



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

“EFECTO DEL CAFÉ EN LA ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICA INDUCIDA EXPERIMENTALMENTE EN UN MODELO MURINO”

Tesis que presenta:

C. Rosa Patricia Cruz Nieves

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias de la Salud

Director de tesis:

Dr. Jonathan Isaac Arauz Cabrera

Mexicali, Baja California

Octubre, 2019

Este trabajo se realizó en el Departamento de Farmacología en la Facultad de Medicina de Mexicali de la Universidad Autónoma de Baja California, bajo la tutoría del Doctor Jonathan Isaac Arauz Cabrera.

DEDICATORIA

La presente tesis se la dedico a mi familia que gracias a su apoyo y palabras de aliento crecí como persona. A mis padres Rafael Cruz Casanova (Q.E.P.D) y Gloria Alicia Nieves Bernal por ser un gran ejemplo a seguir. A mi esposo Gerardo Ruíz Méndez por su apoyo incondicional. A mi hijo Gerardo Ruíz Cruz por ser mi motivación. A mis hermanos Magdalena, Antonio y Alejandro para motivarlos a seguir adelante. A mis maestros por su paciencia. A mis alumnos por ser mi inspiración.

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia agradezco a mis maestros: Jonathan Isaac Arauz Cabrera, Octavio Galindo Hernández, José Gustavo Vázquez Jiménez, Rafael Iván Ayala Figueroa y Nicolás Addiel Serafín Higuera, personas de gran sabiduría, quienes se han esforzado por ayudarme a llegar al punto en el que me encuentro. El proceso no ha sido sencillo, pero gracias por guiarme en este largo camino y por el empeño que mostraron al transmitirme sus conocimientos así como su paciencia y tiempo. Su dedicación ha sido la piedra angular en mi formación y gracias a ustedes he logrado importantes objetivos para culminar el desarrollo de mi tesis con éxito y obtener una afable culminación del posgrado.

También agradezco a mis compañeras de maestría, a Jazmín Loera Ramos, por su ayuda, paciencia y orientación y a Gabriela López Almada por su apoyo. Así como a los médicos pasantes del servicio social y estudiantes de pregrado que colaboraron en el desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE

1. ABSTRACT	4
2. RESUMEN	
3. INTRODUCCIÓN	7
3.1 Generalidades del hígado	7
3.2 Lobulillo hepático	10
2.3 Tipos celulares	11
4. DAÑO HEPÁTICO	14
4.1 Clasificación del daño hepático	15
4.1.1 Agudo	15
4.1.2 Crónico	15
4.2 Enfermedad por hígado graso no alcohólica (EHGNA)	16
4.2.1 Definición de la EHGNA	16
4.2.2 Epidemiología de la EHGNA	16
4.2.3 Fisiopatogenia de la EHGNA	17
4.2.4 Lipotoxicidad	18
4.2.5 Estrés oxidativo	19
4.3 Diagnóstico y tratamiento de la EHGNA	24
5. EL CAFÉ Y SU RELACIÓN CON LAS ENFERMEDADES HEPÁTICAS	25
5.1 Generalidades del café	25
5.2 Efectos benéficos del café sobre la salud humana	26
5.3 El café en las enfermedades hepáticas	27
6. MODELOS EXPERIMENTALES DE DAÑO HEPÁTICO	29
6.1 Generalidades	29
6.2 Modelo de hígado graso por consumo de dieta rica en grasas.	29
6.3 Modelo de hígado graso por consumo de fructosa.	30
7. JUSTIFICACIÓN	31
8. HIPÓTESIS	32
9. OBJETIVOS	32
10. METODOLOGÍA	33
11. RESULTADOS	41
12. DISCUSIÓN	51
13. CONCLUSIONES	57
14. RECURSOS FINANCIEROS E INFRAESTRUCTURA	58
15. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

I. ABSTRACT

Different observational studies report that coffee consumption improves the liver profile by decreasing liver enzymes, in addition to reducing the risk of developing a chronic liver disease. However, the mechanism of action has not been established.

The aim of this study was to evaluate the hepatoprotective properties of coffee in a model of liver damage produced by a diet rich in fat and 20% fructose drink (HFD) in male rats of the Wistar strain, for 18 weeks. Concomitantly, boiled, unfiltered coffee was administered daily at a dose of 250 mg / kg orally through an orogastric cannula. Coffee was administered in the same way to the control group.

The lipid profile was analyzed (cholesterol, HDL, LDL and triglycerides). The activity of Alanine Amino Transferase (ALT) and Gamma Glutamyl Transpeptidase (γ -GTP) in plasma was quantified. In samples of liver tissue, the content of collagen, lipidic peroxidation and reduced glutathione (GSH) was determined. Histopathological study was carried out and expression of TGF- β was measured by means of Western blot.

The consumption of a western diet during 18 weeks produced an important dyslipidemia, increased the levels of γ -GTP and partially those of ALT. In the liver there is an increase in lipid peroxidation, a decrease in reduced Glutathione (GSH) and collagen content, as well as glycogen depletion. In addition there was an increase in TGF- β expression.

Coffee prevented most of the alterations produced by HFD. It was able to prevent the increase in the activity of liver enzymes as well as oxidative stress and the depletion of both collagen and glycogen.

II. RESUMEN

Distintos estudios observacionales reportan que el consumo de café mejora la función hepática, corroborándose por la disminución de las enzimas hepáticas, además de reducir el riesgo de desarrollar una enfermedad hepática crónica. Sin embargo, el mecanismo de acción no ha sido establecido.

El objetivo de este estudio fue evaluar las propiedades hepatoprotectoras del café en un modelo de daño hepático producido por una dieta rica en grasas y bebida de fructosa al 20% (HFD) en ratas macho de la cepa Wistar, durante 18 semanas. De manera concomitante se administró diariamente, café hervido, no filtrado a dosis de 250 mg /kg vía oral mediante una cánula orogástrica. Se administró café de la misma manera al grupo control.

Se analizó el perfil lipídico (colesterol, HDL, LDL y triglicéridos). Se cuantificó la actividad de la Alanino Amino Transferasa (ALT) y Gamma Glutamyl Transpeptidasa (γ -GTP) en plasma. En muestras de tejido hepático se determinó el contenido de Colágena, peroxidación lídica y el Glutathión reducido (GSH). Se realizó estudio histopatológico y por medio de Western blot se midió la expresión de TGF- β .

El consumo de una dieta occidental durante 18 semanas produjo una dislipidemia importante, aumentó los niveles de γ -GTP y parcialmente los de ALT. En hígado se muestra un aumento de la peroxidación lipídica, una disminución del Glutathión reducido (GSH) y del contenido de colágena así como una depleción del glucógeno. Además hubo un incremento en la expresión de TGF- β .

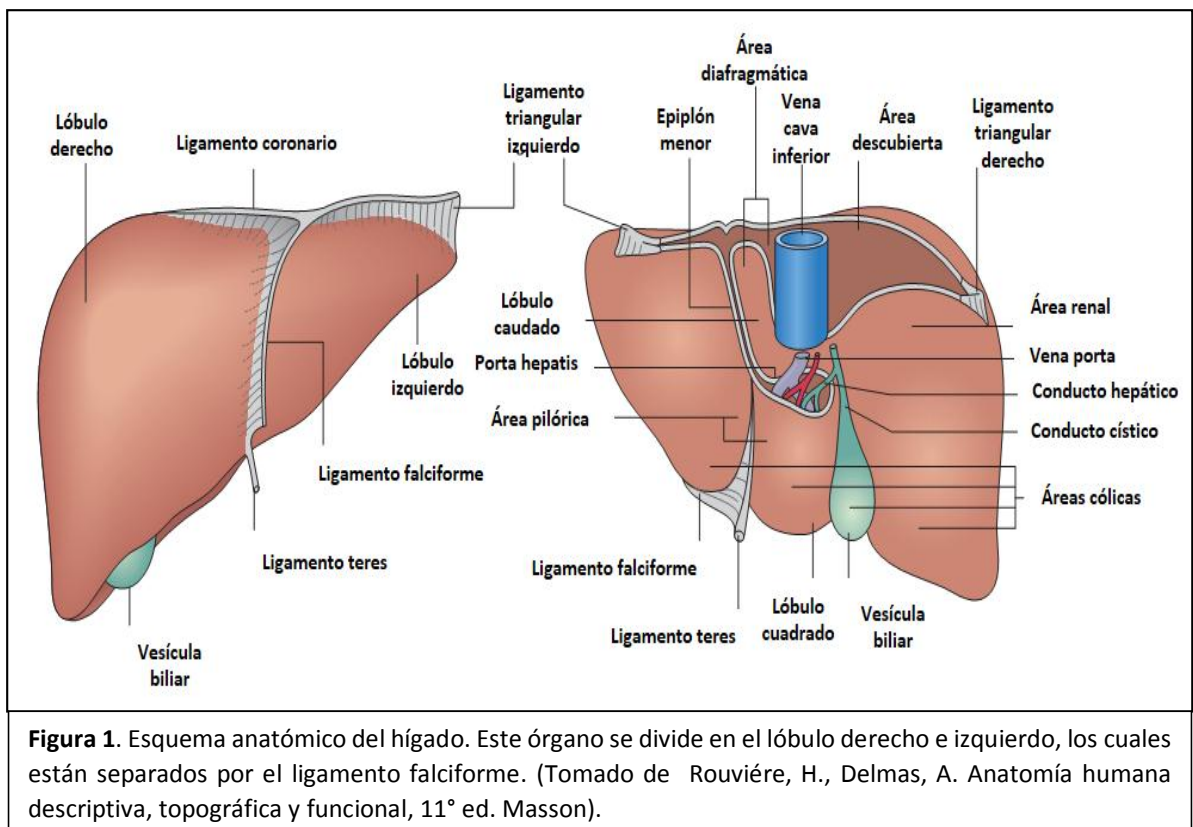
El café previno la mayoría de las alteraciones producidas por HFD. Fue capaz de prevenir el aumento de la actividad de las enzimas hepáticas así como del estrés oxidativo y la depleción tanto de colágena como de glucógeno.

III. INTRODUCCIÓN

3.1 Generalidades del hígado

El hígado es el órgano interno más grande del cuerpo de forma triangular que se localiza, justo por debajo del diafragma, lateral al colon transversal y estómago, por encima del riñón derecho, abarcando casi la totalidad de abdomen superior. Tiene un color marrón-rojizo, de superficie lisa, consistencia suave, con un peso aproximado de 1500 gramos correspondiendo al 2.5% del peso total del adulto [Rouvière y Delmas, 2005].

Presenta dos caras, una diafragmática y otra visceral. En su cara diafragmática se pueden distinguir dos lóbulos, derecho e izquierdo divididos por el ligamento falciforme. Su cara visceral tiene una orientación inferoposterior y a la izquierda, y está dividida por tres surcos: la fisura del ligamento redondo, la fosa de la vesícula biliar y el porta hepático. Estos surcos dan lugar a cuatro segmentos: lóbulo izquierdo, lóbulo derecho, lóbulo cuadrado y lóbulo caudado (figura 1) [Rouvière y Delmas, 2005].



El hígado está cubierto por una envoltura de tejido conectivo que es independiente del revestimiento peritoneal, se conoce como cápsula de Glisson. A la altura del porta hepático, esta cápsula rodea tanto a vasos sanguíneos como conductos penetrando en el tejido hepático y forma la cápsula fibrosa perivascular.

Aunque este órgano conforma el 2.5% del peso corporal de un hombre adulto, recibe aproximadamente el 25% del gasto cardíaco, a un flujo de 30 ml/min/kg por medio de la vena porta hepática (que aporta dos tercios del flujo sanguíneo hepático) y la arteria hepática (aporta aproximadamente 20% del flujo sanguíneo). El drenaje venoso llega a las venas hepáticas y posteriormente a la vena cava inferior (figura 2). El drenaje linfático se lleva a cabo por los vasos linfáticos superficiales, procedentes de los espacios interlobulillares superficiales y profundos, que se originan en el parénquima hepático. La innervación se origina por nervios del plexo celiaco, del nervio vago izquierdo y del nervio frénico derecho.

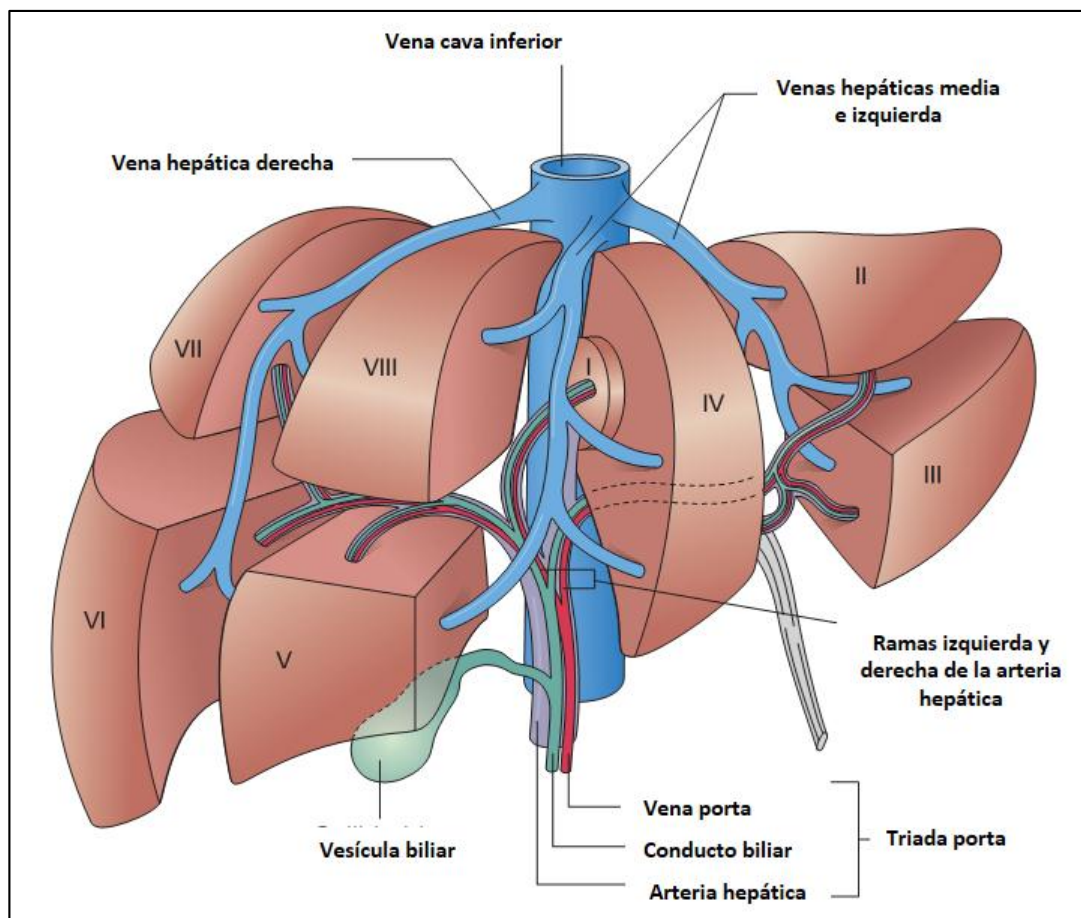


Figura 2. Distribución del flujo sanguíneo hepático. (Tomado de Rouvière, H., Delmas, A. Anatomía humana descriptiva, topográfica y funcional, 11° ed. Masson).

El hígado posee una gran cantidad de funciones vitales para el organismo, incluyendo desde funciones metabólicas hasta el mantenimiento de la homeostasis, que se pueden englobar en las siguientes categorías:

- Síntesis: de la mayoría de las proteínas plasmáticas, hormonas, ácidos biliares, colesterol.
- Metabolismo: de lípidos, lipoproteínas, ácidos biliares, nutrientes, xenobióticos y productos de desecho (figura 3).
- Secreción: de bilis.
- Almacenamiento: de glucógeno, de hierro y de vitamina A [Muriel, 2017].

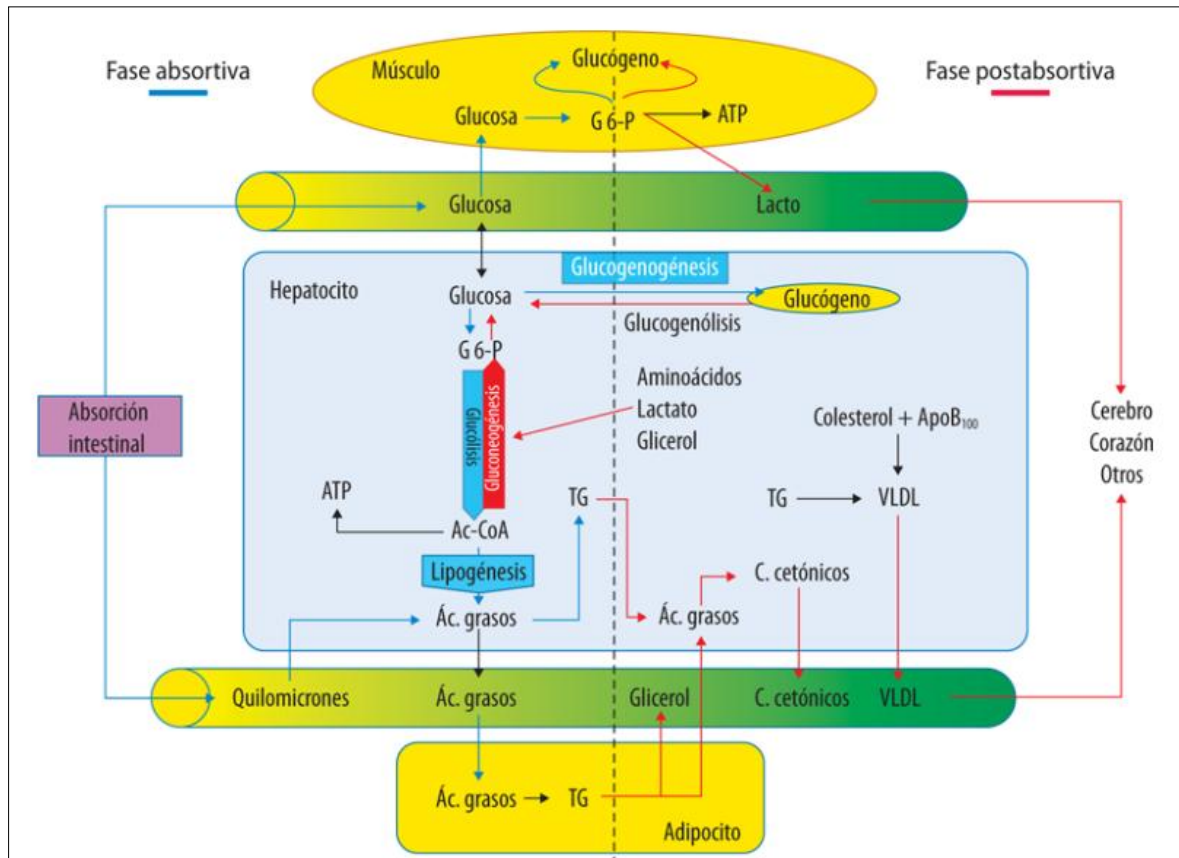


Figura 3. Funciones del hígado. El hígado posee numerosas funciones metabólicas. Los nutrientes ingeridos y absorbidos a través de tracto gastrointestinal se metabolizan para producir el ATP (adenosin trifosfato) o bien, almacenar estos nutrientes. La glucosa puede almacenarse en hígado y en músculo en forma de glucógeno, por medio de glucogenogénesis. Los ácidos grasos llegan al hígado en forma de quilomicrones, se liberan los ácidos grasos en el hígado o tejido adiposo y estos se almacenan en forma de TG (triglicéridos). Los ácidos grasos pueden pasar por la vía de la gluconeogénesis o pasar a la circulación como VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad). (Tomado de Jesús A. Fernández-Tresguerras: *Fisiología humana*, 4e. McGraw-Hill).

3.2 Lobulillo hepático.

La unidad funcional básica es el lobulillo hepático, una estructura cilíndrica de varios milímetros de longitud y de 0.8 a 2 milímetros de diámetro. El hígado humano contiene entre 50,000 y 100,000 lobulillos (figura 4) [Treyer y Müsch, 2013].

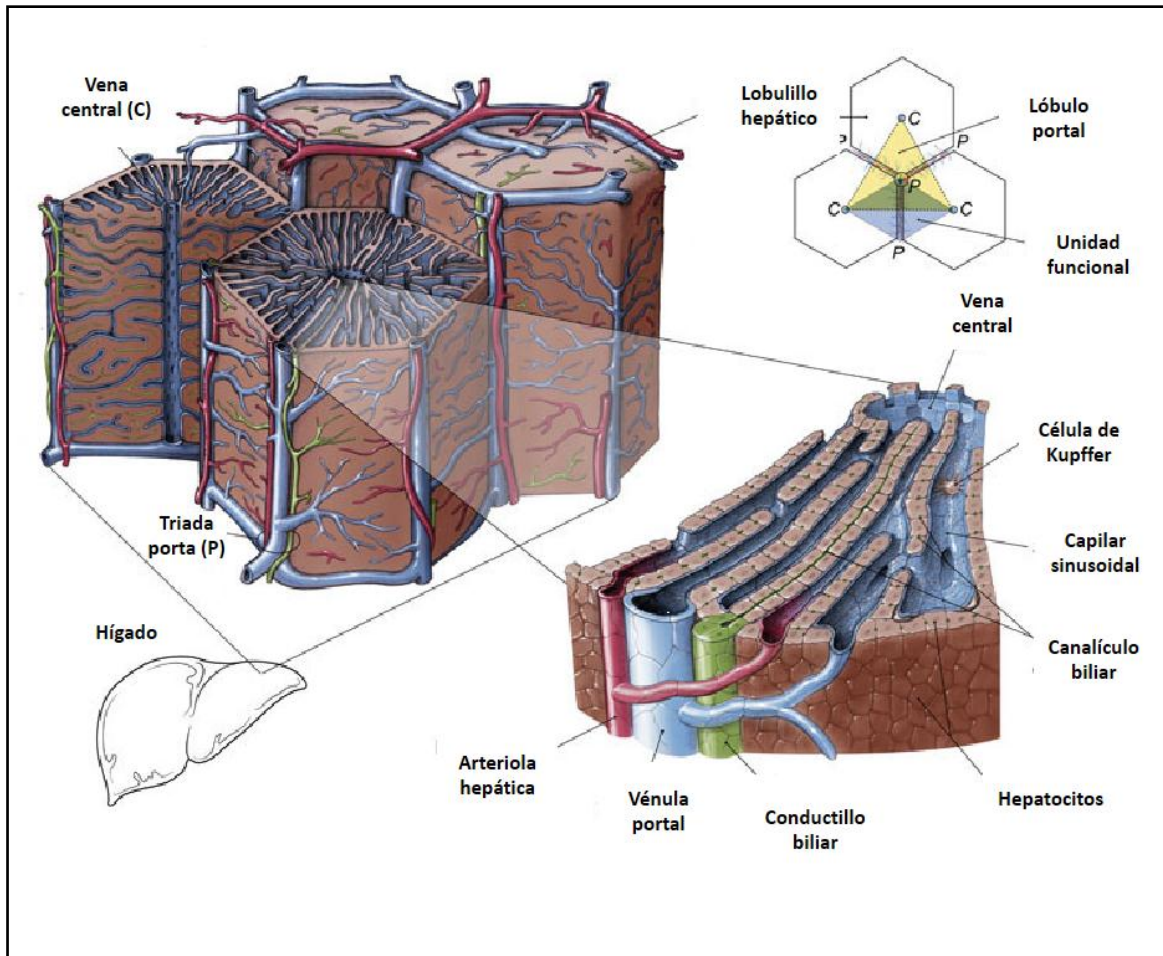
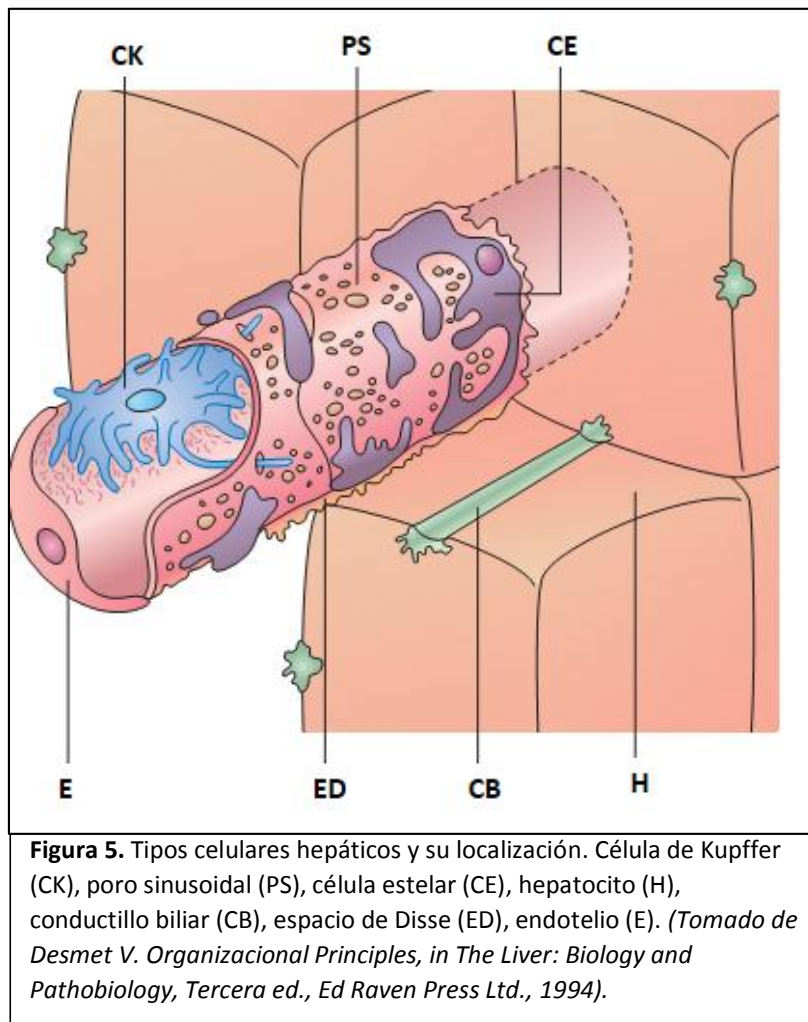


Figura 4. Estructura básica del lobulillo hepático. Se observa la unidad funcional del hígado con las placas celulares hepáticas, los vasos sanguíneos, el sistema conductor de la bilis compuestos por el espacio de Disse. (Tomado de Rouvière, H., Delmas, A. Anatomía humana descriptiva, topográfica y funcional, 11° ed. Masson).

Las células del parénquima hepático se encuentran ubicadas alrededor de las ramas terminales de una arteriola hepática y una vénula porta (figura 5). Estas células parenquimales, también llamadas hepatocitos, se disponen en forma radiada en torno a una vena central o centrolobulillar, conectados a manera de un sincitio y conforman los lobulillos hepáticos de los cuales está compuesto el hígado, siendo estos la unidad funcional básica del

órgano y se encuentran dispuestos en forma de placas hexagonales. Se encuentran separados entre sí por fisuras interlobulillares que aumentan de tamaño conforme se aproximan a la unión de cuatro lobulillos, formando los espacios perisinusoidales. Los espacios perisinusoidales contienen el espacio de Disse, células endoteliales, células de Kupffer y células estelares. Los canalículos hepáticos se forman del contacto de un hepatocito con otro, dando lugar a los conductillos biliares, los cuales van confluyendo hasta formar el conducto hepático común que lleva la bilis hasta la vesícula biliar [Lautt, 2009].



3.3 Tipos celulares.

Las células que conforman el hígado son distintas con diferentes funciones (cuadro 1):

- Células parenquimatosas.

Los hepatocitos o células del parénquima son las células más abundantes en el hígado conforman aproximadamente el 70% del peso del órgano en el hombre adulto. Son células epiteliales muy polarizadas, lo que les confiere dos dominios membranales, uno sinusoidal y otro canalicular. El mantenimiento de esta polaridad de la membrana de los hepatocitos permite que exista una excreción biliar normal y la eliminación de xenobióticos, es decir, para que conserve sus funciones metabólicas, exócrinas y endócrinas que son esenciales para la vida [LeCLuyse y Alexandre, 2010].

Cuadro I. Organización de las distintas poblaciones celulares no parenquimatosas existentes en el hígado

Células no parenquimatosas	Tipo celular	Importancia
40%	Células estelares hepáticas	Profibrogénicas
20%	Endoteliales (sinusoidales)	Intercomunicación celular
20%	Células de Kupffer	Respuesta inflamatoria ante un estímulo
20%	Linfocitos intrahepáticos	Respuesta inmune y/o tolerancia

- Células de Kupffer.

Las células de Kupffer son los macrófagos específicos del hígado y forman parte del sistema inmunológico del huésped. Proviene de células monocíticas, conocidas como células de Pit. Se encuentran localizadas en el sinusoides, en contacto con el endotelio de este, en donde se ven expuestas a la circulación esplácnica por medio de la vena porta y a la circulación de la arteria hepática. Se encuentran en mayor cantidad en la cercanía de la vena porta que en la proximidad de la vena central, siendo el primer contacto para ejercer su papel de defensa ante la llegada de algún agente dañino (virus, bacterias, hongos). Son capaces de secretar

mediadores inflamatorios como citocinas, endotelinas, prostanoïdes y óxido nítrico [Lautt, 2009].

- Células estelares (CE).

Las células estelares o lipocitos hepáticos perisinusoidales tienen la capacidad de almacenar grasas (en el citoplasma que contiene las gotas de lípidos en donde se encuentra almacenada la vitamina A) y como su nombre lo dice se encuentran en el espacio perisinusoidal de Disse. En su forma inactiva se llaman células de Ito y al activarse adquieren características de miocitos y expresan desmina, lo cual les confiere la capacidad de contraerse de manera reversible. Por su ubicación, pueden comprimir a las células endoteliales y disminuir el diámetro de los sinusoides [Kawada, 2013].

- Células endoteliales sinusoidales.

Estas células constituyen la pared del sinusoide hepático. Forman una membrana fenestrada y cada penetración es de aproximadamente 0.17 μm de diámetro. Esta barrera permite el paso de líquido, solutos y pequeñas partículas (quilomicrones, lipoproteínas) a manera de intercambio entre la luz del sinusoide y el espacio de Disse. Poseen una gran capacidad endocítica para moléculas, líquidos y partículas pequeñas [Wisse, 1996].

- Células de Pit.

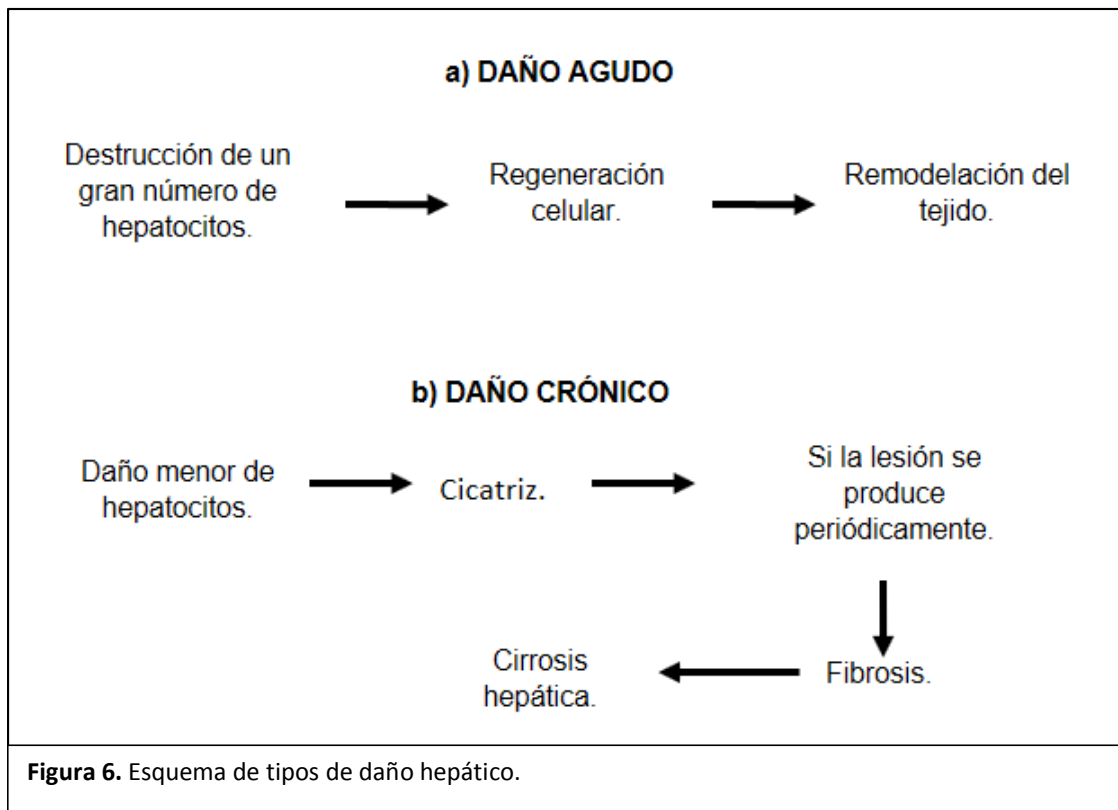
También conocidas como "natural killer", son generalmente encontradas en el lumen del sinusoide y por su polaridad están en relación principalmente con las células endoteliales, pero también se encuentran a veces entre la célula endotelial y una célula de Kupffer. Las células de Pit son una defensa antitumoral hepática y también contra infecciones virales [Brunt, 1788].

IV. DAÑO HEPÁTICO.

El hígado tiene una gran capacidad regenerativa y con funciones complejas. Esto se ha comprobado experimentalmente después de producir algún tipo de daño y tras el retiro del estímulo, que en un principio produjo pérdida de tejido hepático. La regeneración es un parámetro fundamental de la respuesta hepática al daño [Kawasaki, 1992].

Las primeras células en regenerarse son las parenquimales empezando por las que se encuentran en las zonas periportales, después las de las zonas pericentrales y posteriormente el resto de las células. Los hepatocitos en regeneración forman aglomeraciones (o nódulos regenerativos). Las células de Ito penetran en los nódulos de regeneración y expresan laminina que eventualmente inducirá la reorganización de los hepatocitos a su forma natural. Los capilares que irrigan los conglomerados de hepatocitos crecen y forman los sinusoides hepáticos que están rodeados de células de Kupffer y células endoteliales pero en escasa cantidad. El contenido de la matriz extracelular cambia de tener alto contenido de laminina a colágena tipo I y III, y fibronectina. En alrededor de siete días, los lóbulos hepáticos tienen un mayor tamaño que antes de la regeneración [Michalopoulos y DeFrances, 1997].

El daño hepático puede ser agudo o crónico, se clasifica de acuerdo al tiempo en el cual el hígado se ve expuesto a un estímulo dañino (figura 6). La principal patología hepática es la cirrosis la cual tiene distintas causas o estímulos dañinos (consumo de alcohol o de dieta rica en grasas, enfermedades virales, etcétera) y su importancia radica en que es una causa de mortalidad por los cambios en la arquitectura del parénquima que interfiere con la función normal del hígado.



4.1 Clasificación del daño hepático de acuerdo al tiempo.

4.1.1 Agudo.

En el daño hepático agudo, el tejido se ve expuesto a un estímulo de manera intensa pero en un periodo limitado de tiempo, el suficiente que le da la oportunidad al órgano para su regeneración en la que los hepatocitos retoman su arquitectura normal [Boon-Bee y McCullough, 2016].

4.1.2 Crónico.

Cuando sucede un daño crónico, la respuesta del tejido hepático es la fibrosis y posteriormente, cirrosis. La cirrosis es la manifestación final del depósito de matriz extracelular en el espacio de Disse, entre los hepatocitos y las células endoteliales del sinusoides, lo que a su vez reduce el flujo sanguíneo de los hepatocitos al espacio sinusoidal. Además, el aumento de la matriz extracelular producido por las células estelares activadas

produce una distorsión en la arquitectura hepática debido a que se forma una cicatriz en el parénquima que no puede ser sustituida por tejido normal. La fibrosis aumenta progresivamente el daño y en respuesta, el hígado sigue tratando de regenerar su parénquima, pero se ve impedido por el depósito de colágeno tipo I, tipo III y fibronectina. Este proceso de daño-curación, no permite una curación adecuada porque la misma fibrosis encierra a estas conglomeraciones de hepatocitos regenerados, dando lugar a nódulos de regeneración que pueden ser micronódulos y/o macronódulos, estableciéndose finalmente la cirrosis hepática [Boon-Bee y McCullough, 2016].

4.2 Enfermedad por hígado graso no alcohólica (EHGNA).

4.2.1 Definición de la EHGNA.

La EHGNA es la manifestación hepática del síndrome metabólico. Ésta se define como la acumulación de grasa en el hígado en pacientes que no consumen alcohol. Su espectro clínico y patológico puede evolucionar de la esteatosis simple a la esteatohepatitis, a la cirrosis y al carcinoma hepatocelular con sus consecuencias clínicas. Histológicamente, la esteatosis hepática se caracteriza por la acumulación de triglicéridos en macro y microvesículas en más del 5% de los hepatocitos, distribuyéndose principalmente en la región perivenular [Boon-Bee y McCullough, 2016].

4.2.2 Epidemiología de la EHGNA.

La EHGNA es la patología más frecuente en el mundo con predominio en países occidentales, y la causa más común de alteraciones en las pruebas de función hepática, afectando tanto a niños como a adultos y su prevalencia en la población general se estima entre 2.8 y 24%. Es la principal causa de elevación asintomática de enzimas hepáticas. Existe un aumento en su prevalencia a nivel mundial relacionado con la epidemia de obesidad, diabetes mellitus tipo 2 y síndrome metabólico. En el 2008 representó el 75% de todas las enfermedades hepáticas crónicas. Para el 2015, en Estados Unidos se estimó que más de 95 millones de adultos habían sido afectados. La historia natural establece la progresión de

hígado graso no alcohólico a esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), a fibrosis/cirrosis y a hepatocarcinoma [Méndez-Sánchez y cols, 2010].

De acuerdo a la Organización para Cooperación y Desarrollo Económico [OCDE, 2017], México ocupa el primer lugar en obesidad a nivel mundial desplazando a E.E.U.U., siendo esta uno de los principales factores predisponentes para el desarrollo de EHGNA. En estudios poblacionales a nivel nacional se estima una prevalencia de 17.05% en pacientes asintomáticos. La etnicidad también se considera un factor de riesgo ya que los hispanos y la población México-americana son los de más alta prevalencia en Estados Unidos [Méndez-Sánchez y cols, 2010].

4.2.3 Fisiopatogenia de la EHGNA.

La enfermedad por hígado graso no alcohólico se desarrolla como consecuencia de disfunción de diversas vías metabólicas. La acumulación de triglicéridos en el citoplasma de los hepatocitos surge del desbalance entre la adquisición lipídica, por medio del ingreso de ácidos grasos libres y de la lipogénesis *de novo*, y la remoción de lípidos, llevada a cabo por la oxidación mitocondrial y exportación a la circulación como partículas de VLDL [Guturu, P., Duchini, 2012].

La historia natural de la enfermedad indica que es un proceso de daño crónico en el cual el estímulo al que se ve expuesto el hígado es el consumo de una dieta rica en grasas que primeramente ocasiona una esteatosis hepática, que es la simple acumulación de grasas en los hepatocitos. Si dicho estímulo continúa, habrá una respuesta inflamatoria, llamada esteatohepatitis, que es reversible. Sin embargo, si persiste el daño progresará a fibrosis y posterior cirrosis, e incluso, en algunos casos, hepatocarcinoma [Boon-Bee y McCullough, 2016].

La fisiopatología la EHGNA es compleja y multifactorial. Anteriormente, la teoría más aceptada para explicar su desarrollo era la “hipótesis de los dos hits”. El primer hit es la

acumulación hepática de lípidos secundario al estilo de vida sedentario, dieta rica en grasas, obesidad y resistencia a la insulina, dejando al hígado vulnerable a otros estímulos dañinos. El segundo hit activa cascadas inflamatorias y de fibrogénesis [Méndez-Sánchez y cols, 2010].

Sin embargo, esto no explica por completo la génesis de la EHGA por lo que se propuso la “hipótesis de los múltiples hits”. Ésta última consiste en que, por una parte, la genética de cada individuo y por otro los factores ambientales y del estilo de vida llevan al desarrollo de obesidad y de resistencia a insulina [Méndez-Sánchez y cols, 2010].

La resistencia a la insulina es el principal factor para el desarrollo de esteatosis hepática y esteatohepatitis. También promueve un incremento en la lipogénesis de *novo* en el hígado, una disminución en la lipólisis en el tejido adiposo lo que provoca un aumento en los niveles de ácidos grasos libres de modo que existe un ingreso masivo de lípidos al hígado en donde se acumulan en forma de triglicéridos [Malhotra y Beaton, 2015].

La lipotoxicidad producida tiene como consecuencia disfunción mitocondrial con aumento de la β -oxidación lipídica y estrés oxidativo lo que conduce a la generación de especies reactivas de oxígeno y estrés del retículo endoplásmico. La disfunción mitocondrial involucra alteraciones en la cadena respiratoria, así como disminución en la síntesis de adenosin trifosfato (ATP) y en los niveles de ADN mitocondrial, por lo cual hay un declive en la expresión proteica generando un desbalance entre la oxidación y la fosforilación mitocondrial [Malhotra y Beaton, 2015].

Otro de los factores involucrados es la alteración de la flora intestinal ya que esto conduce a la producción de ácidos grasos en el intestino, así como un aumento en la absorción de lípidos que lleva a la activación de vías inflamatorias con liberación de citocinas proinflamatorias como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α). La inflamación en hígado produce daño y muerte celular, y posteriormente, fibrosis (figura 7) [Buzetti y cols, 2016].

4.2.3.1 Lipotoxicidad.

La lipotoxicidad se refiere a los efectos negativos generados por el aumento de ácidos grasos desencadenando la activación de vías metabólicas que provocan una pérdida de la homeostasis de la célula por daño a las membranas celulares y de los organelos que llevan a muerte celular [Arauz y cols, 2016].

La β -oxidación promueve la síntesis de glucógeno y la inhibición de la hexocinasa; teniendo como resultado la inhibición de la captación de glucosa. Al existir un aumento en la disponibilidad de ácidos grasos libres que los requerimientos celulares no precisan, se produce una oxidación de estos de manera compensatoria, para mantener el equilibrio dentro de la célula. Pero esta β -oxidación, es deficiente y falla, por lo que entran en juego vías metabólicas alternativas para intentar degradarlos o bien se almacenan en forma de triglicéridos [Arauz y cols, 2016].

Los productos de la lipoperoxidación incluyen malondealdehído (MDA), propanal, hexanal y 4-hidroxinonenal (4-HNE), son estudiados en el daño experimental por estrés oxidativo, pueden ocasionar daño directamente al ácido desoxirribonucleico (ADN) [Muriel, 2017].

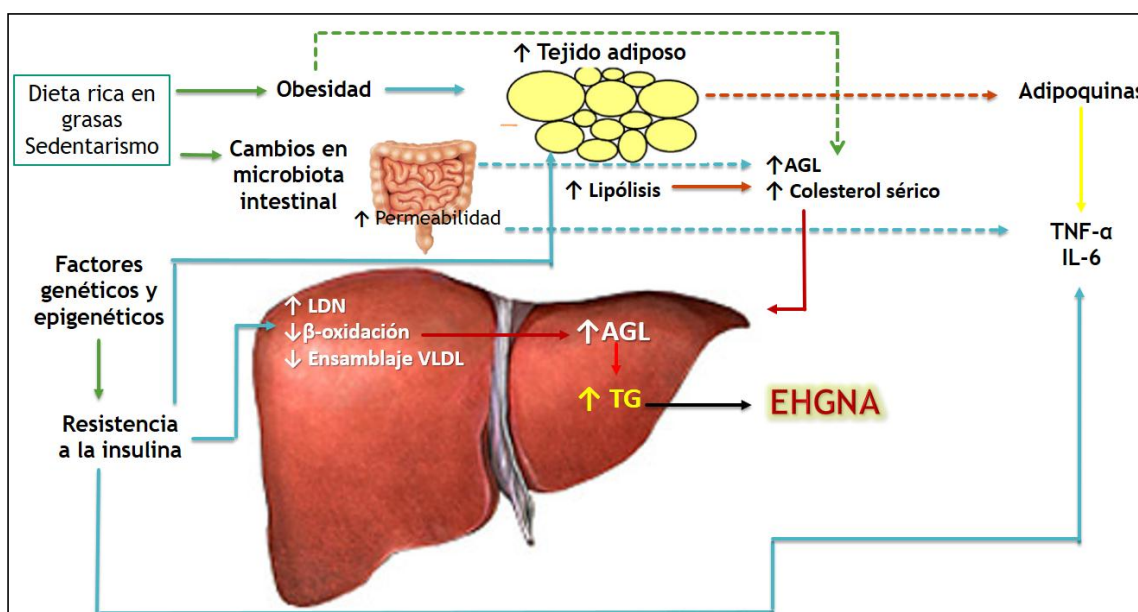


Figura 7. Teoría de los múltiples hits.

4.2.3.2 Estrés oxidativo.

Las especies reactivas de oxígeno, tales como H_2O_2 , $\text{OH}^\cdot$, $\text{O}_2^\cdot$, conocidos por sus siglas en inglés como (ROS reactive oxygen species) desempeñan importantes funciones fisiológicas y también puede causar 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. 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 8) [Evans y Halliwell, 2001].

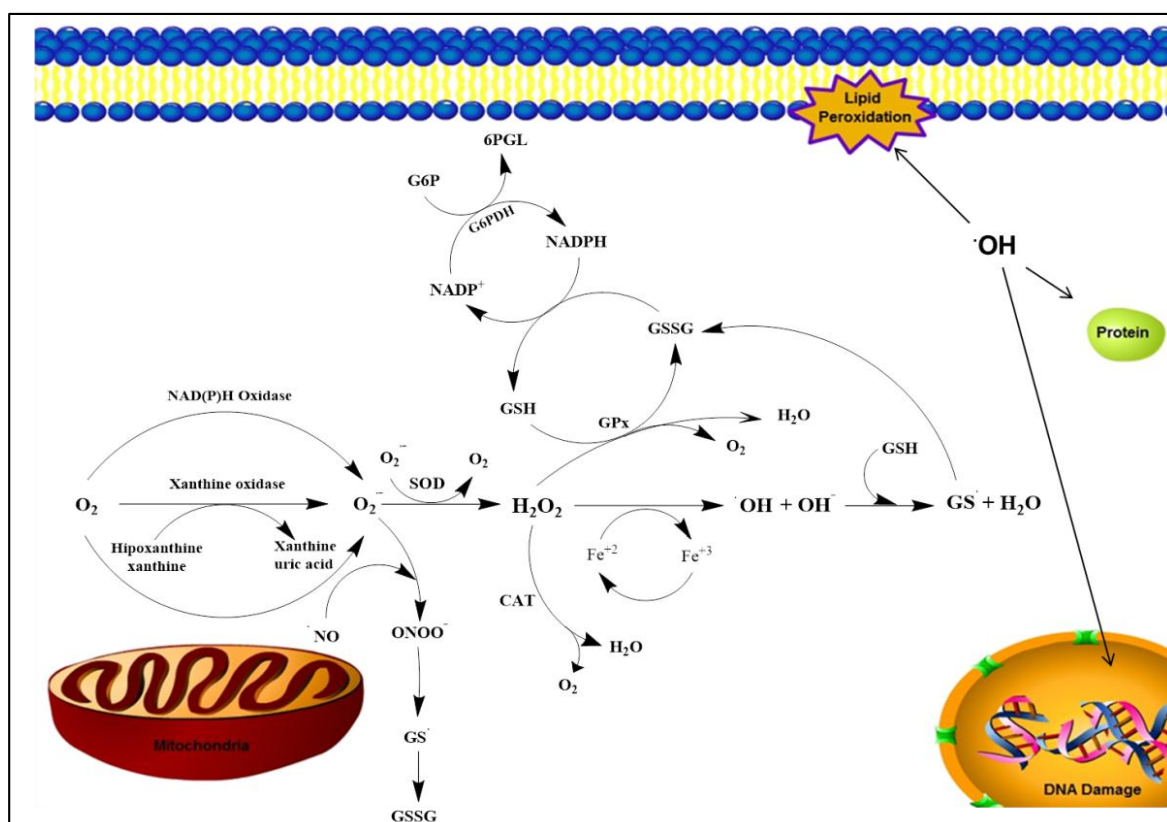


Figura 8. Estrés oxidativo. El desequilibrio entre el sistema antioxidante y la generación de ROS genera una pérdida de la homeostasis celular. (Tomado de Jonatham Isaac Arauz-Cabrera, *Annals Hepatol* 2016).

El estrés oxidativo es un punto importante en la fisiopatología de la EHGNA, pero también de la enfermedad hepática alcohólica y de la hepatitis C. Es un que lleva a

lipoperoxidación directa de las membranas mitocondriales produciendo pérdida del citocromo C lo que inicia apoptosis y muerte celular [Méndez-Sánchez, 2004].

Las ROS se producen de manera natural por organismos aerobios y participan en funciones celulares como transducción de señales, como la defensa contra microorganismos, la regulación expresión genética, entre otros. El hígado es el principal encargado de la homeostasis metabólica por lo que es un productor de ROS, los cuales se elaboran por medio de varias enzimas: diamina oxidasa, aldehído deshidrogenasa, oxidasa dual de triptófano, deshidrogenasa hepática y el sistema del citocromo P450. Los organelos involucrados son las mitocondrias, los neutrófilos y las células de Kupffer. El aumento en la producción de ROS durante el daño hepático, media muchos de los efectos fibrogénicos del factor transformante β (TGF β), que induce la expresión del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) en hepatocitos y fibrogénesis [Arauz y cols, 2016].

4.3 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. La gran diversidad en la vida media de los distintos prooxidantes, 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 [Sies, H., Stahl, 1995].

Los sistemas antioxidantes pueden prevenir o inhibir la oxidación, y evitar una reacción en cadena de oxidación masiva, protegiendo del daño indiscriminado a lípidos de membranas, proteínas y al ADN, que se produce al secuestrar un átomo de hidrógeno de estas moléculas [Muriel, 2017].

Existen dos tipos de sistemas antioxidantes:

- Enzimáticos: superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), catalasa (CAT) y hemoxigenasa-1 (HO-1) [Arauz y cols, 2016].
- No enzimáticos: ácido ascórbico, α -tocoferol, glutatión reducido (GSH), entre otros [Arauz y cols, 2016].

Antioxidantes enzimáticos.

La función de los antioxidantes enzimáticos es prevenir la iniciación de las oxidaciones en cadena, al eliminar las ROS ($O_2^{\bullet-}$ 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 [Peppin y Weiss, 1986].
- Glutatión 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 [Arauz y cols, 2016].

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. Actúa eficientemente

atrapando los radicales peroxilo 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].

- Glutatión. El glutatión es un tripéptido ubicuo, γ -glutamyl-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) [Lu y cols, 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. 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. Centrándonos en su función antioxidante, el GSH en presencia de una GSH- peroxidasa selenio-dependiente, reduce a los peróxidos producidos de manera endógena (Figura 9). 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 [Meredith y Reed, 1982].

El GSH es el mayor sistema antioxidante intracelular no enzimático, junto con su forma oxidada (GSSG) participan en el equilibrio oxido-reducción. Además es un cofactor de sistemas enzimáticos antioxidantes como la GPx, participa en el transporte de aminoácidos a través de la membrana plasmática y colabora en la regeneración de las formas activas de ácido ascórbico y α -tocoferol [Arauz y cols, 2016].

- 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. 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 Kaye, 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 Kaye, 1999].

4.3.1 Diagnóstico y tratamiento de la EHGNA.

Hasta el momento el tratamiento de todas las formas de la enfermedad por hígado graso no alcohólico va dirigido a mejorar las comorbilidades como la obesidad central, dislipidemia, hipertensión y diabetes [Guturu y Duchini, 2012]. Una de las principales estrategias terapéuticas es la modificación en el estilo de vida que consiste en dieta y ejercicio regular. En cuanto al manejo dietético, se indica una disminución de la ingesta calórica con énfasis en la restricción de fructosa y/o sacarosa, y de grasas saturadas [Molloy y cols, 2012].

Actualmente no existe un tratamiento farmacológico que sea universalmente efectivo para el manejo de la EHNA, por lo que se han probado varios elementos. Uno de ellos es la vitamina E por sus efectos antioxidantes, pero su uso se restringe a individuos no diabéticos con EHNA comprobada histológicamente debido a sus efectos secundarios [13, 22]. También se ha probado con hipoglucemiantes orales como las tiazolidinedionas (pioglitazona), aunque el uso de estos no ha demostrado diferencias significativas con respecto a los grupos control y se deben considerar los efectos secundarios [Bravi y cols, 2013].

Otros fármacos probados han sido los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y los antagonistas de los receptores de angiotensina, dentro de los cuales telmisartán es el único que ha mostrado mejoría significativa en los niveles de transaminasas, en la resistencia a insulina y a nivel histológico en los casos de EHNA asociada a hipertensión [Sanyal y cols, 2010].

V. EL CAFÉ Y SU RELACIÓN CON LAS ENFERMEDADES HEPÁTICAS.

5.1 Generalidades del café.

El café es una de las bebidas más consumidas a nivel mundial, de acuerdo a la Sociedad Americana del Café, con un consumo aproximado de 7.983 900 ton/año. Es una bebida compleja con beneficios que contiene muchos compuestos bioactivos incluyendo: ácidos fenólicos, diterpenoides y cafeína. Las principales especies de café son *Coffea arabica*, y *Coffea canephora* variedad robusta, el primero se encuentra en mayor cantidad a nivel mundial [Georgescu y cols, 2009].

Las propiedades del café se ven alteradas por múltiples factores como la especie, las condiciones de cultivo del grano, la altura, temperatura y humedad en la que se cultiva, y el modo en que se prepara un extracto de café. Por ejemplo, las bebidas hechas con café robusta tienen mayores cantidades de antioxidantes y cafeína [Ludwig y cols, 2014].

5.2 Efectos benéficos del café sobre la salud humana.

Uno de sus componentes principales es la cafeína (1,3,7- trimetilxantina) que es un alcaloide que ha demostrado muchos efectos benéficos, entre ellos en la enfermedad de Alzheimer por su actividad estimulante a nivel de sistema nervioso [Bond, 2012]. También ejerce un efecto ergogénico al momento de realizar actividad física [Prediger, 2010]. Se ha probado que tiene ciertas propiedades quimiopreventivas contra melanoma maligno [Laurence y cols 2012]. Por último, tiene una actividad antioxidante así como también se considera un inhibidor de la ciclooxigenasa -2 [Liu y cols, 2013].

Otro componente es el ácido clorogénico (ácido 5-cafeolquinico) al cual se le han atribuido muchos de los efectos del café como su efecto hipolipemiante que puede llevar a la disminución de peso, efecto antioxidante protector de macromoléculas y cierta actividad antiviral contra el virus de hepatitis C e influenza H1N1 [Wang y cols, 2009; Urushisaki y cols, 2011].

Los diterpenos principales del café son kahweol y cafestol se encuentran en este como ésteres y le dan a la bebida su sabor amargo. Se encuentran en gran cantidad en el café hervido y sin filtrar. Su efecto antioxidante radica en la regulación del factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) y los genes dependientes de ARE (elemento de respuesta antioxidante). Además, se ha visto involucrado en la reducción del riesgo para desarrollar diabetes mellitus tipo 2 [Bøhn y cols, 2014].

La trigonelina ha demostrado actividad antibacteriana contra *Streptococcus mutans*, agente causal de caries, al interferir con su mecanismo patogénico de adhesión así como contra *Salmonella enterica* [Mellbye y cols, 2015].

Las melanoidinas son obtenidas únicamente a través de la dieta por lo que encuentran en altas cantidades en el tracto gastrointestinal en donde ejercen una acción antiabsortiva

de ácidos grasos de modo que previenen la peroxidación de lípidos y sus consecuencias [Almeida y cols, 2006].

El ácido nicotínico (nicotinamida) se puede obtener intrínsecamente o como suplemento alimenticio de la vitamina B3. Tiene efectos antiinflamatorios demostrados mediante la mejoría clínica en dermatosis inflamatorias [Tagliazucchi, 2010]. La niacina controla los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL), lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de triglicéridos, siendo efectiva en casos de dislipidemias en estudios clínicos [Niren, 2006].

Por todo lo anterior, exponiendo las propiedades de solo unos pocos componentes del café, observamos que es una bebida de gran complejidad y con muchas posibles aplicaciones. Sin embargo, es muy difícil unificar la composición de éste a nivel mundial por lo cual aún no se dilucida con exactitud todas las propiedades en conjunto.

5.3 El café en las enfermedades hepáticas.

Los antioxidantes presentes en el café producen un efecto benéfico en el cuerpo, especialmente a nivel hepático en donde las ERO se producen en grandes cantidades por el alto metabolismo mitocondrial en este órgano.

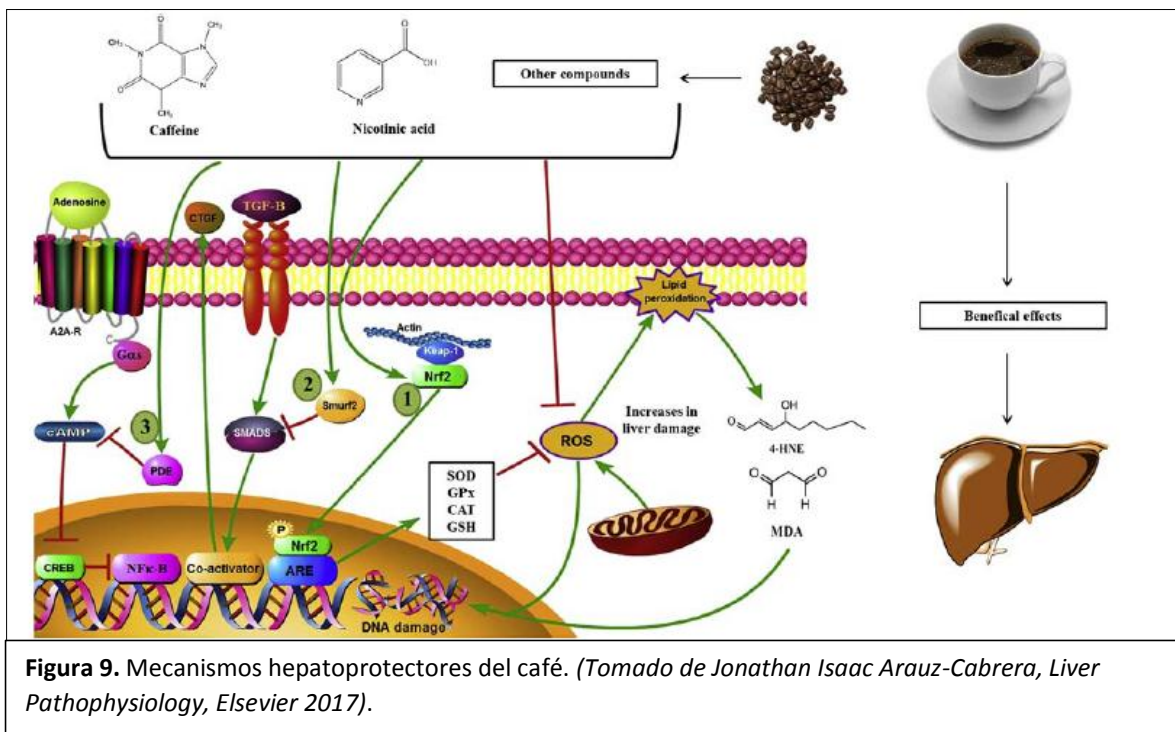
5.3.1 Mecanismos hepatoprotectores del café.

El estrés oxidativo ejerce de manera directa un efecto en la generación y progresión de enfermedades hepáticas en general. Pero el café y sus compuestos pueden prevenir esto por sus efectos antioxidantes y antifibrogénicos por medio de varios mecanismos (figura 10):

- Promueve la fosforilación del factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) y su liberación de la membrana plasmática, lo cual permite su traslocación al núcleo en donde activa la expresión a los genes dependientes de ARE (elemento de respuesta antioxidante, por sus siglas en inglés) que incluyen genes que llevan a la expresión de las enzimas de

fase 2 y otras proteínas antioxidantes incluyendo a CAT, SOD, HO-1, GPx Y GSH) [Bøhn, 2014].

- Inhibe la expresión hepatocelular del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) a través de la elevación de las concentraciones intracelulares de adenosin monofosfato cíclico (cAMP), lo cual lleva a la degradación del efector de TGF β , Smad 2 por medio de la ubiquitin ligasa Smurf 2 [McKenney, 2003].
- Estimula el receptor de adenosina, A2A llevando a la producción de cAMP, y a la activación de la quinasa dependiente de AMPc (PKA) y a la fosforilación del CREB (elemento de respuesta de cAMP unido a proteína), inhibe la actividad transcripcional del factor NF- κ B (factor nuclear de cadenas ligeras kappa de las células B) y subsecuentemente suprime la expresión de citocinas. El café aumenta los niveles de cAMP inhibiendo a la fosfodiesterasa de cAMP (PDE) [Conolly 2010 y Arauz, 2013].



VI. MODELOS EXPERIMENTALES DE DAÑO HEPÁTICO.

6.1 Generalidades.

Un modelo experimental es un sistema biológico capaz de simular de manera parcial o total el proceso a estudiar. El sistema biológico puede ser desde una célula, tejido u órgano hasta un animal, con la finalidad de semejar las mismas circunstancias y condiciones para obtener resultados objetivos.

La EHGNA es un proceso que involucra un amplio espectro de trastornos asociado a múltiples vías de daño por lo cual existen modelos experimentales de daño y al ser una patología relativamente nueva, su estudio va en auge por lo que se han implementado pocos modelos experimentales de daño hepático para desarrollarla.

Los dos principales modelos de daño son mediante la ingesta de una dieta rica en grasas y mediante una dieta a base de fructosa esto con el de generar la enfermedad y proporcionar posibles blancos terapéuticos.

6.2 Modelo de hígado graso por consumo de dieta rica en grasas.

Este modelo murino consiste en la administración de una dieta alta en grasas (HFD, high fat diet) hecha a base de 88 g de purina normal para rata, 10 g de manteca de cerdo y 2 g de colesterol. Las ratas de la cepa Sprague-Dawley fueron alimentadas y sacrificadas a las 4, 8, 12, 16, 24, 36 y 48 semanas y se compararon con grupos control. Se logró reproducir de manera exitosa la EHNA alrededor de la semana 12 a la 48 comprobándose con una función hepática alterada y confirmándose mediante cortes histológicos. Al final de la semana 48 se observó un aumento de la obesidad visceral, hiperlipidemia, aumento de ácidos grasos libres, y de factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) corroborando la inflamación ocasionada. La ventaja de este modelo es su manufactura sencilla y el bajo costo, lo que permite la reproducción de este modelo [Tan y cols, 2006].

6.3 Modelo de hígado graso por consumo de fructosa.

Las dietas ricas en carbohidratos se relacionan con un aumento en el contenido de grasa intrahepática ya que promueven la lipogénesis por medio de la activación del ChREBP (proteína de unión del elemento sensible a hidratos de carbono) y al SREBP-1c (proteína de unión del elemento esteroide-regulador-1c). La fructosa es un componente de la dieta occidental presente en una amplia variedad de bebidas azucaradas. El metabolismo de la fructosa tiene ciertas particularidades que promueven de manera más intensa la enfermedad por hígado graso. Primero, esta se absorbe por la vía porta y se distribuye hacia el hígado en mayor concentración que en otros tejidos. Por otro lado, la fructosa promueve la lipogénesis cuando hay un estado de Resistencia a la insulina puesto que la fructosa no requiere insulina para ser metabolizada y estimula directamente SREBP1c. Por último, la fructosa también lleva a la depleción de ATP y a la supresión de la oxidación mitocondrial de ácidos grasos aumentando la producción de ROS [Softic, 2016]. Este modelo ha sido probado en ratas de la cepa Wistar, las cuales se dividieron en 4 grupos, uno con dieta normal, otro con HFD, otros con dieta normal y agua con fructosa al 25%, y el último con dieta HFD y agua con fructosa al 25%. Se sacrificaron las ratas al inicio, a los 2 y 8 meses. Esto demostró que la combinación de grasas y carbohidratos llevan al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólico, resistencia a la insulina, dislipidemia, etc. La dieta HFD más fructosa además produjo esteatosis hepática complicada con inflamación y fibrosis, lo cual se corroboró mediante cortes histológicos, y también se observó un aumento en los niveles de glucógeno hepático. Sin embargo, el solo consumo de dieta con fructosa indujo solamente insulinoresistencia, intolerancia a la glucosa e hipertrigliceridemia, con un aumento en el glucógeno hepático [Xu y cols, 2010].

VII. JUSTIFICACIÓN

La EHGNA es un trastorno global frecuente con prevalencia estimada entre 2.8 y 24% de la población general, la cual continúa en incremento secundario a la epidemia de obesidad y síndrome metabólico. Afecta principalmente a países occidentales, teniendo el primer lugar México y en segundo lugar Estados Unidos en donde la prevalencia es de 17.05% [Méndez-Sánchez, 2010].

La historia natural de la EHGNA indica que, de no tratarse adecuadamente, puede progresar a EHNA, ésta a cirrosis y a hepatocarcinoma. En la actualidad las estrategias utilizadas para tratar esta enfermedad se basan en modificación de los hábitos en el estilo de vida como dieta y ejercicio. Golabi y Locklear en 2016 publicaron que la combinación de dieta más ejercicio es más efectiva que únicamente la dieta para reducir los triglicéridos intrahepáticos. Y por otro lado tanto el ejercicio aeróbico como el ejercicio intenso constante también resultaron estrategias efectivas para reducir el contenido intrahepático de triglicéridos y la cantidad de grasa abdominal así como para mejorar la presión arterial, sin embargo, este se tiene que realizar por un periodo mínimo de 6 a 12 meses para obtener el beneficio [Zhang y cols, 2017]. Por lo que se han agregado tratamientos farmacológicos que no son totalmente efectivos para erradicar este problema de salud pública [Bernal-Reyes y cols, 2019].

El café es una bebida compleja con amplia distribución a nivel mundial que posee gran variedad de propiedades benéficas para la salud como se menciona previamente. En salud hepática se ha probado con otros modelos experimentales. En el modelo de daño hepático por dimetilnitrosamina el café, disminuyó la expresión de TGF- β a nivel hepático con diferencia estadísticamente significativa, previniendo la fibrosis hepática (Lozano y cols, 2016). Además, nuestro grupo de trabajo comprobó los efectos antioxidantes del café regular, café descafeinado y cafeína en el modelo de daño hepático mediante ligadura de conducto biliar mediante la disminución de los niveles de MDA y el mantenimiento de los niveles de GSH [Arauz y cols, 2016].

Por todo lo anteriormente mencionado, proponemos que la evaluación de los efectos del café en la EHGNA inducida experimentalmente puede otorgar resultados importantes para considerarla una alternativa farmacológica para el tratamiento de esta enfermedad.

VIII. HIPÓTESIS

La administración de café retrasará la progresión de la EHGNA producida experimentalmente en un modelo murino debido a la amplia variedad de moléculas con propiedades antioxidantes y antifibrogénicas.

IX. OBJETIVOS

9.1 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto hepatoprotector del café en la prevención de la EHGNA generada experimentalmente en un modelo murino.

9.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1) Inducir la EHGNA en un modelo murino de la cepa Wistar administrando una dieta hipercalórica.
- 2) Evaluar el efecto hepatoprotector del café a través de la determinación de enzimas hepáticas (γ -glutamyl transpeptidasa y alanino aminotransferasa) y el perfil lipídico (colesterol, triglicéridos, LDL y HDL).
- 3) Determinar la capacidad antioxidante del café en la EHGNA mediante la cuantificación de los niveles de MDA (malondealdeído), GSH (glutación reducido) y antiinflamatoria mediante la expresión de TGF- β (Factor transformante β).
- 4) Determinar los cambios histológicos de los sujetos de estudio tratados mediante la tinción de hematoxilina-eosina.

X. METODOLOGÍA

10.1 Diseño del estudio

- Tipo de estudio: Experimental, prospectivo, longitudinal, de casos y controles.

10.2 Grupo de estudio

- Población: Ratas macho de la cepa Wistar, de 6 semanas de edad.
- Periodo de estudio: 2017-2019.

10.3 Entorno

- Laboratorio de farmacología y de biología celular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Baja California, campus Mexicali.

10.4 Procedimiento

Se utilizaron treinta y dos ratas macho de la cepa Wistar de 6 semanas de edad. Los animales de estudio recibieron el cuidado y la atención de acuerdo a las guías institucionales y a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 correspondiente a las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

Se inició con un peso de 90-100 g obtenidas de UPEAL-Cinvestav (Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio), las cuales se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Medicina de Mexicali, a temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) y humedad (50-60 %) controladas, el ciclo de luz-oscuridad de 12 horas y con libre acceso a agua y alimento, en jaulas de policarbonato. Posterior a la aclimatación, al llegar a un peso de 110-120 g fueron agrupadas de manera aleatoria en 4 grupos (n final=8) de la siguiente manera:

- **Grupo 1:** Control, ratas alimentadas con alimento comercial y agua natural *ad libitum* durante 18 semanas.
- **Grupo 2:** EHGNA, ratas alimentadas con una dieta hipercalórica rica en grasas (HFD) y agua con fructosa al 20 % *ad libitum* durante 18 semanas.

- **Grupo 3:** EHGNA + café, ratas alimentadas con una dieta HF y agua con fructosa al 20 % *ad libitum*, junto con la administración de 1 mL de infusión de café, a dosis de 250 mg/kg por vía oral diariamente durante 18 semanas.
- **Grupo 4:** Café, ratas alimentadas con alimento comercial y agua natural *ad libitum* más la administración diaria de Café a la dosis y vía de administración antes mencionada durante 18 semanas.

Se realizó pesaje semanal de los sujetos de estudio. Al término de cada uno de los tratamientos (18 semanas), los animales fueron sometidos a un ayuno durante la noche y serán sacrificados a la mañana siguiente bajo anestesia con la inyección intraperitoneal de pentobarbital a dosis de 50 mg/kg (Nembutal®), y a través de una punción cardiaca, se obtuvo la mayor cantidad de sangre posible y guardada a -20°C hasta su análisis, a partir de la cual se determinaron los marcadores bioquímicos. Se extrajo el hígado en su totalidad, se pesó y se lavó inmediatamente y posteriormente fue dividido, una parte se destinó a la realización de estudio histopatológico por lo que se colocó en formaldehído y el resto fue congelado en nitrógeno líquido a -80°C para posterior análisis de proteínas (Figura 11).

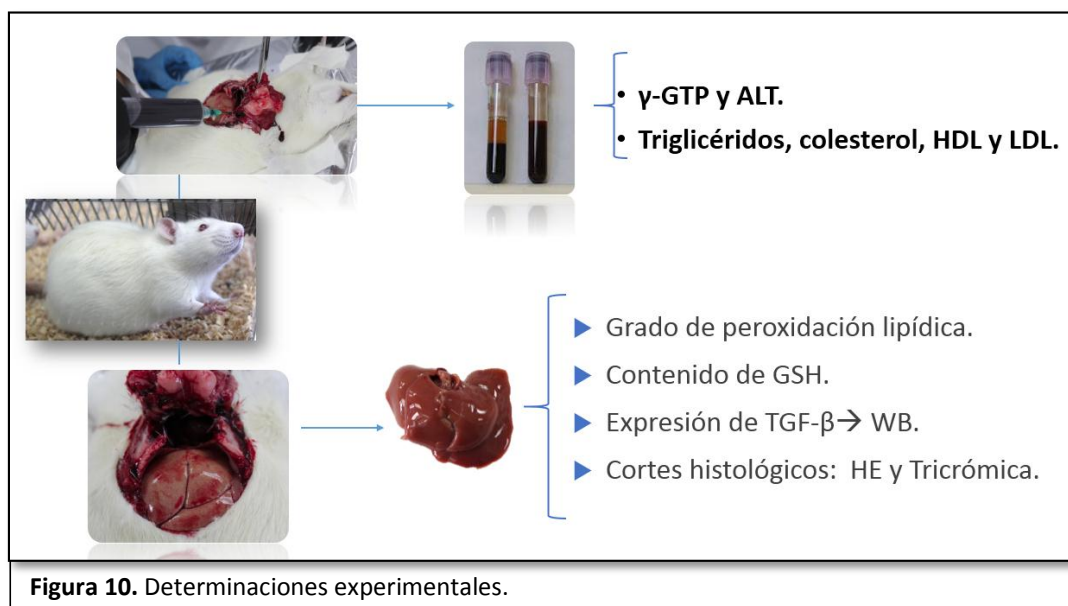


Figura 10. Determinaciones experimentales.

10.5 Análisis bioquímicos

El perfil lipídico se realizó cuantificando niveles de triglicéridos, colesterol, LDL y HDL a nivel sérico mediante un analizador automático multicanal (Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Alemania) con apoyo de laboratorio Dorado (Mexicali, Baja California).

10.6 Análisis enzimático.

La sangre recolectada mediante punción cardiaca se centrifugó a 15 000 g por 15 minutos para obtener el suero, a partir del cual se realizó la medición de la actividad de alanin aminotransferasa [ALT; Reitman y Frankel, 1957) y γ -glutamyl transpeptidas (γ -GTP; Glossman y Neville, 1972].

10.7 Actividad de ALT.

La actividad de la enzima alanina aminotransferasa se determinó por el método de Reitman y Frankl, 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 correspondientes a blancos y a problemas para cada muestra.

10.8 Actividad de γ -GTP

La determinación de la actividad enzimática de la γ -GTP se realizó de acuerdo a Glossmann y Neville. Previa incubación por 19 minutos a 37° C se agregaron 200 μ L de plasma iniciando la reacción del sustrato la glutamil-p-nitroanilida, en presencia de la enzima γ -GTP. Se incubó nuevamente a 37°C durante 30 minutos y se agregaron 2 mL de ácido acético 1.5 M para detener la reacción. Se cuantificaron los niveles de p-nitroanilina con un espectrofotómetro a 410 nm. 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.

10.9 Determinación de glucógeno hepático.

La determinación del glucógeno hepático se realizó con la técnica de la antrona [Seifter y cols, 1950]. Se tomaron 0.5 g de hígado y se colocaron en tubos de tapón esmerilado, se les adicionó 1.5 mL de KOH al 30%, se cerraron y se colocaron en baño de agua durante 30 minutos. Se pasó la solución a un matraz volumétrico de 25 mL y se afora con agua, de lo cual se recolectaron de 40 a 160 μ L con pipeta volumétrica, llevándolo a 1 mL. Se preparó una solución de antrona 0.2% en H₂SO₄ concentrado. Se añadieron 2 mL a cada tubo enfriado sobre hielo agitando suavemente con ayuda de una bureta. Se colocaron posteriormente en baño de agua hirviendo por 15 minutos. Se sometieron inmediatamente a enfriamiento con agua y hielo. Se leyó con espectofotómetro a 620 nm. Se expresaron los resultados como gramos de glucógeno/100 g de hígado teniendo en cuenta las diluciones realizadas. Se realizaron los cálculos con la siguiente fórmula:

$$\frac{20 \times A(mtra)}{1.11 \times A(std)} = \mu g \text{ sw glucógeno en la alícuota}$$

A(mtra) = Absorbancia de la muestra.

A(std) = Absorbancia del estándar.

10.10 Determinación de proteínas por método de Bradford.

Esta determinación se efectúa por el método de [Bradford, 1976], en el que las proteínas se unen al azul brillante de Coomassie. Este último presenta dos coloraciones, rojo y azul. La forma de color rojo se convierte en azul cuando se une a las proteínas. Se tomaron 100 μ L del homogenado y se llevó a 1,000 μ L el agua tridestilada. Posteriormente se tomaron alícuotas para proteínas las cuales se llenaron con 20 mL de la dilución anterior y con 80 mL de agua tridestilada. Se agregaron 2.4 mL del reactivo. Por último se leyó absorbancia a 595 nm. Fue necesario preparar una curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina (1 mg/mL), colocando 0, 10, 15, 25, 30, 35, 40, 45, 50 μ L completando con agua a 100 μ L.

10.11 Determinación de MDA (Malondialdeído).

El grado de peroxidación lipídica se determinó en homogenizado de hígado mediante el método del ácido tiobarbitúrico (TBA) que reacciona con el Malondialdeído y sus

subespecies reactivas oxidadas (Buege y Aust, 1978). Se pesaron 0.5 g de hígado se homogenizaron en 5 mL de agua de lo cual se tomaron 300 μ L del homogenado al 10% y se le agregaron 700 μ L de Tris-HCl 150 mM para completar 1 mL. Posteriormente se incubaron las muestras a 37° C por 30 minutos. Después se agregaron 2 mL de TBA al 0.375% disuelto en ácido tricloroacético (TCA) al 15% y se pusieron en ebullición por 45 minutos seguido de centrifugación a 3000 X g durante 10 minutos. Se obtuvo el sobrenadante y la absorbancia de este se midió a 532 nm.

10.12 Determinación del contenido de hidroxiprolina

La técnica se basa en el método de Rojkind y González [1974] para la determinación de hidroxiprolina. Se pesaron 0.1 g de hígado de rata previamente secado con papel filtro y se colocaron en una ampolleta a las cuales se le agregaron 2 mL de HCl 6N. Las ampolletas fueron selladas con mechero, para posteriormente colocarlas a 100°C en el horno durante 24 horas. Una vez hidrolizada la muestra, se abrieron las ampolletas y se colocaron nuevamente al horno a temperatura de 60-80°C aproximadamente 24 horas. Las muestras ya secas se resuspendieron con 2 mL de solución amortiguadora y se agitaron vigorosamente en el vórtex, vaciando el contenido en un tubo de ensayo. Se centrifugaron las muestras a 3000 X g durante 15 min. Se extrajo el sobrenadante y se colocó en un tubo que contenía una porción de anorita volviendo a centrifugar a 3000 X g por 15 minutos. Del sobrenadante se recolectó 1 mL y se agregó 1 mL de H₂O y 1 mL de cloramina T. Se deja reposar exactamente 20 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se adicionaron 0.5 mL de tiosulfato de sodio 2 M, 1 mL de NaOH 1N y aproximadamente 2 g de NaCl, agitanado vigorosamente para detener la reacción. A cada tubo se le agregaron 6 mL de tolueno y se agitaron por 1 minuto. La fase de tolueno se utiliza para la determinación de prolina y la fase acuosa para la hidroxiprolina. Primero se extrajo la capa de tolueno. La porción acuosa se cubrió y se colocó en baño de agua hirviendo durante 20 minutos. Se dejaron enfriar los tubos y una vez fríos se les agregaron 6 ml de tolueno y se agitaron durante 1 minuto. De la fase de tolueno se tomaron alícuotas por duplicado de 1

mL y se les agregaron 4 mL del reactivo de Ehrlich y se agitaron vigorosamente. Después de reposar por 30 minutos se realizó la espectometría y se leyó a 560 nm.

10.13 Análisis de Western Blot de TGF- β .

Se utilizó el reactivo TriPure (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EEUU) para aislar proteínas totales del tejido hepático. El tejido fresco se homogenizó en 1 mL del reactivo TriPure, se le añadió 0.2 mL de cloroformo y se tratará con isopropanol para precipitar las proteínas totales. Las muestras se centrifugaron a 15 000 g por 10 minutos a 4 °C, después se realizaron tres lavados con 0.3M de hidrocloreuro de guanidina en etanol a 95%. Se hizo un lavado final con etanol al 100%, se volverá a centrifugar para ser suspendido en SDS (dodecilsulfato sódico) al 1%. Se tomará un volumen equivalente a 50 mg de proteínas (determinadas por el método de Lowry) y se transferieron al gel de poliacrilamida al 12%. Una vez separadas, las proteínas se transferieron a una membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno) ImmunoBlotTM (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU).

Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 7% por 60 minutos a temperatura ambiente y se incubaron independientemente durante la noche a 4°C con el anticuerpo específico contra TGF- β 1 (GTX101147 (HO1) GeneTex Inc, Irvine, CA). A la mañana siguiente las membranas fueron lavadas y se verán expuestas a un anticuerpo secundario etiquetado con peroxidasa de rábano (Goat anti-Rabbit IgG (HRP) GeneTex Inc, Irvine, CA) en la solución bloqueante por una hora a temperatura ambiente. Los paneles serán lavados y las proteínas serán reveladas mediante el sistema de detección quimioluminiscente TM Plus-ECL (NEN Life Sciences Products, Elmer LAS Inc., Boston, MA, EEUU).

Posteriormente las membranas fueron cortadas e incubadas con anticuerpos monoclonales contra β -actina (García-Tovar et al., 2001) para ser utilizados como control de carga. Para cortar las membranas se lavaron cuatro veces con PSB a un pH de 4 (0.015 M, 0.9% NaCl), después serán inmersos en 100 mM de 2-mercaptoetanol, dodecilsulfato sódico al 2% y Tris-HCL 62.5mM con pH de 6.7 por 30 minutos a 60 °C. Las membranas se lavaron nuevamente tres veces con Tween-20 al 0.05% en PSB. Se digitalizaron las imágenes con el

sistema BioDoc-It (UVP, Upland, CA, EEUU) y se analizarán con densitometría mediante el software Lab Works 4.0 para la adquisición y análisis de imagen.

El reactivo “Tripure™ Isolation Reagent (Roche)” 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 el método del ácido bicinconínico. Posteriormente, 50 µg 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 30 min con una solución de bloqueo de leche descremada al 5 % y Tween 20 al 0.05 %. Las membranas fueron incubadas durante toda la noche con anticuerpos primarios dirigidos contra las citocinas TGF-β, (Millipore Corp. Billerica, MA, USA).

Al día siguiente las membranas fueron lavadas y posteriormente expuestas al anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano (Zymed) durante 2 horas. Finalmente la detección de las bandas de interés se llevó a cabo con un kit de quioluminiscencia (Amersham). La intensidad de las bandas de señal para la proteína de interés fueron digitalizadas y analizadas por densitometría utilizando el software lab Works 4.0 imaging. Se llevaron a cabo correcciones de la cantidad de proteína cargadas con el gel utilizando un anticuerpo monoclonal con la proteína estructural β-actina (Pérez-Severiano y cols, 2002).

10.14 Análisis de GSH

Se midieron los niveles de glutatión reducido (GSH) en tejido hepático con un método enzimático con un kit comercial disponible en catálogo (número 371757, Calbiochem, Darmstadt, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se recolectaron las muestras de tejido hepático para la medición de GSH para ser homogenizados (0.3 g) con politrón y se incubaron a temperatura ambiente por 2-10 minutos. Posteriormente las

muestras fueron acidificadas con ácido metafosfórico al 5 % y se centrifugaron a 12 000 rpm por 20 minutos a 4° y se extraerá el sobrenadante 0.1 mL). Se agregaron 2.1 mL de solución de fosfatos y 0.25 mL del reactivo de Ellman, que producirá un producto detectable por espectrofotometría a 412 nm.

10.15 Histopatología

La técnica utilizada fue la tinción de Hematoxilina y Eosina (HE) en la que se tiñen los núcleos azulados y al citoplasma y matriz de diferentes tonos de rosa y rojo. Para realizar esta tinción, los cortes de hígado se depositaron en un vial conteniendo una solución fijadora de formaldehído (formol) al 10% en PBS, durante un tiempo mínimo de fijación de 24 horas. Después, los cortes se lavaron con agua corriente, se deshidrataron en alcoholes y se embebieron en parafina. Se hicieron cortes de 6-7 micras de grosor y se cubren con silano. Posteriormente las rebajadas de tejido se bañaron con Xileno durante 5 minutos para desparafinización y una vez lograda, se hidrataron con etanol en concentraciones decrecientes: absoluto, al 90% y al 70%) por 7 minutos en cada uno y se enjuagaron con agua destilada por 7 minutos. Se les agrego Hematoxilina de Harris por 6 minutos. Se enjuagaron con agua corriente por otros 5 minutos y luego con etanol al 96% por 1 minuto. Se agregó Eosina-Floxina dejándose durante 5 minutos. Se sumergen nuevamente en etanol pero en concentraciones crecientes: al 70% por 5 segundos, al 90% por 5 segundos y en etanol absoluto por 5 minutos, para deshidratarse. Después se sumergieron en xileno por 5 segundos y se dejaron secando. Por último, se sumergieron nuevamente en xileno pero esta vez por 5 minutos y después se dejaron secando.

10.16 Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando el promedio $\pm$ error estándar. Las comparaciones entre grupos se realizaron a través de un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Tukey y se utilizó T de Student pareada cuando se compararon los grupos Control vs Café y HFD vs HFD + Café, utilizando el programa Graphpad Prisma para

Windows (versión 2.0). Se consideraron diferencias significativas cuando el valor de P fue menor de 0.05.

XI. RESULTADOS

11.1 Ganancia de peso corporal.

La ganancia de peso corporal forma parte de las manifestaciones clínicas que surgen como consecuencia de una dieta rica en grasas, por lo tanto es un elemento importante a evaluar para poder observar los cambios clínicos que surgen en la EHGNA. En la Figura 11 se muestra la diferencia de peso en los cuatro grupos al final de las 18 semanas. Se observó un aumento de peso significativo en el grupo de daño (HFD) con respecto al control ($p < 0.05$). Esta ganancia de peso se redujo al estar administrando café de manera concomitante con la dieta rica en grasas. Los grupos control mostraron pesos similares.

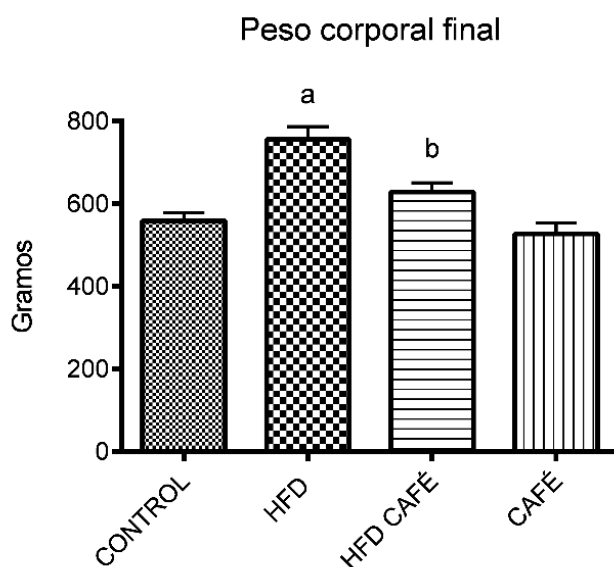


Figura 11. Peso corporal final. Cada barra representa el promedio de cada grupo $\pm$ el error estándar.

a, diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$.

b, diferencia significativa con respecto al grupo de HFD $p < 0.05$.

11.2 Peso final del hígado.

La EHGNA es un cuadro clínico por lo general asintomático, encontrando como hallazgo algún tipo de hepatomegalia. En la figura 12 muestra que hubo una hepatomegalia marcada en el grupo HFD, al finalizar las 18 semanas, al compararla con el grupo control. Observamos que el café disminuyó esta ganancia de peso hepático en el grupo HFD + Café. En cambio se muestra como el café por sí solo no afectó el peso de este órgano.

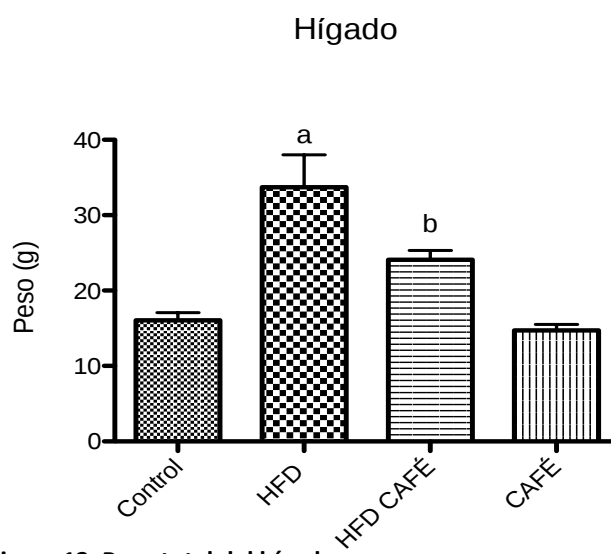


Figura 12. Peso total del hígado.

Cada barra representa el promedio de cada grupo $\pm$ el error estándar.

11.3 Ingesta calórica bisemanal.

Previamente observamos que el café previno la ganancia de peso corporal aun cuando se consumió una dieta rica en grasas, por lo que fue importante cuantificar la ingesta de alimento y corroborar si hubo alguna diferencia entre los grupos. En la siguiente tabla se observa la ingesta de alimento promedio bisemanal que presentó cada grupo de estudio, (representado en gramos). Se realizó una prueba T pareada comparando los grupos HFD vs HFD + Café y Control vs Café obteniendo un valor de p de 0.7578 y 0.0615, respectivamente, siendo una diferencia no significativa.

SEMANAS	CONTROL		HFD		HFD + CAFÉ		CAFÉ	
	MEDIA	DE	MEDIA	DE	MEDIA	DE	MEDIA	DE
2	106.07	5.54	143.96	28.73	125.92	10.86	106.25	4.81
4	121.67	1.98	159.92	25.13	172.14	14.53	122.42	2.28
6	169.14	6.49	133.21	28.26	146.42	22.44	170	6.58
8	163.28	7.34	149.71	9.56	148.53	7.89	167.46	6.19
10	167.60	2.77	143.96	43.95	146.21	19.64	168.28	3.99
12	189.25	5.44	307.14	21.31	291.14	43.95	192.14	4.49
14	228.14	16.35	338.93	10.1	340.60	12.26	228.14	16.35
16	261.28	6.78	315.44	17.81	348.5	13.60	271.09	6.15
18	264.78	4.99	228.34	38.72	216.68	6.86	265.87	5.43

Tabla 1. Ingesta de alimento bisemanal.

Se muestra la ingesta promedio en gramos que tuvo cada grupo experimental durante las 18 semanas.

De manera esquemática se observa lo anterior en la figura 13. Muestra que no hubo diferencia significativa en la ingesta de alimento entre los grupos a los que se le administró la dieta rica en grasas junto con fructosa ni entre los grupos que recibieron una dieta regular.

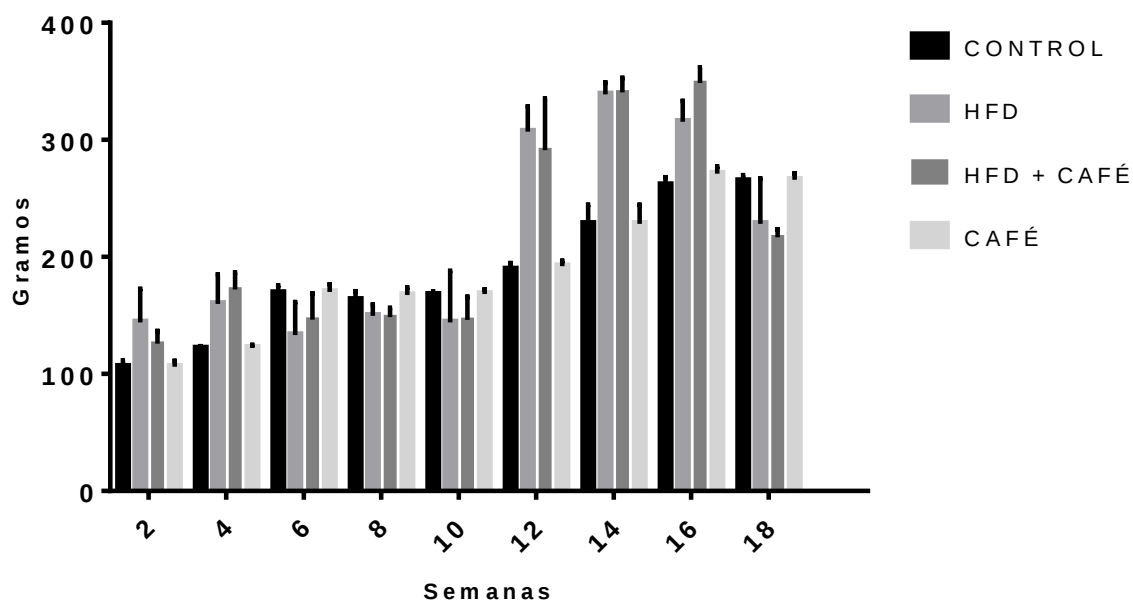


Figura 13. Ingesta calórica bisemanal.

Cada barra representa el promedio de cada grupo. Se compararon los grupos a los cuales se les otorgó una dieta rica en grasas (HFD) con y sin café. Se consideró significativo si $p < 0.05$.

11.4 Actividad enzimática de ALT y γ -GTP.

La ALT es una enzima que se utiliza en la clínica como un marcador de daño hepatocelular porque, al encontrar niveles séricos elevados, implica que hubo una disrupción

membranal del hepatocito, es decir, necrosis. En la figura 14-A se muestra hubo una tendencia a la elevación de los niveles séricos de ALT en el grupo HFD, pero sin llegar a ser estadísticamente significativo. De manera interesante, en el grupo al cual se administró café junto con la dieta occidental hubo una disminución significativamente menor incluso que los controles ($p<0.05$).

Por otro lado, en la figura 14-B, la γ -GTP es un marcador de daño colestásico, observándose una marcada elevación en el grupo HFD al compararse con los grupos control, mientras que en grupo HFD + Café no se observa un aumento, lo cual se puede traducir en que el café previene un daño a nivel del conducto biliar aun cuando hubo una ingesta hipercalórica.

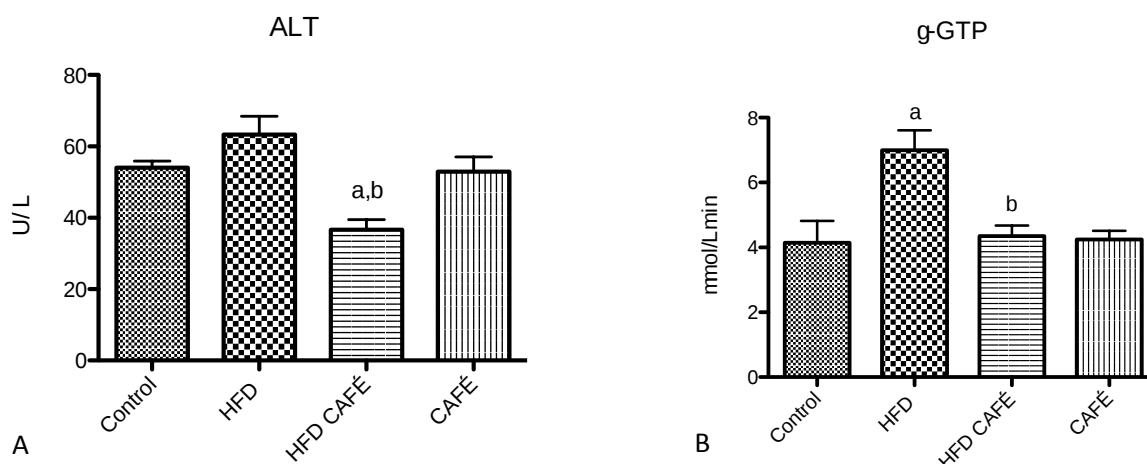


Figura 14. Actividad enzimática de la alanina aminotransferasa, ALT(A) y γ -glutamyl transpeptidasa, γ -GTP (B). Cada barra representa el promedio de cada grupo $\pm$ el error estándar. a, diferencia significativa con respecto al control $p<0.05$. b, diferencia significativa con respecto al grupo de HFD $p<0.05$.

11.5 Cuantificación del perfil lipídico

Uno de los hallazgos observados en EHGNA es la dislipidemia. En la figura 15 se muestra las mediciones de los diferentes elementos que conforman un perfil lipídico. Se muestra como en el grupo sometido a una dieta rica en grasas hubo una elevación importante en los niveles séricos de colesterol total (Figura 15-A), triglicéridos (Figura 15-B) y LDL (Figura. 15-D).

También se observó una disminución en los niveles de HDL al compararlos con el grupo control (Figura 15-C). Sin embargo, llama la atención la elevación en los niveles de triglicéridos séricos en el grupo HFD + café, aun mayor que en el grupo HFD (Figura 15-B).

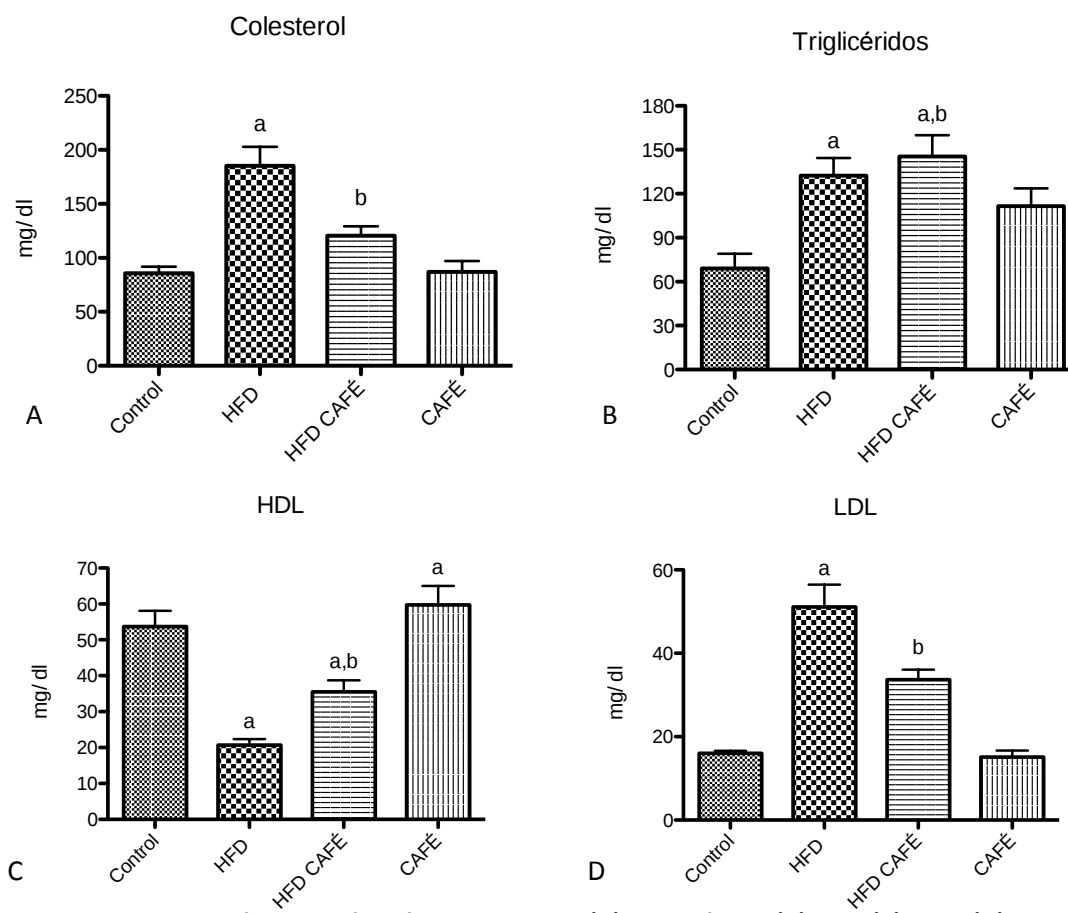


Figura 15. Determinación del perfil lipídico: Colesterol (A), Triglicéridos (B), HDL (C) y LDL (D) en suero. Cada barra representa el promedio de cada grupo $\pm$ el error estándar.
a, diferencia significativa con respecto al control $p < 0.05$.
b, diferencia significativa con respecto al grupo de HFD $p < 0.05$.

11.6 Medición de GSH y peroxidación lipídica.

El estrés oxidativo juega un papel importante en las enfermedades hepáticas por lo que se realizó la medición de un sistema antioxidante no enzimático (GSH) y un producto de daño por oxidación a nivel membranar (MDA). En la siguiente figura 16-A observamos que hubo una depleción de GSH en el grupo de daño y se observa como en el grupo HFD + café, la administración de este último previno la disminución en los niveles de GSH, aunque sin

mantener los niveles como en los grupos control. En la figura 16-B se muestran los niveles de MDA, el cual se incrementó de manera importante y significativa en el grupo HFD comparado con el grupo control. La administración de café junto con la dieta rica en grasas fue capaz de prevenir el incremento de manera total en la producción de MDA, producto de la peroxidación lipídica. De manera general, el grupo HFD presentó estrés oxidativo.

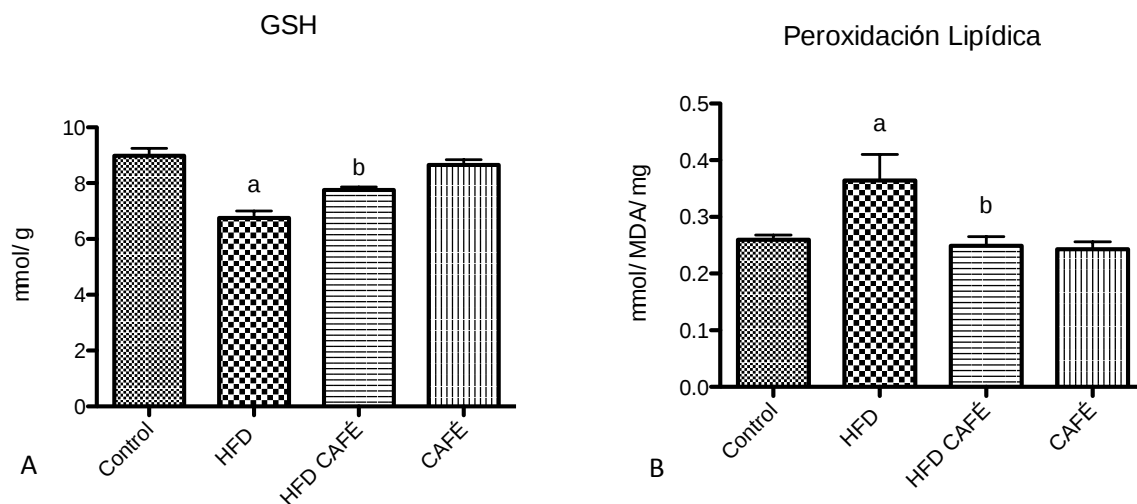


Figura 16. Determinación en hígado de los niveles de glutatión reducido (A) y peroxidación lipídica (B).

Cada barra representa el promedio 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 HFD $p < 0.05$.

11.7 Contenido de colágena y glucógeno a nivel hepático.

La colágena es un componente fundamental de la matriz extracelular, lo cual le proporciona sostén y brinda soporte al parénquima hepático. En la figura 17-A observamos una disminución estadísticamente significativa de los niveles de colágena a nivel hepático en el grupo de daño, al compararlo con los grupos control y en el grupo HFD+ Café, por lo cual podemos deducir que el café previene la depleción de colágena ya que se mantuvo en niveles similares a los grupos controles.

Por otro lado, el glucógeno nos indica la capacidad sintética del hígado, en la figura 17-B se muestra como en el grupo de daño por HFD el nivel de glucógeno disminuyó

drásticamente al compararse con el grupo control, sin embargo solo se puede apreciar un efecto protector por parte café los cuales mitigaron la disminución del contenido de glucógeno.

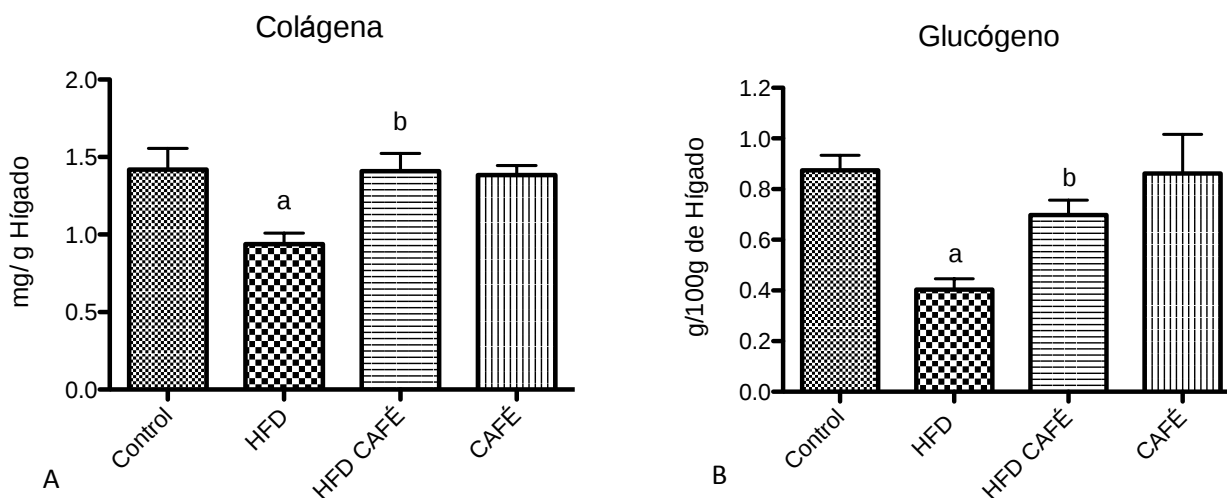


Figura 17. Determinación de los niveles de colágena (A) y glucógeno (B) en hígado.

Cada barra representa el promedio 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 HFD $p < 0.05$

11.8 Estudio histopatológico.

En la siguiente figura se observan piezas representativas de los hígados de cada uno de los cuatro grupos.

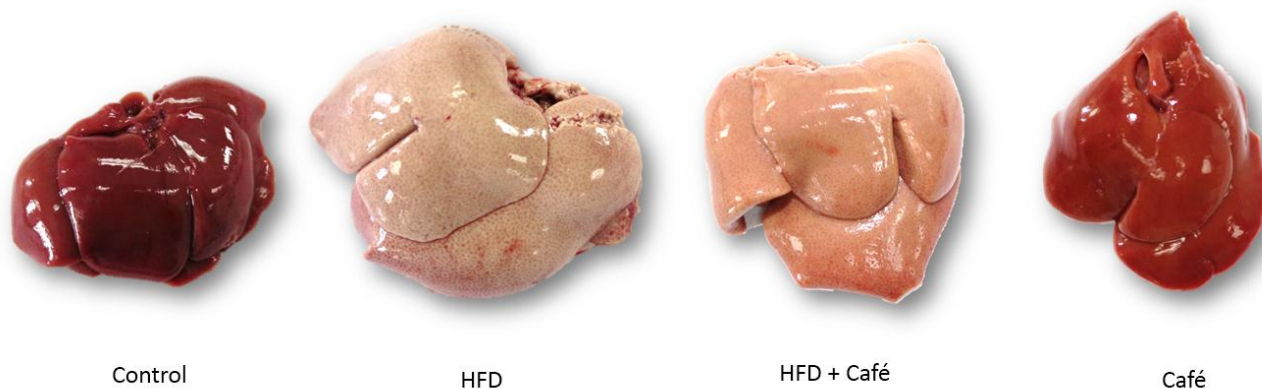


Figura 18. Visualización macroscópica de hígados representativos de cada grupo de estudio.

La primera imagen representativa corresponde al grupo control, en el cual se observa el color marrón-rojizo característico y con superficie lisa y conservada. La siguiente imagen corresponde al grupo de daño en el cual se muestra un incremento del tamaño, correspondiendo a lo observado en la figura 12 (peso final del hígado), además de un cambio en la coloración siendo de un color amarillo pálido, de superficie laxa, muy lábil. En la siguiente corresponde a un hígado del grupo HD+ Café en la que no hubo un incremento tan significativo en el tamaño como en el grupo HFD y la coloración es rosado, de un tono intermedio entre el grupo control y el grupo HDF. Por último, se muestra el hígado del grupo Café, el cual es de características muy similares al grupo control.

Para corroborar los resultados de las pruebas bioquímicas, realizamos la tinción de hematoxilina y eosina en cortes histológicos de hígado de rata de cada uno de los grupos. En la figura 19 se presentan cortes de hígado de grupo control, observamos la arquitectura normal del hígado, sin alteraciones patológicas. Por el contrario en la figura 20, correspondiente al grupo HFD, se muestra claramente la distorsión importante del patrón trabecular con esteatosis microvesicular en 60 % del parénquima hepático correspondiendo a una enfermedad por hígado graso no alcohólica tipo 2 con puntuación de NAS 3 sin fibrosis.

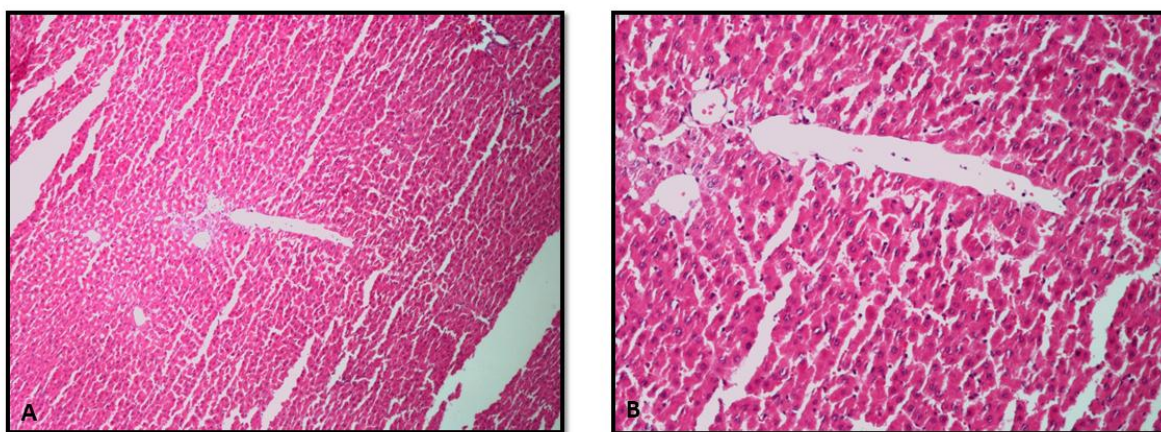


Figura 19. Visualización microscópica de muestras representativas del grupo control.
Se muestran cortes de parénquima hepático sin alteraciones patológicas 10X (A) y a 40X(B).

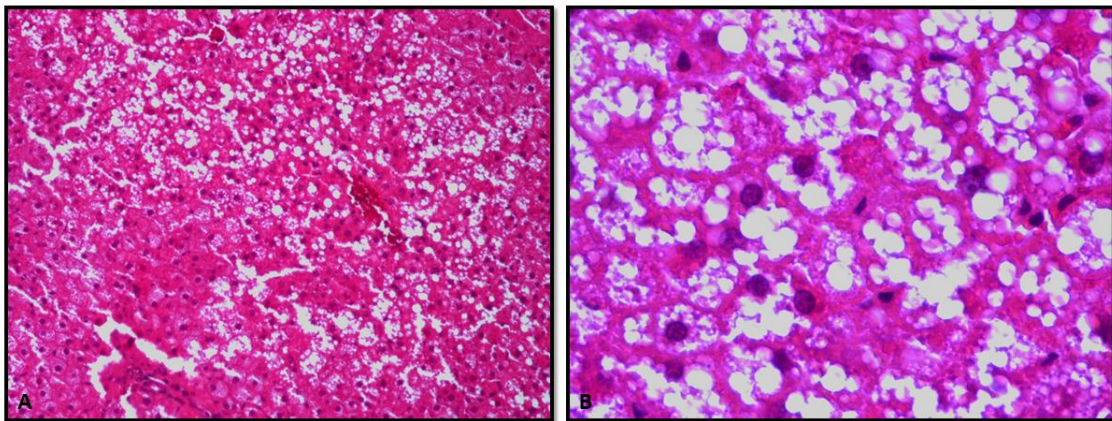


Figura 20. Visualización microscópica de muestras representativas del grupo HFD.

Se observa parénquima hepático con pérdida de su patrón trabecular. Hay esteatosis microvesicular que predomina en la zona 3 y afecta el 60% del parénquima. Se observan de 0-1 focos de infiltrado inflamatorio lobulillar formado por linfocitos. No hay degeneración balonoide. En los espacios porta no hay alteraciones patológicas. No se observa fibrosis. 40X (A) y a 100X(B).

A continuación observamos en la figura 21 los cortes histopatológicos de hígado del grupo que fue tratado con café (HFD + café. Se muestra esteatosis microvesicular en 5 – 10% del parénquima correspondiendo a una EHGA tipo 2 con puntuación de NAS 2.

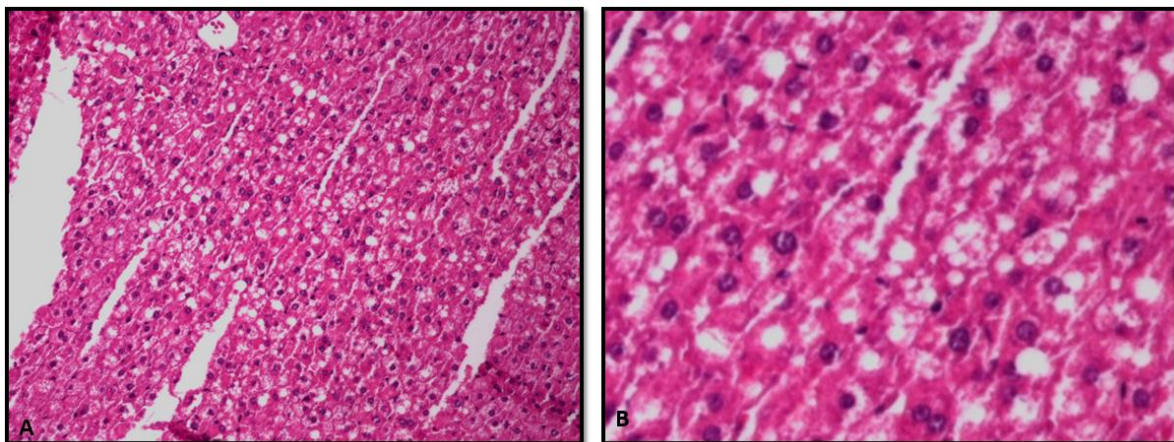


Figura 21. Visualización microscópica de muestras representativas del grupo HFD + CAFÉ.

Se observa parénquima hepático con pérdida de su patrón trabecular. Hay esteatosis microvesicular que predomina en la zona 3 y afecta aproximadamente el 5-10% del parénquima. Se observan de 0-1 focos de infiltrado inflamatorio lobulillar formado por linfocitos. No hay degeneración balonoide. En los espacios porta no hay alteraciones patológicas. No se observa fibrosis. 40X (A) y a 100X(B).

En la figura 22 observamos los cortes representativos del grupo Café mostrando arquitectura conservada y presencia de macrovesículas de grasa pero en menos del 1% del parénquima hepático.

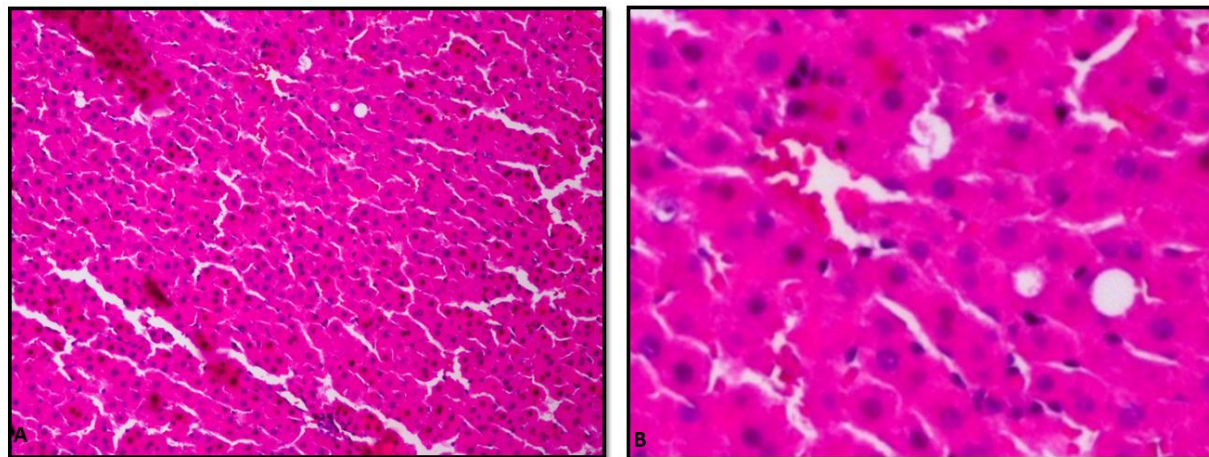


Figura 22. Visualización microscópica de muestras representativas del grupo Café.

Se muestra parénquima hepático con su arquitectura general conservada. Sólo muy escasos y aislados hepatocitos presentan esteatosis macrovesicular que afecta menos del 0.1 % del parénquima. No hay fibrosis ni otros datos de inflamación. 40 x(A) y 100X (B).

Los resultados histopatológicos se resumen en la siguiente tabla en la cual que comparan los cuatro grupos, observando el grado de daño histológico y el porcentaje de esteatosis en muestras representativas.

GRUPO	GRADO EHGNA	INFLAMACIÓN LOBULILLAR	ESTEATOSIS	PUNTUACIÓN NAS	FIBROSIS	NASH CRN
CONTROL	NA	NO	NO	NA	NO	0
HFD	TIPO 2	SI	60%	3	NO	0
HFD + CAFÉ	TIPO 2	SI	5—10%	2	NO	0
CAFÉ	NA	NO	0.1%	NA	NO	0

Tabla 2. Grado histológico de EHNA.

Se muestran los resultados histopatológicos de cada grupo, comparando las puntuaciones de NAS (NAFLD Activity Score). NAS: puntuación de esteatosis (0-3) + puntuación inflamación lobulillar (0-3) + puntuación balonización (0-2). NAS de 5 puntos o mayor es compatible con EHNA (NASH), Puntuación de fibrosis 1a: ausencia, 1b: fibrosis en zona 3 y/o perisinusoidal; 1c: fibrosis portal; 2: fibrosis perisinusoidal + fibrosis portal; 3: fibrosis en puentes; 4: cirrosis.

NASH CRN= Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research

11.9 Western blot de la citosina TGF- β

El consumo de una dieta de tipo occidental por 18 semanas logró incrementar significativamente la expresión del TGF- β 1 con respecto al grupo control, sin embargo cuando se administró café (HFD + Café) se logró disminuir el incremento de la expresión de TGF- β (figura 23). Por otro lado, de manera interesante la administración de café pudo prevenir de manera casi total la expresión de la citosina proinflamatoria.

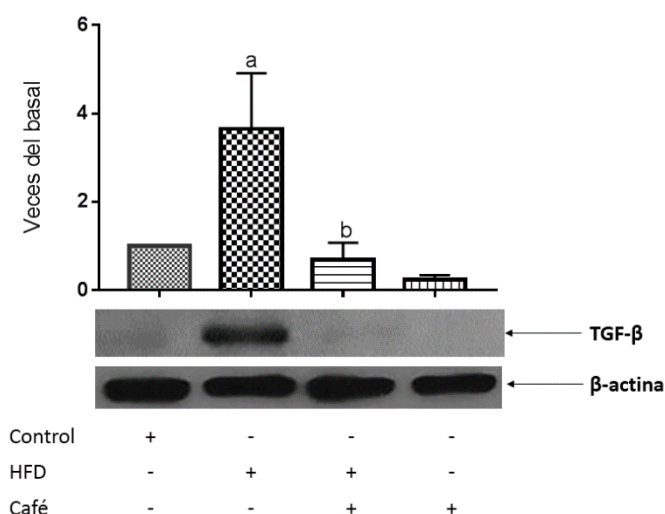


Figura 23. Expresión de TGF- β .

Cada barra representa el promedio 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 HFD $p < 0.05$

XII. DISCUSIÓN

Las principales causas de enfermedad hepática que culminan en cirrosis o hepatocarcinoma incluyen el abuso en el consumo de alcohol, infecciones a causa de virus de hepatitis B o C, y últimamente ha cobrado suma importancia el consumo de una dieta rica en grasas considerando a la EHGNA como el componente hepático del síndrome metabólico y su prevalencia se ha incrementado junto con la de la obesidad, de la diabetes mellitus tipo 2 y del propio síndrome metabólico. Hasta el momento, es la enfermedad hepática más común [Kwak y Kim, 2018]. Debido a la creciente epidemia mundial de obesidad y diabetes, se espera que la EHGNA sea la principal causa de Hepatocarcinoma y la primer indicación de trasplante hepático, lo cual no es un panorama alentador a mediano plazo [Byrne y Targher, 2015]. Esto último es preocupante en nuestra comunidad debido a que nuestro país ocupa el primer lugar en obesidad a nivel mundial, y de acuerdo a la Encuesta Nacional de Nutrición

(ENSANUT 2012), Baja California está ocupando los siguientes lugares: en niños el segundo lugar en sobrepeso (24.9%) y el décimo primero en obesidad (17.3%), y en adultos el lugar número 29 en sobrepeso (35.4%) y el séptimo en obesidad. Por lo anteriormente suscitado, se sabe que México tiene una población que reúne varios factores de riesgo para presentar EHGA que desafortunadamente se encuentra subdiagnosticado pero se estima que su prevalencia es de alrededor del 50% y esta podría ir en aumento por lo cual el panorama no es muy alentador.

La EHGA comprende una amplia variedad de sucesos que constituyen un daño hepático. Inicialmente se encuentra una esteatosis hepática simple. Al continuar con la exposición a la dieta rica en grasas, hay una respuesta inflamatoria resultando en una esteatohepatitis no alcohólica, etapa en la cual puede haber depósito de colágena y, de continuar, se establece una fibrosis y su consecuencia final, la cirrosis, la cual se caracteriza por la formación de nódulos de regeneración y disfunción hepática, ya que el parénquima hepático se ve sustituido por matriz extracelular. En nuestro modelo experimental empleado en este estudio durante 18 semanas se estableció una esteatosis hepática no alcohólica.

En este trabajo nos centramos en los efectos del consumo de café sobre la EHGA experimental, en el cual se observa que el café previene la progresión de la enfermedad, donde probablemente los compuestos contenidos en la mezcla del café juegan un papel importante.

En el grupo HFD hubo un aumento de peso corporal estadísticamente significativo al compararlo con el grupo control y al administrar de manera concomitante el café vimos que disminuyó de manera importante esta ganancia de peso lo cual se puede atribuir a los propios mecanismos intrínsecos del café y no a su efecto propiamente anorexígeno como se ha reportado en estudios en pacientes [Schubert, M.M. y cols, 2017], puesto que no hubo una disminución en la ingesta de alimento en los grupos sometidos a una dieta rica en grasas con y sin café como mostramos previamente en la tabla 1. Además, se muestra que el grupo

HFD presenta una hepatomegalia marcada, observamos que el porcentaje de peso del hígado en el grupo control fue del 2.9%, en el HFD del 4.4%, en el de HFD + café de 4.1% y en el de café fue de 2.7%. Este aumento de tamaño hepático se debió al depósito de lípidos que se dio de manera ectópica en este tejido el cual se acumuló en forma de vesículas de triglicéridos corroborado por medio del estudio histopatológico otorgándonos el diagnóstico, tal y como se confirma en pacientes [Chalasani y cols, 2018].

Por otra parte, el diagnóstico en seres humanos se apoya en estudios de laboratorio (enzimas hepáticas como ALT, AST y GTP) junto con estudios de imagen, otra opción es una toma de biopsia, sin embargo, el elevado riesgo de un probable sangrado durante esta práctica conlleva un alto riesgo de complicaciones [Piccinino, F y cols, 1986]. Varios estudios muestran un posible efecto favorable entre el consumo del café en la función hepática y las enfermedades del hígado, los cuales se han acumulado en las últimas dos décadas. Estos estudios abarcan; desde una reducción en los niveles de las enzimas hepáticas, 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].

Con base en lo anterior se pudo establecer la EHGNA mediante datos bioquímicos. La actividad de ALT, aunque es un marcador específico de daño hepático pero no de EHGNA, en donde suele estar elevada. El perfil hepático en este modelo se vio alterado, corroborando que si se presentó una disfunción hepática. Aunque el aumento en los niveles de la actividad de esta enzima no fueron significativos en el grupo HFD si hubo una tendencia a la elevación comparado con el grupo control y como publicaron Mofrad y colaboradores en 2003, los niveles de ALT no se correlacionan directamente con la severidad de la enfermedad. Los datos obtenidos muestran que la administración de café previene la muerte de los hepatocitos, al disminuir la actividad de la ALT en el grupo tratado con HFD concomitantemente con café. Interesantemente, observamos que los niveles de ALT no se vieron afectados en el grupo Café, grupo en el cual son sujetos de estudio con hígados sanos

y que esperábamos una reducción de los niveles de ALT, sin embargo, Urgert y colaboradores en 1996, al comparar el café filtrado y no filtrado, estos produjeron una elevación de transaminasas en humanos sanos que se debe al efecto de Caweol y kafestol [Weusten y cols, 1994] por lo tanto, se explica en parte este resultado.

Por otro lado, se observó que predominó el efecto protector del café del daño colestásico como puede verse por la disminución de los niveles de γ -GTP, lo cual es un efecto ampliamente demostrado del café en distintos procesos hepáticos [Heath y cols, 2017].

De forma similar en los seres humanos, se logró producir una dislipidemia importante en el grupo sometido a una dieta occidental. Esto se mostró con la elevación de colesterol total a nivel sérico, pero también con el aumento de LDL y la disminución de HDL. Sin embargo, hubo un aumento estadísticamente significativo en los niveles de triglicéridos en el grupo al que se le administró una dieta occidental junto con café hervido y no filtrado, lo cual se correlaciona histopatológicamente en el corte correspondiente al grupo Café (figura 23) en la cual se observaron vacuolas de lípidos, sin embargo en un 0.5% del parénquima hepático lo cual no tiene mayor repercusión. Esto ya ha sido reportado desde 1989 por Stenvold y colaboradores quienes encontraron que el consumo de café hervido tiende a elevar tanto los triclicéridos como los niveles de HDL, y este efecto se ve mayormente en hombres que en mujeres. Se sabe que el café contiene una gran fracción lipídica, de la cual el 75.2% está compuesto por triglicéridos y al no filtrarse, se consumen. Esta elevación de triglicéridos no ha demostrado elevar el riesgo cardiovascular ya que logra mantener los niveles adecuados tanto de HDL como de LDL [Jee y cols, 2001].

Estudios recientes han demostrado que el café es una fuente directa de antioxidantes y esto se traduce en un beneficio para la salud por la capacidad de prevenir el daño tisular mediante la neutralización de los efectos de las especies reactivas de oxígeno (ROS). El café es una mezcla de miles de compuestos tales como fenólicos, kafestol, kahweol, ácido

nicotínico y cafeína, los efectos que se han mostrado in vitro son propiedades antioxidantes y anti-mutagénicas [Sanchez y cols, 2005].

El estrés oxidativo es el resultado de un desequilibrio entre la generación de las ROS y las defensas antioxidantes de la célula, afecta a los principales componentes celulares, incluyendo a los lípidos, proteínas y ADN. Este fenómeno está estrechamente asociado con muchas enfermedades degenerativas, incluyendo las patologías del hígado [Cesaratto y cols, 2004]. Las células han desarrollado sistemas antioxidantes eficientes para prevenir el aumento de las ROS y prevenir el estrés oxidativo. Uno de ellos es el GSH por lo cual en este trabajo decidimos determinar los niveles de esta antioxidante. Observamos el grupo que fue sometido a una dieta occidental presento una disminución en los niveles de GSH de manera significativa respecto al grupo control. Por otra parte, cuando se utiliza café se observó una prevención en la disminución en la concentración de este compuesto.

El daño producido por HFD causa un aumento significativo en los niveles de MDA, uno de los principales productos de la peroxidación lipídica provocado por el aumento del estrés oxidativo. Del mismo modo el café disminuyeron los niveles de MDA, mostrando de esta manera una reducción del estrés oxidativo a nivel de la membrana plasmática. Los resultados presentados aquí proporcionan información básica que puede explicar los efectos benéficos observados en los ensayos clínicos que muestran correlaciones inversas entre el consumo de café y la EHGNA [Catalano, D. y cols, 2010; Greater, T. y cols, 2015].

Los efectos benéficos del consumo del café se explican debido a sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias bloqueando la sobreexpresión de TGF- β y esta a su vez disminuye la expresión de su mediador río abajo el CTGF trayendo como consecuencia una atenuación del proceso inflamatorio [Arauz y cols, 2017]. El TGF- β es la citosina profibrogénica por excelencia, sin embargo, en este modelo experimental no se estableció fibrosis/cirrosis hepática durante las 18 semanas.

En este estudio se muestra que el café no filtrado inhibió de manera significativa, el aumento de la expresión de TGF- β 1 producida por el consumo de una dieta occidental y

como consecuencia previnieron el establecimiento de una esteatohepatitis no alcohólica. Existe una relación directa entre los niveles de TGF- β 1 y la colágena. Cabe resaltar que si bien, no se llegó a una fibrosis, si hubo cambios en la composición de la matriz extracelular cuyo principal componente es la colágena. En el grupo HFD hubo una depleción de la colágena, un componente fundamental de MEC, lo cual produjo una distorsión de la arquitectura y de la consistencia del hígado, correlacionándose con el corte macroscópico. Al administrar café concomitantemente con HFD, se conservaron los niveles de colágeno. Sin embargo, el café es una mezcla de miles de compuestos, donde cualquiera de ellos son responsables de tener actividad farmacológica [McCusker y cols, 2003].

La medición de los niveles de colágena en tejido hepático no ha sido tan estudiada en esta patología. Es un hallazgo interesante. Chong y colaboradores reportaron en 2015 los niveles de RNAm de colágena tipo I en un modelo murino de EHGNA con una dieta deficiente de colina y encontraron que sus niveles están aumentados en el grupo de daño a las 4 semanas y a las 8 semanas, al compararlas con el grupo control. Por otro lado, Talavera-Urquijo y colaboradores (2017) compararon la expresión de Col1 en modelo experimental de EHGNA, encontrando que a las 10 semanas había una tendencia a estar disminuida con respecto al control, sin embargo, no hubo significancia estadística. Lo anterior nos puede indicar que el comportamiento de los niveles de colágena hepática es de aumentar en las primeras 8 semanas y a partir de la décima semana, estos ir en decremento, aunque se necesitan más estudios que impliquen la medición de los valores de colágena en la EHGNA para definir este punto.

Por otra parte, se observó que existe una disminución en los niveles de glucógeno hepático en el grupo HFD, indicándonos que el daño producido afectó la capacidad anabólica del hígado. El café evitó esta depleción al administrarlo junto con la dieta occidental, y lo hizo de manera significativa al compararlo con el grupo de daño. Este efecto se debe muy probablemente a los efectos anteriormente mencionados.

En este estudio, se utilizó el modelo de daño hepático inducido por el consumo crónico de una dieta rica en grasas junto con el consumo de bebida rica en fructosa, es decir, una dieta occidental. Este modelo induce la EHNA con cierto grado de inflamación sin llegar a EHNA asociada con la muerte de hepatocitos, daño colestásico y estrés oxidativo. Además, se caracteriza por la elevación de las enzimas hepáticas tales como ALT y γ -GTP [Hung, 2005; Natarajan y cols, 2006; Park y cols, 2010]. Dichos efectos que ocasiona el consumo de una dieta occidental fueron prevenidos por el consumo de café.

XIII. CONCLUSIONES

La patogénesis de EHNA es muy compleja debido a que ocurren muchos eventos de manera simultánea y aun no se dilucidan todas las vías por las cuales se da esa acumulación ectópica de lípidos en el parénquima hepático. Se sabe que estrés oxidativo resulta en daño hepático que puede producir inflamación y e incluso fibrogénesis. Con lo anterior, es entendible que no exista un tratamiento específico para el manejo de esta patología. Actualmente la primera línea de manejo es tratar las comorbilidades. En esto radica la importancia del estudio de las distintas vías moleculares para otorgar un enfoque de os distintos bancos terapéuticos posibles.

Los presentes resultados muestran claramente que el café tiene un papel hepatoprotector en el modelo de EHNA inducida por dieta rica en grasas y fructosa. Además, se proporcionan pruebas sobre su mecanismo de acción mediante la reducción de la citosina TGF- β que es clásicamente profibrogénica y también proinflamatoria. Por lo tanto, la reducción en los niveles de TGF- β puede estar vinculada a la atenuación de los procesos inflamatorios.

A su vez, se corroboró que el efecto antioxidante mediante el mantenimiento de los niveles de GSH y la neutralización del daño a membrana plasmática ocasionado por ROS, es benéfico para la salud en enfermedad hepática previniendo la progresión del daño.

Sin embargo, es difícil proporcionar una orientación clara en cuanto a la "dosis de café" necesario para obtener estos efectos benéficos ya que el método de preparación del café, por ejemplo, si es filtrada o hervida, y el tipo de granos de café puede cambiar considerablemente con el tiempo y variar geográficamente. Además de la equivalencia en cuanto a su consumo en tazas a nivel mundial también es muy variable.

XIV. RECURSOS FINANCIEROS E INFRAESTRUCTURA

Este proyecto se realizó en las instalaciones del laboratorio de farmacología y de biología celular de la Facultad de Medicina Mexicali, los cuales constan de: centrífuga de la marca Eppendorf, microscopio marca Wild, fotodocumentador, sonicador, potenciómetro, parrilla con calor y agitación, espectrofotómetro, balanza de dos platos, balanza analítica, horno de secado, homogeneizador, agitador de plataforma, agitador orbital doble plataforma, purificador de agua: equipo Milli-Q Advantage, sistema de electroforesis para proteínas, fuentes de poder para cámaras de proteínas; lector de microplacas; termociclador para PCR punto final, NanoDrop, baño seco digital, refrigerador, ultracongelador, congelador de -20°C. Además de una amplia variedad de anticuerpos para realizar WB.

El material y los consumibles que se ocuparon para la realización de este proyecto se adquirió a través del apoyo PRODEP Apoyo a la Incorporación de Nuevos Profesores de Tiempo Completo (UABC PTC 570).

XV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, A.A.P., Farah, A., Silva, D.A., Nunan, E.A., Gloria, B., 2006. "Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against enterobacteria". *J. Agric. Food Chem.* 2006:54, 8738-8743.
- Arauz, J., Galicia-Moreno, M., Cortés-Reynosa, P., Salazar, E.P., Muriel, P. "Coffee attenuates fibrosis by decreasing the expression of TGF- β and CTGF in a murine model of liver damage". *J. Appl. Toxicol.* 2013:33, 970-979.
- Arauz, J., Ramos-Tovar, E., Muriel, P. "Redox state and methods to evaluate oxidative stress in liver damage: from bench to bedside". *Annals Hepatol* 2016, 15(2): 160-173.
- Arauz, J., Zarco, N., Hernández-Aquino, E., Galicia-Moreno, M., Favari, L., Segovia, J., Et al. "Coffee consumption prevents fibrosis in a rat model that mimics secondary biliary cirrhosis in humans". *J Ame Acad Der* 2017: 40, 65–74.
- Barlanga, A., Guiu-Jurado, E., Porras, J. A., Auguet, T. "Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease" *Clinical and Experimental Gastroenterology* 2014:7: 221-239.
- Bernal-Reyes, R., Castro-Narro, G., Malé-Velázquez, R., Carmona-Sánchez, R., González-Huezoe, M.S., García-Juárez I. Et al. "Consenso mexicano de la enfermedad por hígado graso no alcohólico" *Revista de Gastroenterología de México* 2019;84(1):69---99
- Bøhn, K., Blomhoff, R., Paur, I. "Coffee and cancer risk, epidemiological evidence, and molecular mechanisms". *Mol. Nutr. Food Res.* 2014: 58, 915-930.
- Bond, T.J., 2012. "The origins of tea, coffee and cocoa as beverages". In: Crozier, A., Ashiara, H., Tomás-Barberán, F. (Eds.), "Teas, Cocoa and Coffee: Plant Secondary Metabolites and Health". Wiley-Blackwell, Oxford. 1-24.
- Boon-Bee, G.G., McCullough, J. "Natural History of nonalcoholic fatty liver disease" *Dig Dis Sci* 2016; Vol. 61(5): 1226-1233.
- Bravi, F., Bosetti, C., Tavani, A., Silvano, G., LaVecchia, C. "Coffee reduces risk for hepatocellular carcinoma: an updated metaanalysis" *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11:1413-1421.
- Brunt, E.M., Olynyk, J.K., Britton, R.S., Janney, C.G., Di Bisceglie, A.M., Bacon, B.R. "Histological evaluation of iron in liver biopsies: relationship to HFE mutations" *Am J Gastroenterol.* 2000 Jul;95(7):1788-93.
- Buzetti, E., Pinzani, M., Tsochatzis, E. A. "The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease" *Metabol* 2016; Vol. 65 (8): 1038-1048.
- Byrne C.D., Targher G. NAFLD: A multisystem disease. *J Hepatol.* 2015;62:S47---64, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2014.12.012>.

Catalano D., Martines G.F., Tonzuso A., Pirri C., Trovato F.M., Trovato G.M.. Protective role of coffee in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Dig Dis Sci* 2010; 55: 3200-3206 [PMID:20165979 DOI: 10.1007/s10620-010-1143-3]

Chalasani N., Younossi Z., Lavine J.E., et al. The diagnosis and management of nonalcoholic fatty liver disease: Practice guidance from the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*. 2018;67:328---57, <http://dx.doi.org/10.1002/hep.29367>.

Chong, L.W., Hsu, Y.C., Lee, T.F. et al. *BMC Gastroenterol* (2015) 15: 22. <https://doi.org/10.1186/s12876-015-0248-8>

Chu, Y.F., Chen, Y., Brown, P.H. "Bioactivities of crude caffeine: antioxidant activity, cyclooxygenase-2 inhibition, and enhanced glucose uptake". *Food Chem*. 2012: 131, 564-568.

Conolly, S., Kingbury, T.J. "Caffeine modulates CREB-dependent gene expression in developing cortical neurons". *Biochem Biophys Res Commun*. 2010; 397(2): 152–156.

Decker, K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells). *Eur J Biochem* 192: pp. 245–261, 1990.

Desmet V. Organizational Principles, in *The Liver: Biology and Pathobiology*, de Arias, I., Fausto, N., Boyer, J., Chisari, F., Shafritz, D. Tercera ed., Ed. Raven Press Ltd., Nueva York, 1994.

Evans, P., Halliwell, B. "Micronutrients: oxidant/antioxidant status" *Br J Nutr*. 2001 May;85 Suppl 2:S67-74.

Evans, T.R., Kaye, S.B. "Retinoids: present role and future potential" *Br J Cancer*. 1999 Apr;80(1-2):1-8.

Farah, A., 2012. Coffee constituents. In: Chu, Y.F. (Ed.), "Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention". Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 21-58.

Georgescu, E.F., Ionescu, R., Niculescu, M., Mogoanta, L., Vancica, L. "Angiotensin-receptor blockers as therapy for mild-to-moderated hypertension associated non-alcoholic steatohepatitis" *World J Gastroenterol* 2009; 15(8): 942-954.

Guturu, P., Duchini, A. "Etiopathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: role of obesity, insulin resistance and mechanisms of hepatotoxicity" Hindawi Publishing Corporation, *International Journal of Hepatology*, vol 2012, art ID 212865, 8 pag.

Golabi P, Locklear CT, Austin P, et al. Effectiveness of exercise in hepatic fat mobilization in non-alcoholic fatty liver disease: Systematic review. *World J Gastroenterol*. 2016;22:6318---27, <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v22.i27.6318>.

Graeter, T., Niedermayer, P.C., Mason, R.A., Oeztuerk, S., Haenle, M.M., Koenig, W., Boehm B.O., Kratzer W. Coffee consumption and NAFLD: a community based study on 1223 subjects. BMC Res Notes 2015; 8: 640 [PMID: 26530296 DOI: 10.1186/s13104-015-1645-3]

Heffner, J.E., Repine, J.E. "Pulmonary strategies of antioxidant defense" Am Rev Respir Dis. 1989 Aug;140(2):531-54.

Kawada, N., Tran-Thi, T., Klein, H., Decker, K. The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substance. Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus. Eur J Biochem 2013: pp. 815–823.

Kawasaki, S., Makkuchi, M., Ishizone, S., Matsunami, H. Terada, M., Kawarazaki, H. Liver regeneration in recipients and donors after transplantation. Lancet 339, 580: 1992.

Kwak, M.S., Kim, D. Non-alcoholic fatty liver disease and lifestyle modifications, focusing on physical activity. Korean J Intern Med. 2018;33:64---74, <http://dx.doi.org/10.3904/kjim.2017.343>.

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

Laurence, G., Wallman, K., Guelfi, K. "Effects of caffeine on time trial performance in sedentary men". J. Sports Sci. 2012: 30, 1235-1240.

Lautt, W.W. Hepatic Circulation: Physiology and Pathophysiology. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2009.

LeCluyse, E.L., Alexandre, E. Isolation and culture of primary hepatocytes from resected human liver tissue. Methods Mol Biol. 640: 57–82, 2010.

Liu, J., Shen, B., Shi, M., Cai, J. "Higher caffeinated coffee intake is associated with reduced malignant melanoma risk: a meta-analysis study". PLoS One. 2016: 11, 1-14.

Lozano, I., Van-Der-Werf, R., Bietoger, W., Seyfritz, E., Peronet, C., Pringet, M., et al. "High fructose and high-fat diet induced disorders in rats: impact on diabetes risk, hepatic and vascular complications". Nut Metabol 2016: 13:15 1-13.

Ludwig, I.A., Clifford, M.N., Lean, M.E., Ashihara, H., Crozier, A. "Coffee: biochemistry and potential impact on health". Food Funct. 2014: 5, 1695 – 1717.

Lu, S.C., Kuhlenkamp, J., Garcia-Ruiz, C., Kaplowitz, N. "Hormone-mediated down-regulation of hepatic glutathione synthesis in the rat. J Clin Invest. 1991 Jul; 88(1): 260–269.

Malhotra, N., Beaton, M. D., "Management of non-alcoholic fatty liver disease in 2015" World J Hepatol 2015 Dec 28;7(30):2962-2967.

Mellbye, F.B., Jeppesen, P.B., Hermansen, K., Gregersen, S. "Cafestol, a bioactive substance in coffee, stimulates insulin secretion and increases glucose uptake in muscle cells: studies in vitro". J. Nat. Prod. 2015: 78, 2447-2451.

Méndez-Sánchez, N., Chávez-Tapia, N. C., Uribe, M. "Obesidad y esteatohepatitis no alcohólica" Gac Méd Méx Vol. 140, Suplemento No. 2, 2004

Méndez-Sánchez, N., Gutiérrez-Grobe, Y., Chávez-Tapia, N. C., Kobashi-Margain, R. A., Uribe, M. "Hígado graso no alcohólico y esteatohepatitis no alcohólica: conceptos actuales". Revista de gastroenterología de México 2010; Supl.2(75):143-148.

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

Michalopoulos, GK., DeFrances, MC. Liver regeneration. Science 276: 60-66, 1997.

Molloy, J.W., Calcagno, C. J., Williams, C. D., Jones, F. J., Torres, D. M., Harrison, S. A. "Association of coffee and caffeine consumption with fatty liver disease, nonalcoholic steatohepatitis, and degree of hepatic fibrosis" Hepatol 2012, 55 (2): 429-436.

Muriel, P. Liver pathophysiology therapies and antioxidants. 1° ed. Elsevier, 2017. 14-29.

Nohl, H., Hegner, D. "Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo?" Eur J Biochem. 1978 Jan 16;82(2):563-7.

McKenney, J. "Niacin for dyslipidemia: considerations in product selection". American Journal of Health-System Pharmacy May 2003: 60 (10) 995-1005.

Mofrad, P., Contos, M.J., Haque, M., et al. Clinical and histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease associated with normal ALT values. Hepatology. 2003;37:1286---92, doi:10.1053/jhep.2003.50229.

Niren, N.M. "Pharmacologic doses of nicotinamide in the treatment of inflammatory skin conditions: a review". Cutis. 2006: 77, 11e16.

Ong, K.W., Hsu, A., Tan, B.K.H. "Anti-diabetic and anti-lipidemic effects of chlorogenic acid are mediated by AMPK activation". Biochem. Pharmacol. 2013;85, 1341-1351.

Peppin, G.J., Weiss, S.J. "Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils" Proc Natl Acad Sci USA 1986, 83:4322-4326.

Piccinino, F., Sagnelli, E., Pasquale, G., et al. Complications following percutaneous liver biopsy. A multicentre retrospective study on 68,276 biopsies. J Hepatol. 1986;2: 165---73.

Prediger, R.D.S. "Effects of caffeine in Parkinson's disease: from neuroprotection to the management of motor and non-motor symptoms". J. Alzheimer's Dis. 2010: 20, 205-220.

Reitman S, Frankel S. Transaminases. American journal of clinical pathology 1957;28:56.

Rouvière, H., Delmas, A. Anatomía humana descriptiva, topográfica y funcional 11° ed. Masson, México, D.F. 2005. 460-489

Heath, R.D., Brahmbhatt, M., Tahan, A.C., Ibdah, J.A. Tahan, V. Coffee: The magical bean for liver diseases World J Hepatol 2017 May 28; 9(15): 689-696 DOI: 10.4254/wjh.v9.i15.689

Sanyal, A.J., Naga-Chalasani, M. B., Kowdley, K. V., McCullough, A., Diehl, A. M., Bass, N. M. "Pioglitazone, vitamin E or placebo for nonalcoholic steatohepatitis" N Eng J Med 2010; 365: 1675-1685.

Shin, J.W., Wang, J.H., Kang, J.K., Son, C.G. "Experimental evidence for the protective effects of coffee against liver fibrosis in SD rats". J. Sci. Food Agric. 2010: 90, 450-455.

Schubert, M.M., Irwin, C., Seay, R.F., Clarke, H.E., Allegro, D. and Desbrow, B. "Caffeine, coffee, and appetite control: a review". Int J Food Sci Nutr. 2017. DOI: 10.1080/09637486.2017.1320537.

Seifter, S. et al. "The estimation of glycogen with the anthrone reagent" Arch Biochem. 1950.

Sies, H., Stahl, W. "Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants" Am J Clin Nutr. 1995 Dec;62(6 Suppl):1315S-1321S.

Stocker, R., Bowry, V.W., Frei, B. "Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does alpha-tocopherol" Proc Natl Acad Sci USA 1986, 88: 1646-1650.

Suk, K.T., Kim, D.J. Staging of liver fibrosis or cirrhosis: the role of venous pressure gradient measurement. World J Hepatol. 27; 7(3): 607-615, 2015.

Tagliazucchi, D., Verzelloni, E., Conte, A. "Effect of dietary melanoidins on lipid peroxidation during simulated gastric digestion: their possible role in the prevention of oxidative damage". J. Agric. Food Chem. 2010: 58, 2513-2519.

Talavera-Urquijo E., Morphofunctional Changes After Sleeve Gastrectomy and Very Low Calorie Diet in an Animal Model of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. Obes Surg. 2018 Jan;28(1):142-151. doi: 10.1007/s11695-017-2805-

Tan, E.K., Lu, Z.Y., Fook-Chong, S.M., Tan, E., Shen, H., Chua, E., et al. "Exploring an interaction of adenosine A2A receptor variability with coffee and tea intake in Parkinson's disease". Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 2006 Sep 5;141B(6):634-6.

Treyer, A., Müsch, A., 2013. Hepatocyte polarity. Compr. Physiol. 3, 243-287.

Urgert, R., Meyboom, S., Kuilman, M., Rexwinkel, H., Vissers, M.N., Klert, M. Comparison of the Effect of cafetiere and filtered coffee on Serum concentrations of liver Aminotransferases. British Medical Journal 1996;313:1396-1412

Weusten, V., Katan, M.B., Viani, R. Identification of the Cholesterol- Raising Factor from Boiled Coffee and its effect on liver function Enzymes. J Lipid Res 1994;35:143-56.

Xu, Z.J., Fan, J.G., Ding, X.D., Qiao, L., Wang, G.L. "Characterization of high-fat, diet induced, non-alcoholic steatohepatitis with fibrosis in rats". Dig Dis Sci. 2010: 55:931-940.

Zhang, H.J., He, J., Pan, L.L. Effects of moderate and vigorous exercise on nonalcoholic fatty liver disease: A randomized clinical trial. JAMA Intern Med. 2016;176:1074---82, <http://dx.doi.org/10.1001/jamainternmed.2016.3202>.

Zhang, H.J., Pan, L.L., Ma, Z.M. Long-term effect of exercise on improving fatty liver and cardiovascular risk factors in obese adults: A 1-year follow-up study. Diabetes Obes Metab. 2017;19:284---9, <http://dx.doi.org/10.1111/dom.12809>.