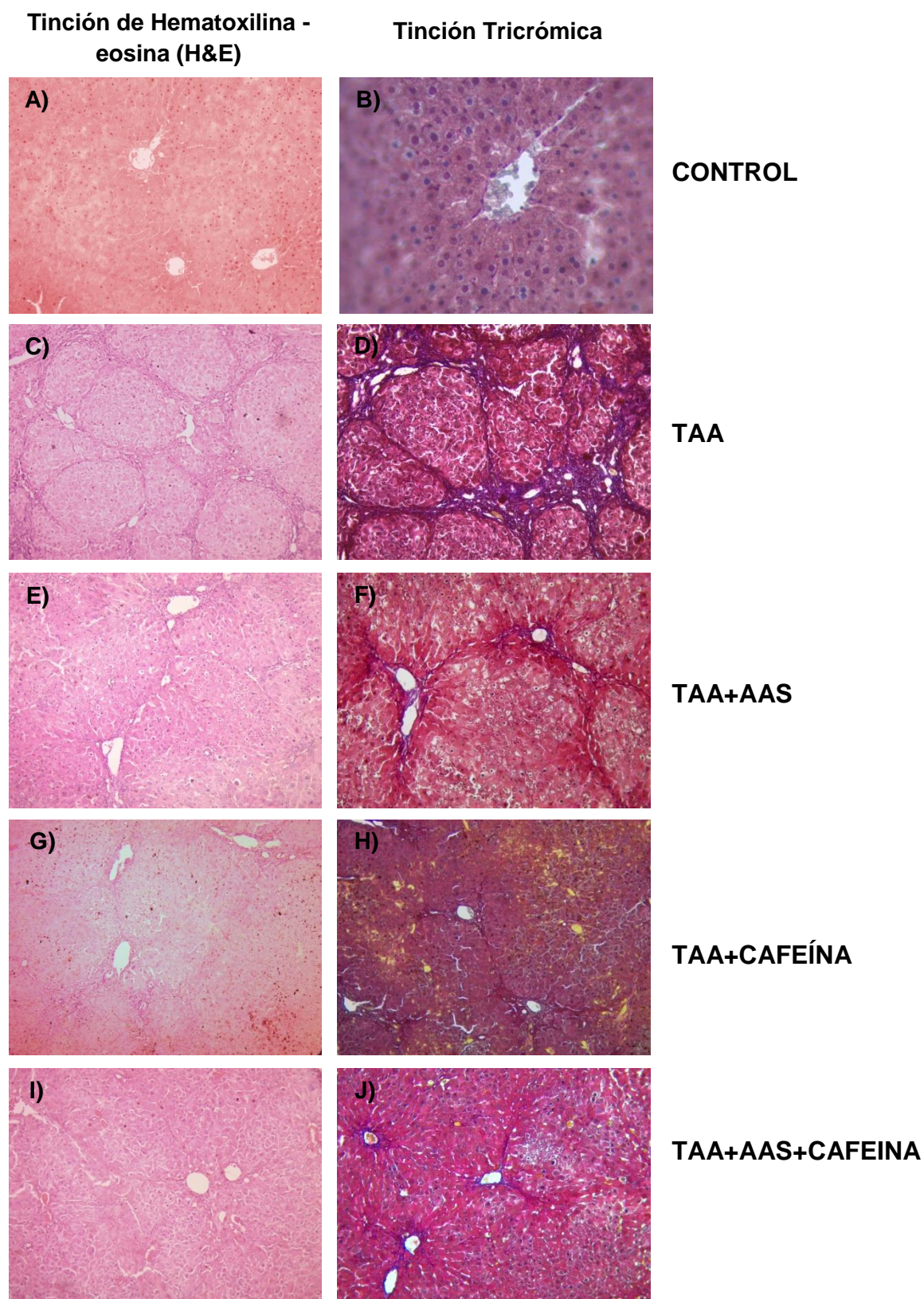


Figura 15. Histologías. Cortes histológicos de hígado, representativos de cada uno de los grupos teñidos con las técnicas hematoxilina y eosina y tricrómica de Mason para la identificación de fibras de colágeno depositadas en el tejido hepático, observadas al microscopio óptico objetivo 10x

Para corroborar los resultados de las pruebas bioquímicas, se realizaron dos tinciones: hematoxilina-eosina y tricrómica en cortes histológicos de hígado de rata de cada uno de los grupos. En la figura 15, en las imágenes correspondientes a los cortes histológicos del grupo control (A-B) observamos la arquitectura normal del hígado y la ausencia de fibras de colágeno; por el contrario en las imágenes pertenecientes al grupo TAA (C-D) se muestra claramente una importante distorsión de la arquitectura del parénquima y la presencia de zonas necróticas y fibras de colágeno las cuales podemos apreciar en color azul, lo cual es característico de la fibrosis hepática causado por el tratamiento crónico con TAA.

En los paneles que muestran las histologías de los grupos que recibieron tratamiento farmacológico: ASA más TAA (E-F), cafeína más TAA (G-H) y ASA+ Cafeína y TAA (I-J), se puede apreciar una disminución del daño celular y a la arquitectura del tejido así como de la deposición de matriz extracelular inducido por la TAA, corroborando así los resultados que obtuvimos en la determinación bioquímica del contenido de colágena que de igual manera no se observó diferencia entre los tres grupos.

10.8. Expresión de la citosina TGF- β .

La administración crónica de TAA por 8 semanas logró incrementar significativamente la expresión del TGF- β con respecto al grupo control (Fig. 16, $p \leq 0.05$), por otra parte el tratamiento farmacológico con ácido acetil salicílico (TAA+AAS) logro prevenir la sobre expresión del TGF- β de manera significativa.

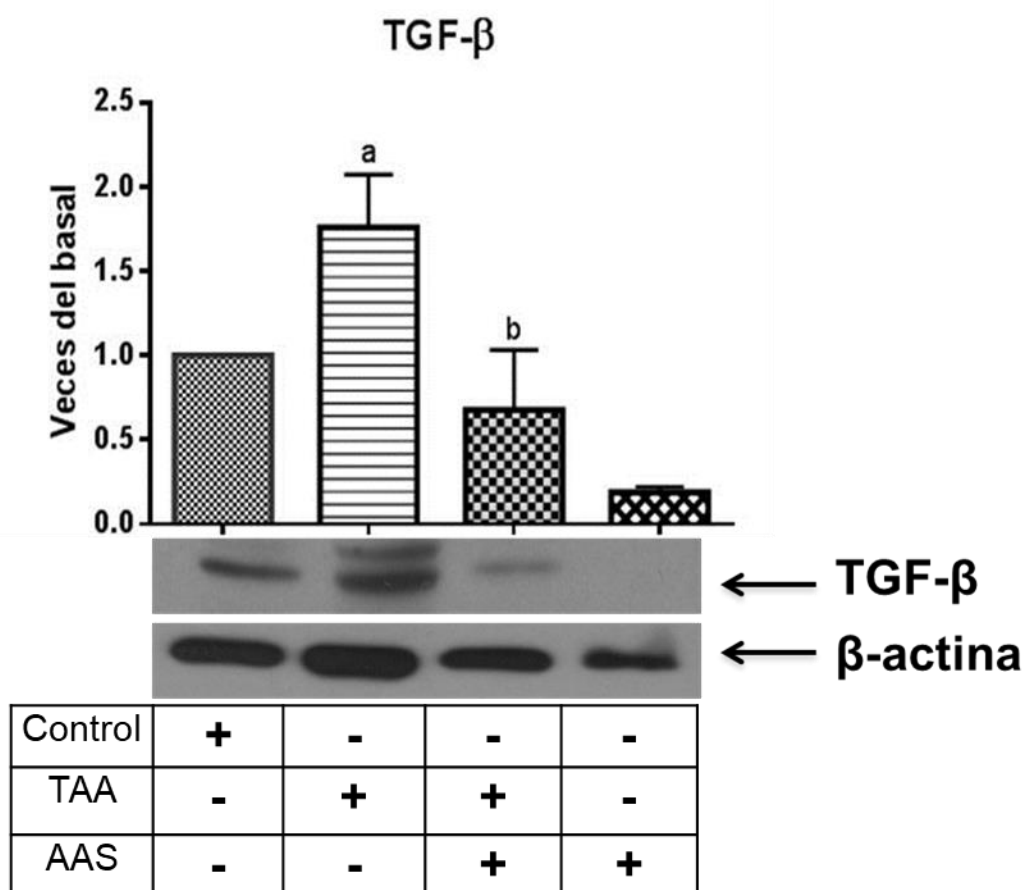


Figura 16. Análisis por Western blot de la expresión de TGF- β . Los valores son expresados como el incremento de la relación D.O. normalizada con el valor del grupo control (control = 1). Adicionalmente se muestra el control de carga β -actina. Las barras representan el promedio de tres ratas \pm el error estándar. a, diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$ b, diferencia significativa con respecto al grupo de TAA $p < 0.05$.

10.9. Expresión de la citocina α -SMA.

La alfa actina del músculo liso (α -SMA), es una proteína que se expresa primordialmente las CEH cuando estas se diferencian en tipo miofibroblasto. Se muestra que esta proteína se encuentra sobre expresada de manera significativa en el grupo de daño con respecto al grupo control. Sin embargo, el tratamiento con ácido acetil salicílico (TAA+AAS) se observa una reducción de la expresión de esta proteína de manera parcial pero significativa Fig. 17, $p \leq 0.05$).

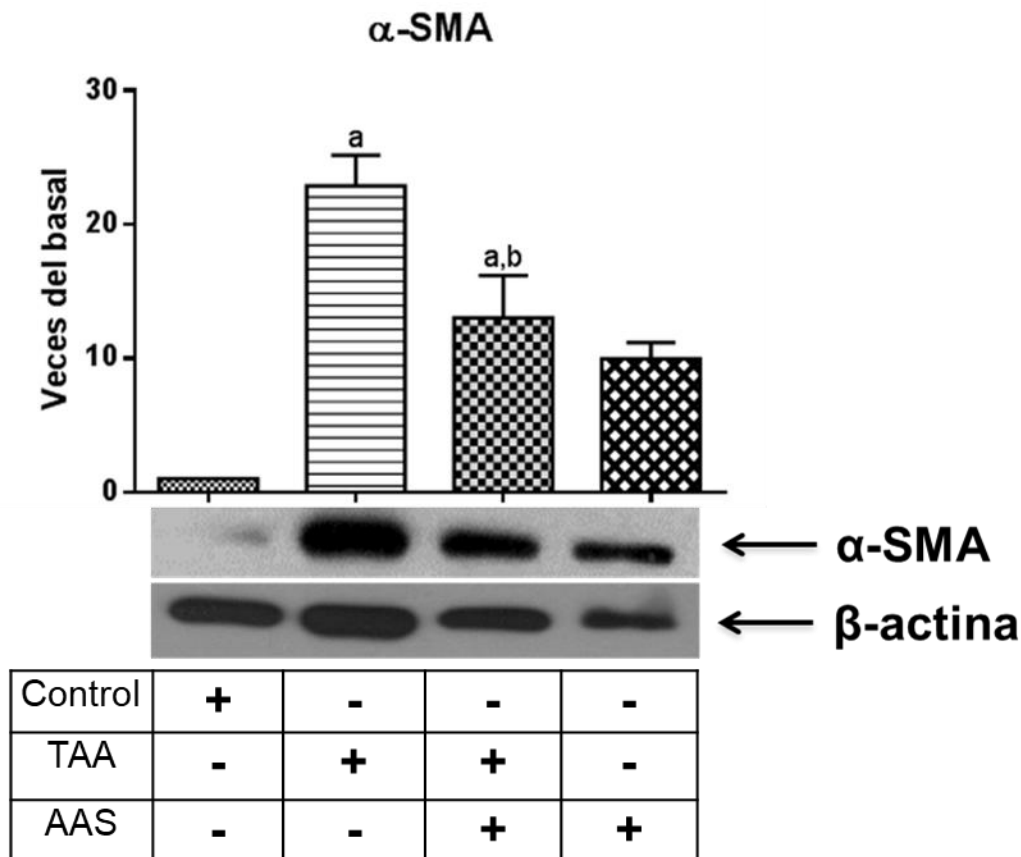


Figura 17. Análisis por Western blot de la expresión de α -SMA. Los valores son expresados como el incremento de la relación D.O. normalizada con el valor del grupo control (control = 1). Adicionalmente se muestra el control de carga β -actina. Las barras representan el promedio de tres ratas \pm el error estándar. a, diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$ b, diferencia significativa con respecto al grupo de TAA $p < 0.05$.

10.10. Expresión de la citocina IL-10.

La interleucina (IL-10) es una importante citocina inmunorreguladora que es capaz de inhibir la síntesis de citocinas proinflamatorias producidas por macrófagos y células T. Se puede observar en el grupo de daño un incremento significativo con respecto al control (Fig. 13), pero la administración de AAS (TAA+AAS) logró prevenir de manera significativa la expresión de la IL-10 producida por TAA.

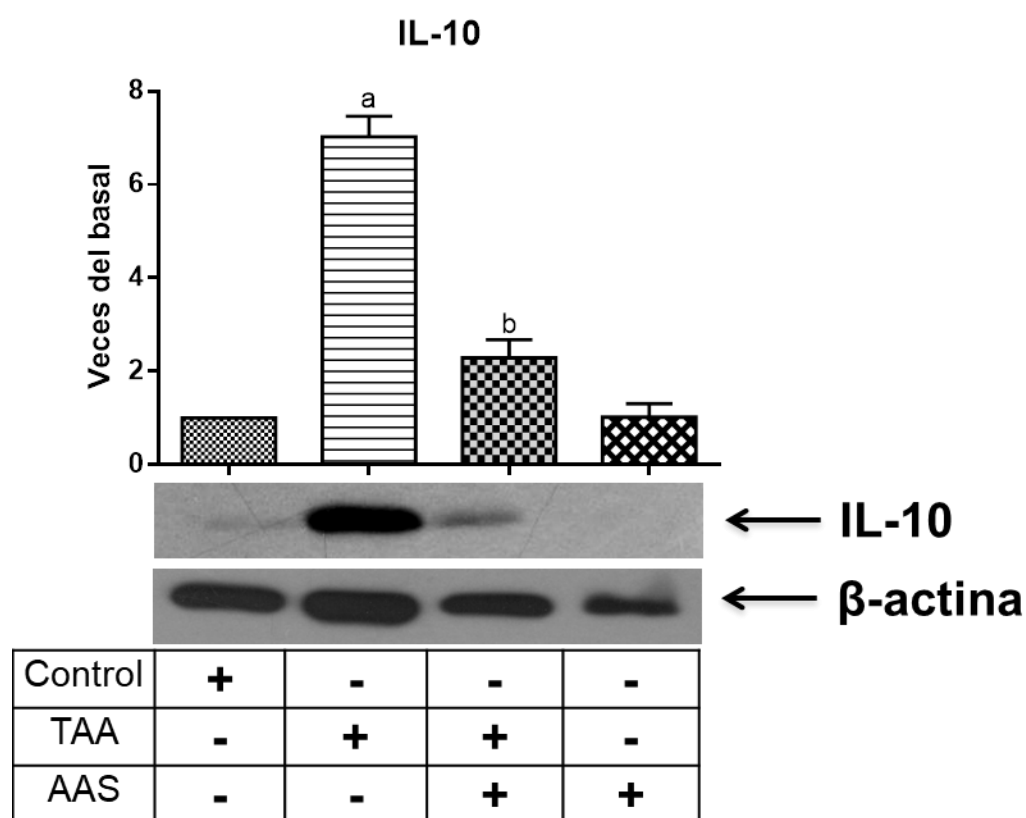


Figura 18. Análisis por Western blot de la expresión de IL-10. Los valores son expresados como el incremento de la relación D.O. normalizada con el valor del grupo control (control = 1). Adicionalmente se muestra el control de carga β -actina. Las barras representan el promedio de tres ratas \pm el error estándar. a, diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$ b, diferencia significativa con respecto al grupo de TAA $p < 0.05$.

10.11. Expresión de COX-2.

En el grupo de daño (TAA) podemos observar una evidente sobreexpresión de COX-2 (Fig. 19), el cual es el reflejo del proceso inflamatorio a causa de la administración crónica de TAA. De manera interesante se muestra que el tratamiento con ASA fue capaz de prevenir el aumento de la expresión de COX-2 de manera total.

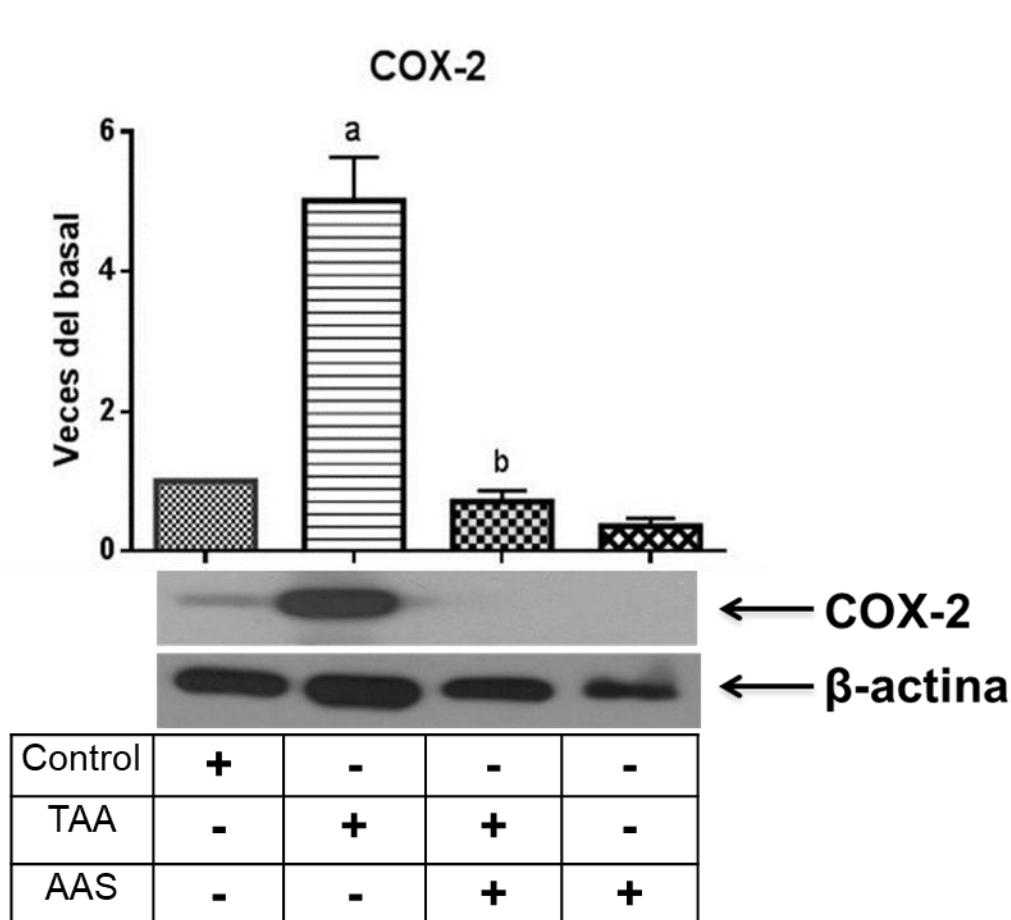


Figura 19. Análisis por Western blot de la expresión de COX-2. Los valores son expresados como el incremento de la relación D.O. normalizada con el valor del grupo control (control = 1). Adicionalmente se muestra el control de carga β -actina. Las barras representan el promedio de tres ratas \pm el error estándar. a, diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$ b, diferencia significativa con respecto al grupo de TAA $p < 0.05$.

11. DISCUSION.

La cafeína es un compuesto que actúa en el SNC y se encuentra presente en varias plantas, por ejemplo, en granos de cacao, en el té y principalmente en el café, el cual es una de las bebidas más ingeridas en el mundo. Diversos estudios han reportado que la cafeína previene la fibrosis experimental por el bloqueo de la citocina profibrogénica TGF- β . Por otro lado, uno de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) más empleados es el ASA por sus propiedades analgésicas, antipiréticas y como antiagregante plaquetario en la prevención de la enfermedad coronaria en pacientes que cursan con arterosclerosis. Estudios recientes sugieren que el ASA atenúa la fibrosis hepática en modelos experimentales. En este trabajo nos centramos en evaluar y comparar los efectos de la cafeína y el ASA en un modelo de fibrosis hepática experimental, en el cual se muestra que ambos fármacos previenen la fibrosis inducida por TAA.

Las principales causas de la fibrosis/cirrosis hepática incluyen el abuso en el consumo de alcohol, infecciones a causa de virus de hepatitis B o C, colestasis y esteatohepatitis no alcohólica. La cirrosis es la consecuencia final de la fibrosis la cual se caracteriza por la formación de nódulos de regeneración y con función hepática alterada. La fibrosis hepática resulta del daño crónico y a la capacidad del hígado para regenerarse, los hepatocitos son sustituidos por MEC. La alteración de la cantidad y composición de la MEC es una característica de la mayoría de las enfermedades hepáticas crónicas [Bataller y Brenner, 2005].

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

acumulado en las últimas dos décadas. Estos estudios muestran una reducción en los niveles de las enzimas hepáticas, lo cual se relaciona con la disminución en la probabilidad de desarrollar cirrosis y hepatocarcinoma, y por lo tanto constituyen una muestra de datos epidemiológicos, así como evidencias biológicas y clínicas [La Vecchia, 2005].

Interesantemente, la administración de cafeína y ASA previenen significativamente la necrosis de los hepatocitos, esto lo comprobamos por la disminución de la actividad de ALT, siendo este el más importante marcador estándar de necrosis de las células hepáticas. Además previnieron parcialmente el daño colestásico al observarse una reducción de los niveles de FA y γ -GTP. De manera similar al utilizar ambos fármacos en conjunto muestran este mismo efecto, aunque al evaluar la funcionalidad del tejido tras la administración de TAA, solo el tratamiento con ASA mostro una mejora en el mantenimiento de las reservas de glucógeno. Estos resultados nos sugieren un posible efecto hepatoprotector.

El estrés oxidativo es un fenómeno que está estrechamente ligado a las enfermedades crónicas del hígado [Cesaratto y cols, 2004] por ejemplo: la fibrosis hepática asociada al consumo crónico del alcohol, así como con la infección de virus de la hepatitis B o C, inducen un aumento en la producción de las ROS independiente y sinérgicamente, y a su vez las ROS participan en el desarrollo de la fibrosis / cirrosis hepática en estas condiciones patológicas [De Minicis y Brenner, 2008; Runzhi Z. y cols 2012]. Las células poseen sistemas antioxidantes eficientes para prevenir el aumento de las ROS y prevenir el estrés oxidativo, uno de estos sistemas es el GSH, el cual es uno de los más importantes. En este trabajo se muestra que el grupo que fue administrado con TAA disminuyó el contenido de GSH de manera significativa respecto al grupo control. Por otra parte, cuando se utiliza cafeína y ASA se observó una prevención en la disminución del contenido de GSH. El mismo efecto se mostró al administrar ambos fármacos. Además, la TAA causa un aumento significativo

en los niveles de MDA, uno de los principales productos de la peroxidación lipídica resultado del aumento del estrés oxidativo a nivel membranal.

Tanto la cafeína como el ASA mostraron la misma capacidad para disminuir los niveles de MDA, de esta manera ambos farmacos poseen efectos antioxidantes.

Las CEH juegan un papel crucial en la fibrosis hepática, en respuesta al daño hepático estas pierden su capacidad de almacén de vitamina A, sometiéndose a cambios funcionales y morfológicos lo cual es un proceso complejo llamado "activación". Este proceso es caracterizado por una alta proliferación celular y transdiferenciación a miofibroblastos. Una vez activadas las CEH aumentan la síntesis de colágeno fibrilar (colágeno tipo I y tipo III) y son el principal tipo de células que produce MEC en el tejido del hígado dañado [Consolo y cols, 2009]. la administración crónica de TAA aumenta la síntesis y el contenido de colágena con respecto al grupo control, pero al administrar cafeína, ASA y en combinación previenen la acumulación del contenido de colágena siendo este un punto medular en la prevención del proceso fibrótico. Estos datos fueron corroborados por los estudios histopatológicos, las tinciones (H y E y Tricrómica) del grupo tratado con TAA nos muestra una deposición excesiva de matriz extracelular, la cual fue disminuida de manera significativa por el ASA, cafeína y en forma concomitante.

Los datos obtenidos de las pruebas bioquímicas, nos sugieren que la administración conjunta de cafeína y ASA no muestran diferencia significativa alguna que al compararlos con la administración individual. En este trabajo decidimos realizar la evaluación molecular del grupo tratado con ASA considerando que es el que mejor efecto se observó.

La fibrosis hepática resulta del proceso de cicatrización del tejido en respuesta a un estímulo inflamatorio persistente. El principal mecanismo de acción del ASA es la inhibición de COX; enzima responsable de la síntesis de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. Existen dos isoformas de COX, la forma constitutiva: COX-1, la cual se encuentra presente en varios tejidos bajo

condiciones fisiológicas y la forma inducible: COX-2, generalmente expresada durante procesos inflamatorios. Existen varios reportes que muestran una sobre expresión de COX-2 en el daño hepático crónico tanto en humanos como en modelos experimentales [Chávez E. y cols. 2012]. En este estudio la administración de ASA inhibió la sobreexpresión de COX-2 inducida por el tratamiento crónico con TAA.

La prostaglandina E2 (PGE2), producto de la vía de COX, es un mediador importante en la comunicación en las células de Kupffer y los hepatocitos y aumenta los niveles de TGF- β y la expresión de su receptor [Liu H. y cols. 2007]. Diversos estudios demuestran que la respuesta fibrogénica en el hígado es altamente regulada por el TGF- β , ya que induce la diferenciación de las HSCs a tipo miofibroblasto, los cuales aumentan la síntesis de proteínas de la MEC [Gressner et al., 2002], aunado paralelamente con un descenso en la actividad proteolítica general de MEC y en consecuencia altera el equilibrio normal entre la síntesis y la degradación de sus componentes [Wells, 2000]. Interesantemente, ASA previno por completo la sobre expresión de TGF- β inducida por TAA y como consecuencia previno la fibrosis hepática, lo cual corroboramos en el análisis histopatológico y la cuantificación de colágeno.

En respuesta a su activación, las HSCs muestran un aumento de la expresión de la α -SMA en el citoplasma [Geerts, 2001; Safadi y Friedman, 2002]. La α -SMA es una isoforma de actina y un marcador específico de la diferenciación celular del músculo liso. Por lo tanto, la expresión de la α -SMA ha sido utilizada para identificar las HSCs activadas que muestran un fenotipo miofibroblástico [Carpino y cols, 2005]. Nuestros resultados muestran un aumento en la expresión de α -SMA en el grupo tratado con TAA indicándonos así que la administración TAA promueve la activación de las CEH. En cambio el tratamiento con ASA, disminuyo la expresión de la α -SMA de manera parcial pero significativa.

Por otra parte, las citocinas son mediadores de diversos estímulos en el hígado como la inflamación, la muerte celular, colestasis y fibrosis, pero, paradójicamente, también son mediadores en la regeneración del hígado después de una lesión [Friedman, 2000; Tilg y Diehl, 2000]. La IL-10 es producida por linfocitos del tipo Th2, así como por monocitos, macrófagos y diversos tipos celulares. Es una citocina inmunosupresora por excelencia, inhibiendo la síntesis de muchas otras citocinas, la cual regula a la baja la respuesta proinflamatoria y tiene un efecto modulador sobre la fibrogénesis hepática [Hung, 2005]. Los presentes resultados muestran que interesantemente el tratamiento con ASA disminuye el proceso inflamatorio ya que no se IL-10 no se sobreexpresa, contrario a lo que observamos en donde se utilizó TAA. Esto sugiere que la administración de ASA previene el proceso de inflamación hepática.

12. CONCLUSIONES.

Los presentes resultados nos sugieren que la administración de ASA y cafeína así como en conjunto previenen la fibrosis experimental inducida por la administración de TAA.

La cafeína tiene un papel muy importante en la prevención del daño inducido por TAA, posiblemente el mecanismo de acción se debe a sus propiedades antioxidantes, pero principalmente por el bloqueo de la citocina profibrogénica TGF- β y esta a su vez disminuye la diferenciación de las células estelares hepáticas al tipo miofibroblasto teniendo como consecuencia una atenuación de la síntesis excesiva de MEC, lo cual se observamos en la cuantificación de colágeno y análisis histopatológico.

Además, en este trabajo se observó que el AAS ejerce sus efectos hepatoprotectores por la inhibición de COX-2, reduciendo la inflamación y en consecuencia disminuye la expresión de IL-10 y de la citosina profibrogénica TGF- β , esto da como resultado una reducción en la proliferación y activación de las CEH al analizar el resultado en la expresión de α -SMA. Sin embargo, tomando en cuenta los datos obtenidos no se observó sinergia al utilizar los fármacos en conjunto. Hasta este punto es prematuro determinar cuál fármaco es mejor que otro, para esto es necesario realizar más experimentos.

13. BIBLIOGRAFIA

Arauz J, Moreno MG, Cortés-Reynosa P, et al. Coffee attenuates fibrosis by decreasing the expression of TGF- β and CTGF in a murine model of liver damage. *J Appl Toxicol*. 2013;33(9):970-9.

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 Mar-Apr;15(2):160-73.

Arauz J, Zarco N, Segovia J, et al. Caffeine prevents experimental liver fibrosis by blocking the expression of TGF- β . *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2014;26(2):164-73.

Bacon D y Di Bisceglie M. *Liver Disease. Diagnosis and Management*. Churchill Livingstone, New York, 2000.

Battaller R y Brenner DA: *Liver Fibrosis J Clin Invest*. 2005 Feb;115(2):209-18.

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; 72:248–254.

Carmona-Cuenca I, Roncero C, Sancho P, y cols. Upregulation of the NADPH oxidase NOX4 by TGF-beta in hepatocytes is required for its pro-apoptotic activity. *J. Hepatol*. 2008;49: 965–976.

Castro JA, D'acosta N, De Ferreira EC, y cols. Studies on thioacetamide induced liver necrosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 1974;30:79-86.

Carpino G, Morini S, Ginanni Corradini S, y cols. Alpha-SMA expression in hepatic stellate cells and quantitative analysis of hepatic fibrosis in cirrhosis and in recurrent chronic hepatitis after liver transplantation. *Dig. Liver Dis* 2005;37:349–356.

Cesaratto L, Vascotto C, Calligaris S, Tell G. The importance of redox state in liver damage. *Ann Hepatol*. 2004;3: 86-92.

Chávez E, Castro-Sánchez L, Shibayama M et al. Effects of acetyl salicylic acid and ibuprofen in chronic liver damage induced by CCl₄. *J Appl Toxicol*. 2012 Jan;32(1):51-9.

Consolo M, Amoroso A, Spandidos DA, Mazzarino MC. Matrix metalloproteinases and their inhibitors as markers of inflammation and fibrosis in chronic liver disease (Review). *Int J Mol Med* 2009;24:143–152.

David B. Páramo Hernández, MD, William Otero Regino, MD, Luis F. Pineda Ovalle, MD. *Fibrogenesis Hepatica Rev Col Gastroenterol / 25 (2) 2010*

De Leve L, Kaplowitz N. Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* 1991;52:287-305.

De Minicis S, Brenner D. Oxidative stress in alcoholic liver disease: role of NADPH oxidase complex. *J. Gastroenterol Hepatol* 2008;23:98–103.

Elpek GÖ. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update. *World J Gastroenterol*. 2014 Jun 21;20(23):7260-76.

- Evans P, Halliwell B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Brit J Nutr* 2001;85:67-74.
- Evans TRJ, Kayle SB. Retinoids: present role and future potential. *British J Cancer* 1999;80:1-8.
- Fitzhugh OG y Nelson AA. Liver tumors in Rats Fed thiourea or thioacetamide. *Science* 1948;108:626-628.
- Friedman S. Liver fibrosis-from bench to bedside. *J of Hepatol* 2003;38:s38-s53.
- Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000;275:2247-2250.
- Friedman S. The cellular basis of hepatic fibrosis: mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993;328:1828-1835.
- Geerts A. History heterogeneity developmental biology and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liv Dis* 2001;21:311-335.
- Glossman M, Neville DM. Glutamyl transferase in kidney brush border membranes. *FEBS Lett* 1972; 19:340-344.
- Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002;7:793-807.
- Guyton A, Hall J. *Tratado de Fisiología Medica*, 10a edición. Mc Graw-Hill Interamericana México D.F.
- Harrison EH. Symposium Mechanistic aspects of vitamin and coenzyme utilization and function: A symposium in recognition of distinguished career of Donald B. McCormik. *J Nutrition* 2000;130:340S-344S.
- Heffner, JE y Repine JE. Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Respir Dis* 1989;140: 531-54.
- Heussen C, Dowdle EB. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem* 1980; 102:196-202.
- Highleyman L, Franciscus A. Introducción sobre el hígado. Hepatitis c support project [on line]. 2003, versión 1.0.
- Hissin PJ, Hilf RA. 1976. Fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 74: 214-226.
- Hung KS, Lee TH, Chou WY, y cols. Interleukin-10 gene therapy reverses thioacetamide-induced liver fibrosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;14: 324-331.
- Hunter AJ, Holscher MA, Neal RA. Thioacetamide-induced hepatic necrosis I. Involvement of the mixed-function oxidase enzyme system. *J Pharmacol Exp Ther* 1977;200:439-448.

Iredale J. Cirrhosis: new research provides a basis for rational and targeted treatments. *B M J* 2003;327:143-147.

Jiang ZG, Feldbrügge L, Tapper EB, et al. Aspirin use is associated with lower indices of liver fibrosis among adults in the United States. *Aliment Pharmacol Ther.* 2016;43(6):734-43.

Ke-Qin Hu. Cyclooxygenase 2 (COX2)-prostanoid pathway and liver diseases. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 2003; 69: 329-337

La Vecchia CL. Coffee, liver enzymes, cirrhosis and liver cancer. *J Hepatol* 2005;42: 444–446.

Liu F, Wang X, Wu G, et al. Coffee Consumption Decreases Risks for Hepatic Fibrosis and Cirrhosis: A Meta-Analysis. *PLoS One.* 2015 10;10(11):e0142457.

Liu H, Peng Y, Liu F, Li J, et al. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor decreases transforming growth factor-beta1 synthesis and matrix production in human peritoneal mesothelial cells. *Cell Biol Int.* 2007 May;31(5):508-15

Méndez N, Uribe M. *Conceptos actuales en hepatología.* Masson Doyma México, S.A. 2003.

Meredith MJ, Reed DJ. Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte. *J Biol Chem.* 1982 Apr 10;257(7):3747-53

Michalopoulos GK. Liver Regeneration. Mini review. *J Cell Physiol* 2007;213:286-300.

Muriel P, Arauz J. Coffee and liver diseases. *Fitoterapia.* 2010 ;81(5):297-305.

Muriel P, Arauz J. *Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention.* “Capítulo 7: Coffee and liver health” John Wiley & Sons 2012 pag:123-153.

Muriel P. *Liver Pathophysiology: Therapies and antioxidants.* “Chapter 1: The liver: general aspects and epidemiology” Academic Press 2017 pag. 4-22.

Muriel P. Some experimental models of liver damage. In Sahu S (ed). *Hepatotoxicity: from genomics to in vitro and in vivo models.* John Wiley and Sons LTD, West Sussex, UK, 2007(a) 119-137.

Natarajan SK, Thomas S, Ramamoorthy P, y cols. Oxidative stress in the development of liver cirrhosis: a comparison of two different experimental models. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21: 947–957.

Nohl H, Hegner D. Evidence for the existence of catalase in the matrix space of rat heart mitochondria. *FEBS Lett* 1978;253:5051-63.

Núñez M, Puoti M, Camino N, Soriano V. Treatment of chronic hepatitis B in the human immunodeficiency virus-infected patient: present and future. *Clin Infect Dis.* 2003 Dec 15;37(12):1678-85

Núñez Martínez Óscar, Clemente Ricote Gerardo y García Monzón Carmelo. Papel de la ciclooxigenasa 2 en la patogenia de las enfermedades del hígado. *Med Clin (Barc)* 2003; 121(19): 743-8

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

Olaso E, Fridman S. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis. *J of Hepatol* 1998;29:836-847.

Park SY, Shin HW, Lee KB, Lee MJ, Jang JJ. Differential expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in thioacetamide-induced chronic liver injury. *J Korean Med Sci* 2010;25: 576-576.

Perlemuter G, Letteron P, Carnot F, Zavala F, Pessayre D, Nalpas B, Brechot C. Alcohol and hepatitis C virus core protein additively increase lipid peroxidation and synergistically trigger hepatic cytokine expression in a transgenic mouse model. *J Hepatol* 2003;39:1020–1027.

Poujol-Robert A, Boëlle PY, Conti F, et al. Aspirin may reduce liver fibrosis progression: Evidence from a multicenter retrospective study of recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2014;38(5):570-6.

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

Reshi ML, Su YC, Hong JR. RNA Viruses: ROS-Mediated Cell Death. *Int J Cell Biol*. 2014; 2014:467452.

Rojkind, M., González, E. An improved method for determining special radioactivities of proline and hydroxyproline. *Anal Biochem* 1974;57:1-7.

Runzhi Zhu, Yajing Wang, Liangqing Zhang and Qinglong Guo. Oxidative stress and liver disease. *Hepatology Research* 2012; 42: 741–749

Safadi R, Friedman SL. Hepatic fibrosis – role of hepatic stellate cell activation. *Med Gen Med* 2002;15:4–27.

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

Sergio Duarte, John Baber, Takehiro Fujii, and Ana J. Coito: Matrix metalloproteinases in liver injury, repair and fibrosis *Matrix Biol*. 2015 ; 0: 147–156

Sies H, Stahl W. Vitamine E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidant. *Am J Clin* 1995;62:1315-1321.

Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:145-82.

Stocker R, Bowry VW, Frei B. Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88:1646-50.

Theise N. Robbins & Cotran Pathologic Basis of disease Ninth edition “Chapter 18: Liver and Gallbladder” Elsevier 2015. Pag. 821-881.

Tilg H, Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2000;343:1467–1476.

Treyer A, Müsch A. Hepatocyte polarity. *Compr Physiol*. 2013 Jan;3(1):243-87.

V. Sánchez-Valle, N.C. Chávez-Tapia, M. Uribe and N. Méndez-Sánchez. Role of Oxidative Stress and Molecular Changes in Liver Fibrosis: A Review. *Current Medicinal Chemistry*, 2012; 19:4850-4860

Wang F, Yang JL, Yu KK, et al. Activation of the NF- κ B pathway as a mechanism of alcohol enhanced progression and metastasis of human hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer*. 2015 27;14:10.

Weiss SJ. Oxygen, ischemia, inflammation. *Acta Physiol. Scand* 1986;548:9-37.

Wells RG. Fibrogenesis. V. TGF-beta signaling pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279:845-850.

Yin C, Evason KJ, Asahina K, Stainier DY. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. *J Clin Invest*. 2013 May;123(5):1902-10.

Zakim D. In: *Fisiopatología: principios biológicos de la enfermedad* (eds. Smith LH & Thier) 1138-1177 (Médica Panamericana, México, 1999).

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