

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

CICESE © 2024. Todos los derechos reservados

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida**

**Efectos antilipogénico y antifibrótico de nanopartículas
híbridas polímero-lípido cargadas con extracto de café verde
en un modelo humano *in vitro* de esteatosis y fibrosis
hepáticas**

Tesis
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Marco Antonio Uriostegui Campos

Ensenada, Baja California, México
2024

Tesis defendida por
Marco Antonio Uriostegui Campos

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Ana Bertha Castro Ceseña
Directora de tesis

Dra. Carolina Álvarez Delgado

Dra. María del Carmen Maya Sánchez



Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Marco Antonio Uriostegui Campos** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Ciencia de la vida.

Efectos antilipogénico y antifibrótico de nanopartículas híbridas polímero-lípido cargadas con extracto de café verde en un modelo humano in vitro de esteatosis y fibrosis hepáticas

Resumen aprobado por:

Dra. Ana Bertha Castro Ceseña
Directora de tesis

La enfermedad hepática esteatótica asociada a disfunción metabólica (MASLD) afecta al 30% de la población mundial adulta, con alta prevalencia en América Latina, especialmente en México. Incluye un rango de patologías hepáticas desde la esteatosis hasta la cirrosis. La esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica (MASH), una forma avanzada, combina esteatosis y fibrosis, acelerando el daño hepático. Actualmente, los tratamientos se centran en cambios de estilo de vida, aunque el bajo apego al tratamiento y la falta de fármacos específicos plantean la necesidad de nuevas terapias. El extracto de café verde (ECV) ha mostrado propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, pero su baja biodisponibilidad limita su eficacia, destacando la necesidad de enfoques innovadores como la nanotecnología. La encapsulación de compuestos fitoquímicos con características fisicoquímicas similares a las del ECV en nanopartículas híbridas de polímero-lípido (NHPLs) han demostrado mejorar la biodisponibilidad y entrega efectiva, optimizando su efecto terapéutico. En este estudio, se sintetizaron NHPLs compuestas de ácido poli-láctico, co-glicólico (PLGA) y lecitina de soya (HSPC), las cuales fueron cargadas con extracto de café verde (ECV-NPLs). Las nanopartículas obtenidas presentaron un tamaño promedio de 145.4 ± 26 nm y una carga superficial negativa de -11 ± 0.95 mV. Además, se logró encapsular alrededor del 55% del extracto y liberarlo progresivamente en un periodo de 24 horas bajo condiciones *in vitro*. Las ECV-NPLs se probaron en un modelo *in vitro* de MASLD utilizando células HepG2 con lípidos acumulados y células estrelladas hepáticas activadas (HHSC-N) de un paciente con MASH. El ECV libre y encapsulado en nanopartículas reguló la expresión de genes clave en la esteatosis y fibrosis. En hepatocitos, se redujo PLIN1, asociado a la acumulación de lípidos sin afectar CPT1A involucrado en la β -oxidación de los ácidos grasos, mientras que las ECV-NPLs aumentaron TNF α que se correlacionó la reducción de PLIN1. En cuanto a la fibrosis, la combinación de ECV y NPLs redujo significativamente la expresión de COL1A1 y ACTA2, ambos involucrados en la fibrogénesis. Estos resultados sugieren que las ECV-NPLs podrían ser una formulación nanotecnológica prometedora con efectos antiesteatóticos y antifibróticos para el tratamiento de MASLD.

Palabras clave: MASLD, esteatosis, fibrosis, café verde, nanopartículas

Abstract of the thesis presented by **Marco Antonio Uriostegui Campos** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences

Antilipogenic and antifibrotic effects of polymer-lipid hybrid nanoparticles loaded with green coffee extract in an in vitro human model of hepatic steatosis and fibrosis

Abstract approved by:

Dra. Ana Bertha Castro Ceseña
Thesis Director

Metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD) affects 30% of the world adult population, with a high prevalence in Latin America, particularly in Mexico. It encompasses a spectrum of hepatic pathologies ranging from steatosis to cirrhosis. Metabolic dysfunction-associated steatohepatitis (MASH), an advanced form, combines steatosis and fibrosis, accelerating liver damage. Current treatments focus on lifestyle changes; however, poor adherence and the lack of specific drugs highlight the need for novel therapies. Green coffee extract (GCE) has shown antioxidant and anti-inflammatory properties, but its low bioavailability limits its therapeutic potential, emphasizing the need for innovative approaches like nanotechnology. Encapsulating phytochemicals with similar physicochemical properties to GCE in hybrid polymer-lipid nanoparticles (NHPLs) has been shown to improve bioavailability and effective delivery, optimizing therapeutic effects. In this study, NHPLs composed of poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA) and soy lecithin (HSPC) were synthesized and loaded with GCE (GCE-NPLs). The resulting nanoparticles exhibited an average size of 145.4 ± 26 nm and a negative surface charge of -11 ± 0.95 mV. Approximately 55% of the extract was successfully encapsulated and gradually released over 24 hours under *in vitro* conditions. GCE-NPLs were tested in an in vitro MASLD model using lipid-loaded HepG2 cells and activated hepatic stellate cells (HHSC-N) from a MASH patient. Both free and nanoparticle-encapsulated GCE regulated key gene expression related to steatosis and fibrosis. In hepatocytes, PLIN1, associated with lipid accumulation, was reduced without affecting CPT1A, involved in fatty acid β -oxidation. GCE-NPLs also increased TNF α , which correlated with PLIN1 reduction. Regarding fibrosis, the combination of GCE and NPLs significantly reduced the expression of COL1A1 and ACTA2, both involved in fibrogenesis. These findings suggest that GCE-NPLs could be a promising nanotechnological formulation with anti-steatotic and anti-fibrotic effects for MASLD treatment.

Keywords: MASLD, steatosis, fibrosis, green coffee, nanoparticles

Dedicatoria

A mis padres y hermana, María del Rocío, Marco Antonio y Salma Lucía.

A Ximena, Ricardo, Yaroslav y Erasmo, gracias por salvarme.

Al colectivo que me cobijó desde el día en que nací y me abrazará hasta el día que me tenga que morir.

Al pueblo palestino, que hoy por hoy sufre de manera injusta un genocidio producto del imperialismo.

A todas y todos los pobres del mundo, que padecen las desigualdades estructurales y resisten por la vida.

Con mucho amor a mis amigos Giselle, Hugo, Cecilia.

A Bandida, Alvin y Heidi.

Agradecimientos

Agradezco al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el financiamiento que me permitió concluir exitosamente mi grado de maestría. Asimismo, agradezco a al proyecto CF-2023-I-2458 “Implementación de un modelo 3D de esferoides para la evaluación de potenciales fármacos para la enfermedad por el hígado graso no alcohólico” y al proyecto interno CICESE-685112 por soportar los insumos para esta investigación.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) por ser mi casa de estudios durante este periodo y otorgarme el espacio adecuado para desarrollar las actividades de investigación pertinentes.

A mi directora de tesis, la Dra. Ana Bertha Castro Ceseña, que me permitió aprender y colaborar en nuestro equipo de trabajo; además de procurar y mantener las condiciones aptas para el cumplimiento de los objetivos de este proyecto. Sin usted, el barco no podría zarpar ni llegar a su destino.

A la Dra. Carolina Álvarez y la Dra. Carmen Maya por conformar el comité de tesis que me proporcionó revisiones y retroalimentación constructiva, sin duda un acompañamiento fundamental.

A la Dra. Karla Cervantes, por sus valiosas enseñanzas en el ámbito de la biología molecular, es un privilegio colaborar con usted.

A la Dra. Norma Cortez y el Dr. Félix Augusto por permitirme hacer uso de sus laboratorios para caracterizar las nanopartículas y obtener el extracto de café verde.

A mis padres y mi hermana, que con esfuerzo y amor me han apoyado de lo moral a lo económico. Son mi núcleo y mi amor eterno.

A la M. en C. Tonantzin Zertuche, Ing. Ximena Cesati, Ing. Ricardo Colín, M. en C. Gabriela Carballo e Ing. Horacio Silvestre por su apoyo en el laboratorio. Formaron parte esencial de este tejido académico que se construye de abajo hacia arriba.

A Giselle, Dan, Ceci, Hugo, Mercedes, Atsumi, Darién, Miryam, Alex, Karla, Paulette, Erasmo, Gabi, Keily, Jhair, Alejandro, Yaroslav, Tirso y Marco Vinicio por compartir conmigo un cachito de su vida conmigo y abrir sus espacios para la convivencia colectiva. Siempre los llevaré conmigo.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	ix
Lista de tablas	xi
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	3
1.1.1 Enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica	3
1.1.1.1 Panorama actual	3
1.1.1.2 Definición, patogénesis y tratamiento	4
1.1.1.3 Esteatosis y fibrosis hepáticas como ejes principales en el tratamiento de las MASLD	8
1.1.2 Café e hígado.....	10
1.1.2.1 El café como fuente de compuestos bioactivos para tratar la MASLD	10
1.1.2.2 Café verde y su potencial terapéutico en la MASH.....	12
1.1.3 Nanotecnología para mejorar la entrega de compuestos fitoquímicos del café verde.....	15
1.1.3.1 Nanoencapsulación de compuestos bioactivos del café.....	15
1.1.3.2 Nanopartículas híbridas de polímero-lípido.....	16
1.1.3.3 Nanopartículas híbridas de PLGA y lecitina.....	19
1.2 Justificación	21
1.3 Hipótesis.....	22
1.4 Objetivos	22
Objetivo general.....	22
Objetivos específicos.....	22

Capítulo 2.	Metodología	23
2.1	Extracción de compuestos fitoquímicos de café verde.....	23
2.2	Caracterización del extracto de café verde.....	24
2.2.1	Determinación del contenido fenólico total	24
2.2.2	Evaluación de la actividad antioxidante relacionada a la remoción de radicales libres	25
2.3	Síntesis de nanopartículas híbridas polímero-lípido	25
2.4	Caracterización de NPLs y ECV-NPLs	27
2.4.1	Diámetro hidrodinámico y potencial Zeta	27
2.4.2	Morfología y tamaño.....	27
2.4.3	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier	27
2.4.4	Eficiencia de encapsulación.....	28
2.4.5	Ensayo de liberación del ECV de las NPLs	28
2.5	Cultivo celular.....	30
2.5.1	Cultivo de fibroblastos de ratón (L929) y humanos (CCD-112Sk)	30
2.5.2	Cultivo de células hepáticas humanas (HepG2 y HHSC-N).....	30
2.6	Estudios de viabilidad celular	31
2.6.1	Ensayos de viabilidad celular en L929 y CCD-1112Sk.....	31
2.6.2	Ensayos de viabilidad celular en HepG2 y HHSC-N	32
2.7	Inducción de esteatosis en HepG2.....	32
2.7.1	Conjugación de ácidos grasos libres.....	32
2.7.2	Cultivo de HepG2 con ácidos grasos libres	33
2.8	Análisis de expresión de genes mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa	33
2.9	Análisis estadístico	35
Capítulo 3.	Resultados y discusión	36
3.1	Caracterización del extracto de café verde.....	36
3.1.1	Contenido fenólico total y actividad antioxidante del ECV.....	36

3.2	Síntesis y caracterización de nanopartículas híbridas polímero-lípido	36
3.2.1	Tamaño promedio, morfología y potencial Zeta.....	36
3.2.2	Grupos funcionales de las nanopartículas	39
3.2.3	Eficiencia de encapsulación y perfil de liberación.....	40
3.3	Estudios de viabilidad celular en L929 y CCD-1112Sk	41
3.4	Modelo <i>in vitro</i> de esteatosis y fibrosis hepáticas	42
3.4.1	Establecimiento de las condiciones de esteatosis en HepG2	42
3.4.2	Concentración, pureza e integridad del ARN extraído de las HHSC-N y HepG2	44
3.4.3	Efecto de las ECV-NPLs en la viabilidad celular de HepG2 y HHSC-N.....	45
3.4.4	Efecto de las ECV-NPLs sobre la expresión de genes esteatósicos en HepG2	47
3.4.5	Efecto de las ECV-NPLs sobre la expresión de genes profibróticos en HHSC-N.....	50
Capítulo 4.	Conclusiones.....	52
	Literatura citada	54
	Anexos	66

Lista de figuras

Figura 1. Resumen gráfico del proyecto.....	3
Figura 2. Tasas de prevalencia global de la MASLD en la población adulta.....	4
Figura 3. Espectro de condiciones y tratamiento de la MASLD	5
Figura 4. Lesión hepática en MASLD producida por la sobrecarga de ácidos grasos.	7
Figura 5. Activación de las HSCs desencadenada por los procesos esteatósicos en los hepatocitos durante la MASH	9
Figura 6. Algunos mecanismos de la cafeína y los ácidos clorogénicos del café sobre la MASLD	11
Figura 7. Efecto de la suplementación con extracto de café verde en pacientes obesos con MASLD... ..	14
Figura 8. Sistemas de nanoencapsulación de compuestos bioactivos más comunes	15
Figura 9. Estructura típica de una nanopartícula híbrida de polímero-lípido	17
Figura 10. Método de un solo paso para la obtención de NHPLs	18
Figura 11. Tipos de nanopartículas híbridas de PLGA y lípidos	20
Figura 12. Procesamiento de los granos de <i>C. canephora</i> para la obtención del extracto.....	24
Figura 13. Metodología de la síntesis de nanopartículas híbridas polímero-lípido cargadas con extracto de café verde mediante nanoprecipitación combinada con autoensamblaje.....	26
Figura 14. Ensayo de liberación de las ECV-NPLs por diálisis.....	29
Figura 15. Potencial Zeta, diseño propuesto y morfología de las ECV-NPLs y NPLs	38
Figura 16. Espectros FTIR de las formulaciones de nanopartículas y los materiales utilizados en la síntesis.....	39
Figura 17. Liberación acumulada del ECV de las NPLs	40
Figura 18. Viabilidad celular de fibroblastos L929 y fibroblastos CCD-1112Sk tratados con diferentes concentraciones de ECV por 24 h	42
Figura 19. Viabilidad celular de las células HepG2 después de la incubación con la mezcla de AO:AP.. ..	43
Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 2% (m/v) del ARN extraído de las células Hep-G2 y HHSC-N posterior a 24 y 48 h de tratamientos respectivamente	44
Figura 21. Viabilidad celular de las células HepG2 tratadas durante 24 h.....	45

Figura 22. Cultivo y viabilidad celular de HHSC-N tratadas durante 48 h.....	46
Figura 23. Expresión de genes asociados a esteatosis en HepG2 a las 24 h de tratamiento con ECV, ECV-NPLs y NPLs	48
Figura 24. Expresión de TNF α en HepG2 a las 24 h de tratamiento con ECV, ECV-NPLs y NPLs	49
Figura 25. Expresión de genes profibróticos en HHSC-N a las 48 h de tratamiento con ECV, ECV-NPLs y NPLs.....	51
Figura 26. Curva de calibración de ácido gálico	66
Figura 27. Curva de calibración de ácido cítrico.....	66
Figura 28. A) Espectro UV-vis del ECV. B) Curva de calibración de ECV en disuelto en PBS 1X (pH 7.4).	67

Lista de tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos de los genes evaluados en HepG2 y HHSC-N.	34
Tabla 2. Diámetro hidrodinámico e índice de polidispersidad (PDI) de las nanopartículas cargadas con extracto de café verde y vacías, ambas suspendidas en PBS 1X (pH 7.4).	37
Tabla 3. Concentración y pureza del ARN extraído de HHSC-N y HepG2 a las 48 h de tratamientos ..	44

Capítulo 1. Introducción

La enfermedad hepática esteatótica asociada a disfunción metabólica (MASLD, anteriormente conocida como NAFLD), afecta globalmente al 30% de la población adulta y latinoamérica es una de las regiones con mayor prevalencia. Particularmente en México, se ha estimado en aproximadamente 30%, aunque realmente un 50% de la población adulta posee uno o más factores de riesgo para desarrollar MASLD.

La MASLD es un espectro de condiciones hepáticas que ocurren en presencia de al menos un factor de riesgo cardiometabólico y en ausencia de consumo excesivo de alcohol (≥ 20 -30 g/día) o de otras enfermedades hepáticas crónicas. Los estadios de la MASLD varían en su grado de severidad, y van desde la esteatosis simple hasta la cirrosis y el carcinoma hepatocelular (HCC). La MASLD se caracteriza por la incapacidad del hígado para gestionar eficazmente el metabolismo de carbohidratos y ácidos grasos. Esto provoca una acumulación excesiva de lípidos en los hepatocitos, lo que desencadena un ambiente de estrés oxidativo e inflamatorio. Dicho estrés induce daño y muerte celular, promoviendo procesos de fibrogénesis. A largo plazo, estas alteraciones generan inestabilidad genómica, lo que agrava la progresión de la enfermedad, aumentando la severidad de la disfunción hepática y sus complicaciones. La patogénesis de las MASLD es compleja y heterogénea, ya que se presenta a través de diferentes mecanismos fisiopatológicos con un alta heterogeneidad entre individuos.

El tratamiento de la MASLD se centra en la modificación del estilo de vida a través de dieta y ejercicio, que son efectivos para reducir la acumulación de grasa en el hígado. Sin embargo, la baja adherencia a estos cambios a largo plazo plantea un desafío, lo que resalta la importancia de la intervención farmacológica. Actualmente, solo hay un medicamento aprobado específicamente para MASLD (Resmetirom), y muchos de los tratamientos alternativos están asociados con efectos secundarios significativos. Esto subraya la necesidad de desarrollar nuevos enfoques terapéuticos que aborden las múltiples alteraciones fisiopatológicas presentes en la enfermedad, con el objetivo de lograr un tratamiento más completo y eficaz.

La esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica (MASH) representa un estado avanzado dentro de la MASLD, caracterizado por inflamación y daño celular, donde se activa la fibrogénesis, un proceso que puede conducir a la cirrosis irreversible. La fibrosis hepática ocurre por la acumulación excesiva de colágeno, producido principalmente por las células estrelladas hepáticas activadas (aHSCs). La combinación de esteatosis y fibrosis acelera el deterioro hepático, empeorando la enfermedad. Por ello,

las estrategias terapéuticas efectivas para MASH deben abordar tanto la reducción de la acumulación de lípidos como la inhibición de los mecanismos que promueven la fibrosis, para mitigar la inflamación y preservar la estructura hepática.

El desarrollo de nuevas terapias para MASLD a partir de productos naturales representa una vía prometedora, y en este sentido, el café, una de las bebidas más consumidas mundialmente, ha captado interés debido a sus posibles beneficios para la salud hepática. Por ejemplo, se ha demostrado que los diversos compuestos bioactivos pueden reducir la esteatosis y prevenir la fibrosis en la MASH. De hecho, la Asociación Americana para el Estudio de las Enfermedades Hepáticas (AASLD) ha recomendado su consumo regular para la prevención de enfermedades como la MASLD. El extracto de café verde, proveniente de granos no tostados, destaca por su alta concentración de compuestos bioactivos, como polifenoles y cafeína, que han mostrado efectos antioxidantes, antiinflamatorios y reductores de lípidos, beneficiosos para el tratamiento de MASLD/MASH. No obstante, su aplicación biomédica enfrenta desafíos importantes debido a la limitada comprensión de sus mecanismos de acción en los procesos patológicos de la enfermedad y a su baja biodisponibilidad y acumulación en el tejido hepático, lo que restringe su eficacia en tratamientos a largo plazo.

En ese contexto, la nanotecnología ofrece una solución prometedora para superar las limitaciones asociadas con la biodisponibilidad y efectividad de las sustancias bioactivas, a través de la nanoencapsulación en nanopartículas híbridas de polímero-lípido (NHPLs). Estas NHPLs combinan las ventajas de las nanopartículas poliméricas con las de los sistemas vesiculares lipídicos, mejorando características clave como la farmacocinética, biodisponibilidad y la entrega específica a tejidos. Dentro de este enfoque, el copolímero ácido poli-láctico, co-glicólico (PLGA) y la lecitina han sido ampliamente utilizados como componentes en los sistemas de entrega de fármacos (SDEFs) debido a su estabilidad estructural, alta eficiencia de encapsulación, biocompatibilidad y capacidad para proporcionar una liberación controlada del fármaco, optimizando así su eficacia terapéutica.

Por ello, en este trabajo, se encapsuló extracto de café verde (ECV) en NHPLs, específicamente compuestas de PLGA y lecitina de soya (HSPC), para evaluar su potencial terapéutico en la MASLD/MASH. Se probó el efecto de estas NHPLs cargadas con ECV (ECV-NPLs) en un modelo *in vitro* de fibrosis y esteatosis hepáticas utilizando una línea tumoral hepática humana (HepG2), a la que se le indujo esteatosis y células estrelladas hepáticas activadas (HHSC-N) provenientes de un donador con MASH. Los resultados se centraron en la cuantificación de la expresión de genes relacionados con la esteatosis y fibrosis tras el tratamiento con

ECV-NPLs, proporcionando información importante sobre el posible efecto terapéutico del ECV en estas patologías, así como los beneficios adicionales de su encapsulación en nanopartículas.

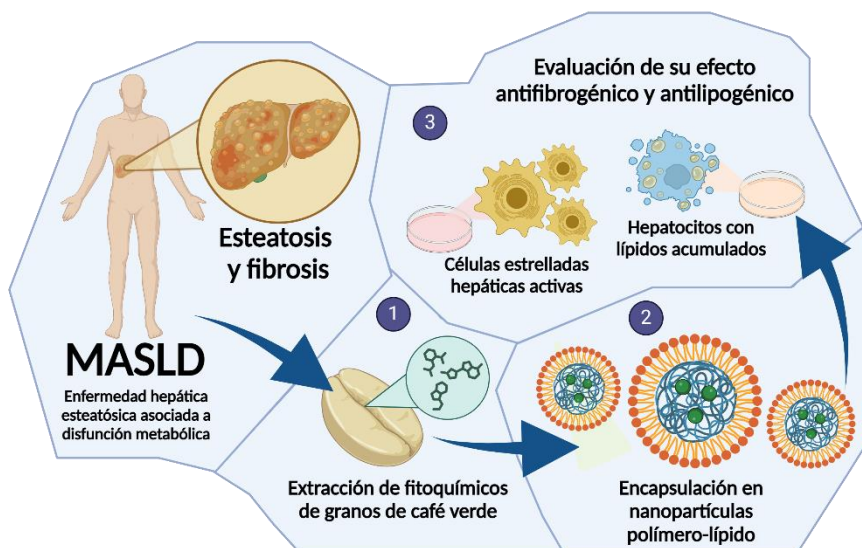


Figura 1. Resumen gráfico del proyecto. (1) Se obtuvo un extracto de café verde de la especie *Coffea canephora* y (2) se encapsuló en NHPLs compuestas de PLGA y lecitina, caracterizándose sus propiedades fisicoquímicas clave. (3) Las NHPLs cargadas con el extracto fueron empleadas para tratar hepatocitos con esteatosis y HSCs activadas, con el objetivo de evaluar su impacto en la expresión de genes asociados con la esteatosis y la fibrosis. NHPLs: Nanopartículas híbridas polímero-lípido. HSCs: Células estrelladas hepáticas. Elaboración propia.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica

1.1.1.1 Panorama actual

Durante la década de los 80, un equipo de investigadores en Estados Unidos describió varios casos de pacientes obesos, en su mayoría con diabetes mellitus, que presentaban un tipo de hepatitis similar a la alcohólica, capaz de evolucionar a cirrosis sin un consumo significativo de alcohol. A esta condición se le dio el nombre de "esteatohepatitis no alcohólica". En 2007, se introdujo el término "enfermedad de hígado graso no alcohólico" (NAFLD, por sus siglas en inglés), que se utilizó para diagnosticar casos basados en hallazgos de ecografía y la exclusión de un consumo significativo de alcohol o fármacos que causaran esteatosis hepática. Este término se mantuvo vigente por más de una década, hasta que en 2023 se publicó

una declaración de consenso Delphi multisociedades, que introdujo la nueva denominación "enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica" (MASLD, por sus siglas en inglés), reemplazando el término NAFLD (Chan et al., 2023; Rinella et al., 2023).

Hoy en día, se estima que la MASLD afecta alrededor del 30% de la población adulta a nivel global. Entre 1990 y 2019, su prevalencia aumentó del 17.6% al 23.4%, con un incremento promedio anual de aproximadamente 1%. En cuanto a su distribución, Latinoamérica ocupa el primer lugar, con el 44.4% de los casos, seguida por Oriente Medio y África del Norte, que registran un 36.5% en conjunto (Figura 2) (Miao et al., 2024). Hasta 2019, la prevalencia de MASLD en México se registró en 30.9% (Bernal-Reyes et al., 2019). Sin embargo, en 2023, un estudio realizado con 585 voluntarios reveló una prevalencia del 41.3%, con el 40% de los participantes en etapas avanzadas de fibrosis. Esto sitúa a México como uno de los países latinoamericanos con mayor prevalencia de MASLD, con cerca del 50% de la población presentando uno o más factores de riesgo para desarrollar la enfermedad. (Hernández-Conde & Calleja, 2023).

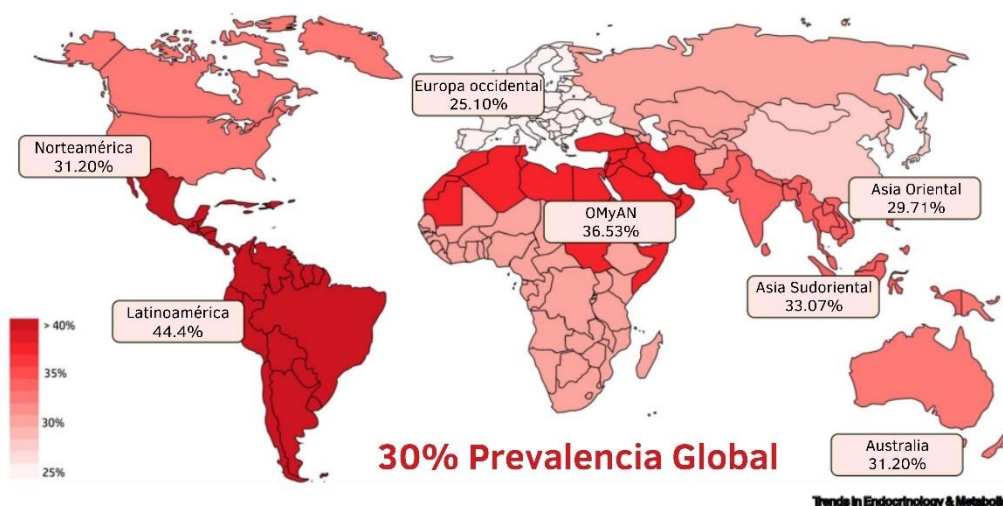


Figura 2. Tasas de prevalencia global de la MASLD en la población adulta. MASLD: Enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica. OMyAN: Oriente Medio y África del Norte. Modificado de Miao et al., 2024.

1.1.1.2 Definición, patogénesis y tratamiento

La MASLD es la manifestación hepática de un grupo de enfermedades relacionadas con la disfunción metabólica. Se caracteriza por presencia de un almacenamiento excesivo de triglicéridos (TGs) en el hígado

(esteatosis) en presencia de al menos un factor de riesgo cardiometabólico como la obesidad y la diabetes tipo 2, y ocurre en ausencia de consumo excesivo de alcohol (≥ 30 g/día en hombres y ≥ 20 g/día en mujeres) o de otras enfermedades hepáticas crónicas. Histológicamente, la MASLD abarca un espectro de enfermedades que incluye la esteatosis con o sin inflamación (hígado esteatósico asociado a disfunción metabólica, MASL) seguido de una forma severa conocida como MASH (esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica) caracterizada por lesión hepatocelular (balonización de hepatocitos) y un inicio o riesgo de fibrosis hepática. La progresión de la MASH puede llevar a la cirrosis, que, dependiendo de su gravedad, puede ser reversible o no, y eventualmente al carcinoma hepatocelular (HCC, por sus siglas en inglés). En esta etapa avanzada, el trasplante de hígado es la única opción viable antes de la disfunción total del órgano y la muerte del paciente. La hipertensión, hiperlipidemia y obesidad son factores de riesgo clave para MASLD, con una prevalencia del 70% en pacientes con hiperlipidemia, 51% en personas obesas y 50% en hipertensas. Además, la diabetes tipo 2 (DT2) y estos trastornos están vinculados a la enfermedad cardiovascular, la principal causa de muerte en pacientes con MASLD (Figura 3). La prevalencia de MASLD y la fibrosis aumenta con la edad, y las predisposiciones genéticas también influyen en su desarrollo, explicando variaciones étnicas y geográficas (Powell et al., 2021; Tacke et al., 2024).

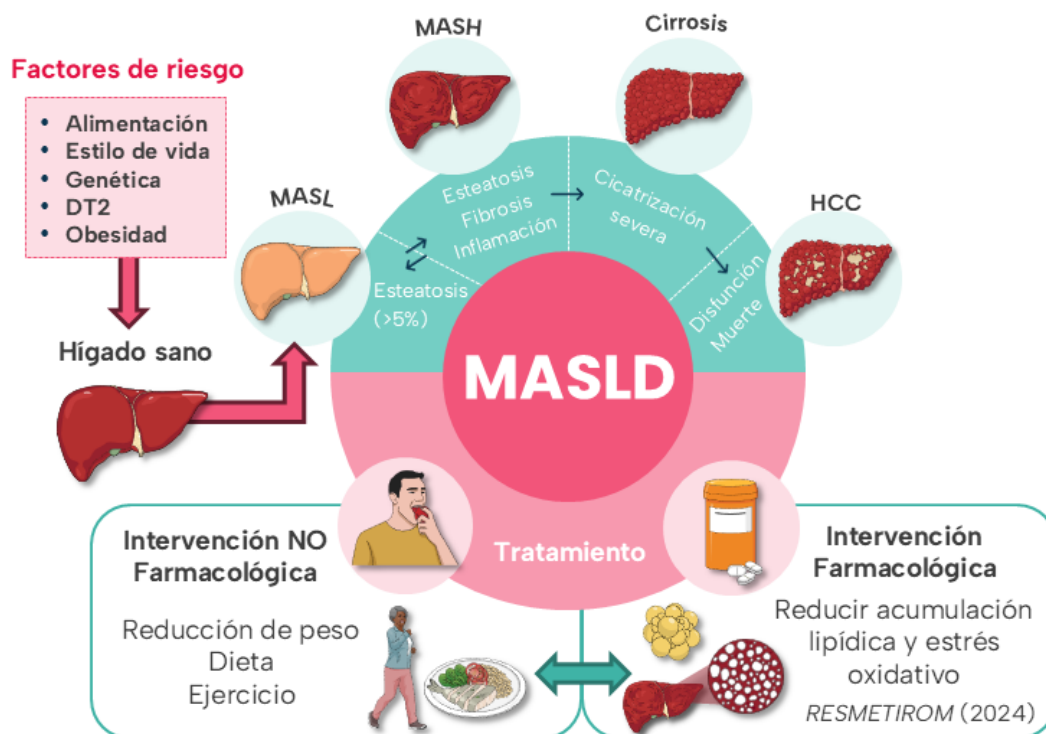


Figura 3. Espectro de condiciones y tratamiento de la MASLD. MASLD: Enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica. DT2: Diabetes tipo 2. MASL: Hígado esteatósico asociado a disfunción metabólica. MASH: Esteatohepatitis asociada a disfunción metabólica. HCC: Carcinoma hepatocelular. Elaboración propia.

Anteriormente se creía que la MASLD iniciaba con un exceso de grasa en el hígado que luego evolucionaba hacia un estado necroinflamatorio, lo que llevó a la teoría de "los dos golpes". Esta teoría sugería que el primer golpe era el depósito de grasa hepática, seguido por segundos impactos como el estrés oxidativo y las citocinas proinflamatorias, que desencadenaban el desarrollo de MASH y la fibrogénesis. Sin embargo, hoy se sabe que la patogénesis de la MASLD es mucho más compleja y heterogénea, involucrando múltiples vías moleculares, y no es claro si el MASL siempre precede a la MASH. Además, los mecanismos y manifestaciones clínicas varían entre los pacientes. De cualquier manera, es esencial comprender las fuentes y destinos de los ácidos grasos (AGs) en los hepatocitos para dilucidar las bases metabólicas de la MASLD (Figura 4) (Friedman et al., 2018; Golabi et al., 2024).

La principal fuente de AGs en el hígado proviene de la lipólisis de TGs en el tejido adiposo, un proceso regulado por la insulina. En pacientes con resistencia a la insulina, esta regulación se ve alterada, lo que resulta en un exceso de AGs en los hepatocitos. Otra fuente significativa es la lipogénesis *de novo* (LDN), donde los AGs se sintetizan a partir de glucosa o fructosa, lo que puede sobrecargar los hepatocitos, provocando estrés celular. En los hepatocitos, los AGs se convierten en TGs por esterificación o se metabolizan por beta-oxidación (β -oxidación) mitocondrial. Cuando el exceso de ácidos grasos supera la capacidad de β -oxidación, los hepatocitos eliminan el sobrante en forma de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés) y el exceso que permanece se almacena como gotas lipídicas. La lipólisis de estas gotas genera especies lipotóxicas, lo que causa daño hepático a través de estrés del retículo endoplasmático (RE), activación de la apoptosis e inflamación, modulados por citocinas. Este daño lipotóxico produce una liberación de citocinas y quimiocinas de los hepatocitos, activando células inmunitarias como macrófagos, células dendríticas, linfocitos y neutrófilos, lo que desencadena una respuesta inflamatoria. Los hepatocitos dañados también liberan vesículas que contienen moléculas señalizadoras que, en conjunto con las células inmunes, podrían activar las células estrelladas hepáticas (HSCs), promoviendo la fibrosis hepática a través del aumento en la expresión de α -actina de músculo liso (α -SMA), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y colágeno tipo I. En general, los factores patogénicos de la MASLD y MASH se deben a la incapacidad del hígado para gestionar adecuadamente carbohidratos y ácidos grasos, lo que genera especies lipídicas tóxicas que causan daño y muerte celular. Esto promueve la fibrogénesis y la inestabilidad genómica, favoreciendo la progresión hacia cirrosis y HCC. La identificación de las vías relacionadas con la lipotoxicidad y el estrés celular ha facilitado el desarrollo de objetivos terapéuticos (Lee et al., 2023; Zhu et al., 2023).

La estrategia terapéutica actual para la MASLD combina intervenciones no farmacológicas y farmacológicas, que suelen aplicarse de manera complementaria para optimizar los resultados en el

manejo de la enfermedad (Figura 3). La primera se basa en cambios en el estilo de vida, con un enfoque especial en la dieta y el ejercicio. Diversos estudios muestran que la dieta mediterránea reduce el riesgo de MASLD en un 23% frente a la dieta occidental, mejorando la función metabólica hepática al controlar la ingesta de ácidos grasos y carbohidratos. El ejercicio regular también puede mejorar el metabolismo glucolípido y ser beneficioso contra la MASLD, sin embargo, no existe un consenso claro sobre las modalidades de ejercicio más efectivas para los pacientes. Aunque las medidas higiénico-dietéticas continúan siendo la intervención no farmacológica de primera elección para el tratamiento de la MASLD, su eficacia a largo plazo es limitada debido al bajo cumplimiento de los pacientes con las restricciones y cambios en su estilo de vida (Y. Li et al., 2024; Moctezuma-Velázquez, 2018).

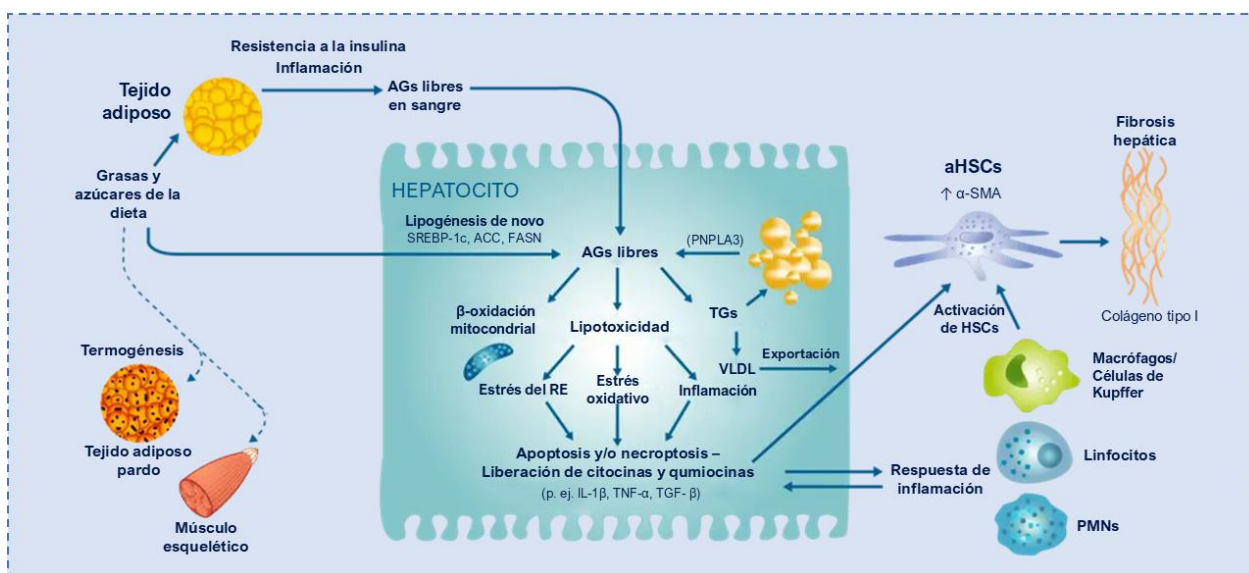


Figura 4. Lesión hepática en MASLD producida por la sobrecarga de ácidos grasos. AGs: Ácidos grasos. SREBP-1c: Proteína de unión al receptor de esteroides 1c. ACC: Acetil CoA carboxilasa. FASN: Sintasa de ácidos grasos. IL-1 β : Interleucina 1-beta. TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa. TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta. PMN: Granulocito. HSCs: Células estrelladas hepáticas. α -SMA: Alfa actina de músculo liso. aHSCs: Células estrelladas hepáticas activas. Modificado de (PanNASH, 2019).

En ese contexto, la intervención farmacológica es esencial para el tratamiento de la MASLD enfocándose principalmente en MASH debido a su mayor riesgo de progresión a eventos hepáticos graves. Por esta razón, MASH se ha convertido en el principal criterio de inclusión en los ensayos clínicos de fase 3. En cuanto al desarrollo de fármacos, la FDA exige, para la aprobación condicional, que se cumpla al menos uno de los siguientes criterios histológicos: (a) resolución de la MASH (con puntuaciones de inflamación de 0 a 1 y balonización de 0) sin empeorar la fibrosis, o (b) mejora de la fibrosis sin agravar la MASH. Por su parte, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, por sus siglas en inglés) requiere demostrar tanto la

resolución de la MASH como la mejora de la fibrosis. Este enfoque permite acelerar la aprobación condicional de medicamentos mientras se completan estudios de resultados clínicos (Ciardullo et al., 2024). Hasta marzo de 2024, no existían fármacos aprobados por la FDA específicamente para el tratamiento de MASH. En la práctica clínica, se han empleado medicamentos antidiabéticos y antiobesidad, como la pioglitazona, los agonistas de GLP-1, la metformina y la vitamina E. Sin embargo, estos tratamientos no son lo suficientemente potentes para lograr la resolución de MASH o reducir significativamente la fibrosis. A pesar de ello, podrían ofrecer un modesto beneficio a largo plazo al ralentizar la progresión de la enfermedad hepática. No obstante, estos fármacos presentan efectos secundarios gastrointestinales, cardíacos y óseos, lo que supone un riesgo adicional para personas predispuestas (J. Zeng et al., 2024). El resmetirom es un agonista oral del receptor- β de la hormona tiroidea (THR- β) que ha sido aprobado recientemente para su uso en pacientes con MASH que no presentan cirrosis, pero que tienen fibrosis hepática avanzada. Los ensayos clínicos han mostrado que mejora parámetros clave como los niveles de lípidos y marcadores de daño hepático, todo sin efectos secundarios significativos, debido a su selectividad por el THR- β que se expresa principalmente en el hígado (Keam, 2024). La investigación futura debe enfocarse en desarrollar fármacos que, en combinación con modificaciones en el estilo de vida, logren mejoras significativas incluso en fases avanzadas de la MASH. Estos tratamientos deberían centrarse en abordar las condiciones fisiopatológicas que coexisten en esta etapa de la MASLD, buscando un impacto terapéutico más integral y eficaz.

1.1.1.3 Esteatosis y fibrosis hepáticas como ejes principales en el tratamiento de las MASLD

La esteatosis hepática simple generalmente es asintomática y no presenta complicaciones, pero si no se trata, puede progresar a MASH. Si la MASH no se controla, puede avanzar hacia fibrosis, lo que incrementa el riesgo de cirrosis y HCC. Tanto la esteatosis como la fibrosis son factores clave en la resolución de la MASH. Aunque la esteatosis suele preceder a la fibrosis, ambas pueden coexistir en la MASH, y la esteatosis puede agravar la progresión de la fibrosis.

La acumulación de lípidos en el hígado ocurre predominantemente en los hepatocitos, que constituyen aproximadamente el 80% de las células hepáticas. Los principales mecanismos involucrados en la esteatosis hepática son: (a) la captación de AGs, mediada por proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATP), el clúster de diferenciación 36 (CD36) y las caveolinas presentes en la membrana plasmática de los hepatocitos; (b) la LDN, donde la síntesis de AGs aumenta a partir de acetil-CoA, catalizada por enzimas como la sintasa de ácidos grasos (FASN); y (c) la disminución en la oxidación de AGs en la mitocondria,

asociada a la reducción de la actividad de la carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT1), lo que favorece la acumulación de triglicéridos TGs (Ipsen et al., 2018). La acumulación de TGs en forma de gotas lipídicas (LDs) en los hepatocitos, conduce al aumento de la expresión de proteínas de la familia de perilipinas (PLINs) particularmente PLIN1 y PLIN2, que son proteínas de asociación a LDs (Carr et al., 2017).

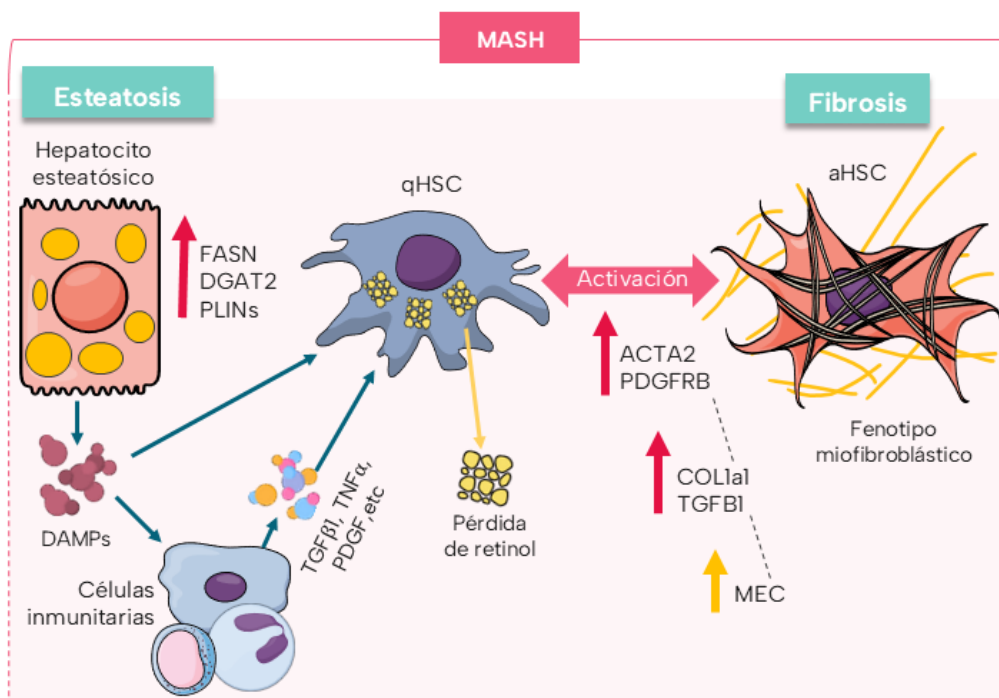


Figura 5. Activación de las HSCs desencadenada por los procesos esteatósicos en los hepatocitos durante la MASH. DAMPs: Patrones moleculares asociados al daño. FASN: Sintasa de ácidos grasos. DGAT2: Diacilglicerol O-aciltransferasa 2. PLINs: Perilipinas. TGFβ1: Factor de crecimiento transformante beta 1. TNFα: Factor de necrosis tumoral alfa. PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas. qHSC: Células estrellada hepática inactiva. ACTA2: Alfa actina de músculo liso. PDGFRB: Receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas. aHSC: Célula estrellada hepática activa. COL1a1: Colágeno de tipo I. MEC: Matriz extracelular. Elaboración propia.

La fibrosis hepática es un proceso fibrogénico e inflamatorio complejo que ocurre en etapas avanzadas de diversas enfermedades crónicas del hígado, incluida la MASH. Este proceso se caracteriza por un excesivo depósito de matriz extracelular (MEC), principalmente colágeno tipo I y III, como parte de la respuesta cicatricial frente al daño hepático (Figura 5). La fibrosis involucra tanto células hepáticas parenquimatosas como no parenquimatosas, además de células inmunitarias infiltrantes. Entre ellas, las HSCs juegan un papel central en la fibrogénesis. Las HSCs, localizadas en el espacio de Disse, entre los hepatocitos y las células endoteliales sinusoidales del hígado (LSECs), constituyen aproximadamente el 10% de las células hepáticas. En su estado inactivo (qHSC), las HSCs funcionan principalmente como reservorios de vitamina A. En respuesta al daño hepático, los mediadores inflamatorios (p. ej. TGF-β y PDGF) activan a las HSCs,

transformándolas en su forma activa (aHSC). Estas células activadas presentan un fenotipo altamente proliferativo, contráctil, quimiotáctico, y secretan grandes cantidades de proteínas de MEC. Durante la fase fibrogénica, las aHSCs pierden sus gotas lipídicas intracelulares y adquieren un fenotipo miofibroblástico, caracterizado por la sobreexpresión de α -SMA (ACTA2) y colágeno tipo I (COL1A1). La acumulación prolongada de colágeno altera el parénquima hepático y la arquitectura vascular, lo que deteriora la función hepática y conduce a la formación de cicatrices, progresando eventualmente a cirrosis. (Tsuchida & Friedman, 2017; Wiering et al., 2023; Zhang et al., 2016).

La esteatosis y la fibrosis hepáticas son objetivos terapéuticos clave en el desarrollo de nuevos fármacos para MASLD, dada su relevancia en la progresión de la enfermedad. La acumulación excesiva de lípidos en el hígado y la formación de tejido fibroso son factores que agravan el daño hepático y aceleran la transición hacia fases más avanzadas, como la cirrosis. Por ello, el diseño de tratamientos efectivos para MASH debe centrarse en mecanismos que no solo reduzcan la lipogénesis hepática, sino que también inhiban los procesos fibrogénicos que perpetúan la inflamación y el daño estructural. En este contexto, es crucial desarrollar fármacos con efectos antilipogénicos y antifibrogénicos que puedan frenar la progresión de la enfermedad y mejorar los desenlaces clínicos a largo plazo.

1.1.2 Café e hígado

1.1.2.1 El café como fuente de compuestos bioactivos para tratar la MASLD

El café es actualmente una de las bebidas más consumidas en el mundo, junto con el agua y el té. Su consumo se remonta a la región arábiga de Yemen en el siglo XV, aunque su descubrimiento se sitúa en el siglo IX en Abisinia (hoy Etiopía), África. La palabra "café" se refiere a la bebida elaborada a partir de los granos tostados de la planta de cafeto (*Coffea*), y su popularidad radica principalmente en sus propiedades estimulantes, lo que lo ha convertido en uno de los productos vegetales más importantes en el mercado global (Bartra et al., 2011). El alto consumo de café puede tener un impacto significativo en la salud pública, lo cual ha despertado un gran interés entre investigadores y clínicos. Aunque el efecto del café en las enfermedades crónicas ha sido debatido en las últimas dos décadas debido a estudios retrospectivos con resultados contradictorios, la percepción ha mejorado a medida que se conoce más sobre su farmacología. Nuevos estudios epidemiológicos y experimentales sugieren que el consumo de café está asociado con un menor riesgo de diversas enfermedades crónicas y degenerativas. Incluso la Asociación Americana para el

Estudio de las Enfermedades Hepáticas (AASLD, por sus siglas en inglés) ha recomendado tomar al menos 3 tazas (~700 mL) de café negro al día para prevenir enfermedades crónicas hepáticas (Nieber, 2017).

El café es una bebida con una composición química compleja que incluye más de mil compuestos biológicamente activos, como la cafeína, polifenoles como los ácidos clorogénicos (ACGs), y diterpenos, como el cafestol y el kahweol. Numerosos estudios (Kositamongkol et al., 2021; Sewter et al., 2021), han demostrado que el consumo de café tiene efectos positivos en la salud hepática, como la reducción del riesgo de MASLD, la disminución de la gravedad de la esteatosis hepática y la ralentización de la fibrosis en MASH. Aunque algunos trabajos han atribuido estos beneficios a la cafeína, la evidencia sugiere que la reducción de la fibrosis hepática parece ser exclusiva del café y no de otras bebidas con cafeína, lo que ha resaltado la importancia de investigar cómo los diversos compuestos bioactivos del café influyen en MASLD y MASH.

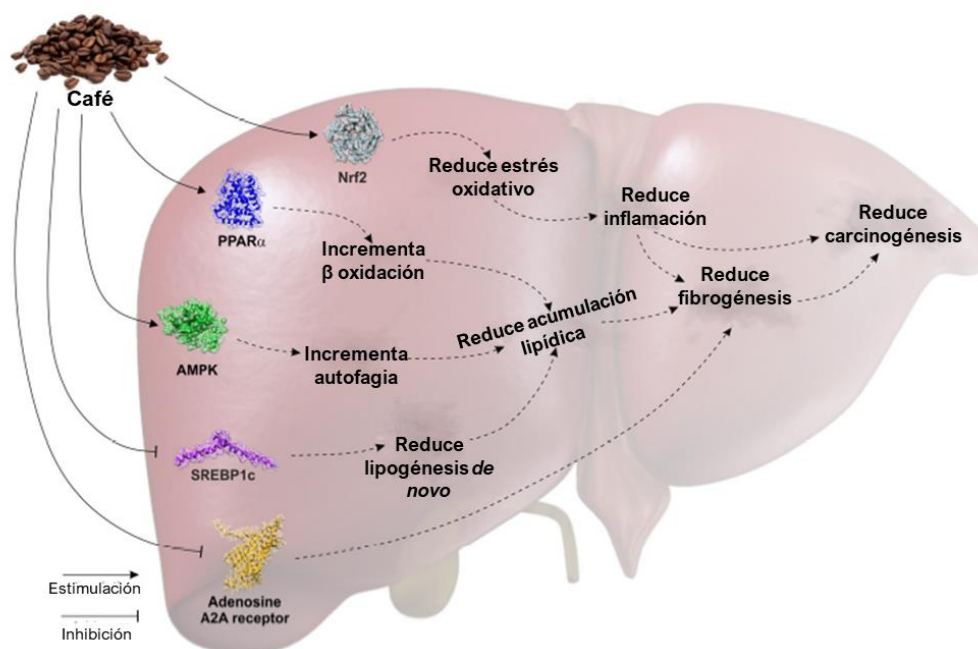


Figura 6. Algunos mecanismos de la cafeína y los ácidos clorogénicos del café sobre la MASLD. Nrf2: factor nuclear eritroide similar al factor 2. PPAR α : Receptor activado por proliferador de peroxisomas alfa. AMPK: Proteína cinasa activada por AMP. SREBP1c: Proteína de unión a elementos reguladores de esteroides 1c. Modificado de Salomone et al., 2017.

Se han identificado algunos mecanismos moleculares mediante los cuales el café ejerce su efecto hepatoprotector en MASH, principalmente asociados a la cafeína y los ACGs (Figura 6). Por ejemplo, en

modelos experimentales de fibrosis, se ha demostrado que la cafeína inhibe la activación de las HSCs bloqueando los receptores de adenosina A_{2A}, relacionados a la proliferación y fibrogénesis en las HSCs. También se ha demostrado que la cafeína promueve la expresión del factor Nrf2, que activa enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT), reduciendo así el estrés oxidativo en el hígado. Los ACGs, por otro lado, ayudan a disminuir la acumulación de AGs libres al inhibir la LDN y promover la β -oxidación, mediante la reducción de la proteína de unión a elementos reguladores de esteroides 1c (SREBP1c), y la activación de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) y el receptor activado por proliferador de peroxisomas alfa (PPAR α) (Salomone et al., 2017). Además, en ratones alimentados con una dieta alta en grasas, la suplementación con café, tanto con cafeína como sin ella, mejoró la oxidación de ácidos grasos libres al aumentar la expresión de la acil-CoA oxidasa 1 (ACOX1), una enzima clave en la beta-oxidación de los AGs (Tarantino et al., 2021). Esto resalta que, además de la cafeína, otros compuestos bioactivos podrían desempeñar un papel crucial en el mecanismo de acción del café sobre la MASLD.

Hasta la fecha, diversos estudios epidemiológicos y metaanálisis han demostrado que el consumo de café reduce el riesgo de MASLD y fibrosis hepática gracias a los diversos compuestos bioactivos presentes en la bebida. Sin embargo, la concentración de estos compuestos varía según varios factores, como la variedad de los granos, los métodos de tostado y el procesamiento del café. De hecho, se ha observado que el consumo de café filtrado tiene un mayor efecto protector sobre el hígado y reduce la fibrosis en comparación con el café expreso. Esto se debe, en parte, a que el tueste ligero del café filtrado permite retener una mayor cantidad de compuestos bioactivos, como los polifenoles, que contribuyen a sus propiedades hepatoprotectoras (Barrea et al., 2023; Elshaer et al., 2024). Esta evidencia posiciona los granos de café sin tostar (café verde) como una fuente prometedora de compuestos bioactivos con potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades hepáticas. Gracias a su alto contenido de polifenoles y otros compuestos bioactivos, que se reducen durante el proceso de tostado, el café verde podría desempeñar un papel clave en la disminución de la lipogénesis y la fibrosis hepática, lo que lo convierte en un candidato atractivo para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para enfermedades como MASLD (Bobková et al., 2020; Sanlier et al., 2019).

1.1.2.2 Café verde y su potencial terapéutico en la MASH

El término "café verde" se refiere a los granos de la planta *Coffea* antes de someterse al proceso de tostado. En los últimos años, ha ganado popularidad como un alimento funcional debido a su alto

contenido de compuestos bioactivos con diversos beneficios para la salud. Los granos de café verde se componen principalmente de hidratos de carbono (59-61%), lípidos (11-17%), proteínas (10-16%), fenoles (6-10%), minerales (4%), ácidos grasos (2%), cafeína (1-2%), trigonelina (1%) y aminoácidos libres (<1%). Aunque la concentración de estos compuestos puede variar dependiendo de la especie y las condiciones de cultivo, se ha observado que *Coffea canephora*, comúnmente conocida como Robusta, tiende a presentar una mayor cantidad de estos compuestos fenólicos en comparación con otras variedades. Entre los compuestos fenólicos, destacan especialmente los ACGs debido a su elevada bioactividad, constituyendo la clase más abundante de fenoles en el café verde. Estos compuestos no solo son responsables de gran parte de los efectos protectores del café verde, sino que también desempeñan un papel clave en la modulación de rutas metabólicas involucradas en enfermedades crónicas como la MASLD (Hu et al., 2019; Perdani et al., 2019; Silva et al., 2022).

En la última década, se han llevado a cabo ensayos clínicos en humanos para evaluar el efecto de la suplementación con extracto de café verde en pacientes con MASLD (Figura 7). En diversos estudios realizados en pacientes obesos con esta enfermedad, la suplementación diaria con extracto de café verde y ACGs, mostró una reducción significativa del índice de masa corporal (IMC), además de mejoras en el perfil lipídico, reflejadas en la disminución de los niveles de TGs y colesterol en sangre (Hosseinabadi et al., 2020; Nikpayam et al., 2020). Otro ensayo llevado a cabo en pacientes de entre 20 y 70 años, diagnosticados con MASLD mediante ultrasonografía y tratados con cápsulas de extracto de café verde durante 8 semanas, mostró resultados prometedores. En particular, se observó una reducción en los niveles de enzimas hepáticas, como la alanina aminotransferasa (ALT) y la proteína C reactiva (PR-C), ambos indicadores de inflamación hepática. Además, los pacientes experimentaron una disminución en los niveles de AGs y TGs en sangre (Shahmohammadi et al., 2017). Adicionalmente, algunos estudios han demostrado que la suplementación con extracto de café verde puede reducir los niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), una de las principales citocinas implicadas en la progresión de la MASLD (Asbaghi et al., 2021). Estos estudios sugieren que la suplementación con extracto de café verde puede mejorar los perfiles lipídicos séricos y disminuir la inflamación en pacientes con MASLD, lo que subraya su potencial como intervención terapéutica en esta enfermedad. No obstante, los resultados sobre su impacto en las enzimas hepáticas y en la reducción de la esteatosis hepática han sido inconsistentes y requieren mayor aclaración. Incluso, si bien se ha demostrado su efecto sobre el perfil lipídico y biomarcadores inflamatorios, aún es necesario investigar los mecanismos por los que el café verde podría influir específicamente en la progresión de la fibrosis hepática, una de las complicaciones más graves en MASLD.

Además de la limitada evidencia sobre los mecanismos del café verde en MASLD y MASH, el uso de sus compuestos fitoquímicos enfrenta desafíos como la baja biodisponibilidad y falta de selectividad, lo que reduce su eficacia terapéutica. Tras el consumo, solo una pequeña fracción de los compuestos bioactivos llega al hígado debido a su rápida degradación y eliminación. Además, su acción no dirigida puede afectar otros tejidos, limitando su efectividad en el tratamiento de enfermedades hepáticas. Para superar estas limitaciones, es crucial desarrollar estrategias avanzadas, como la encapsulación en nanopartículas o el uso de sistemas de liberación controlada, que optimicen tanto la biodisponibilidad de los compuestos como su acumulación selectiva en el hígado. Estas innovaciones podrían mejorar la acción terapéutica del café verde, maximizando sus efectos en el hígado y minimizando el impacto en otros órganos (Barani et al., 2021; Seguido et al., 2022).

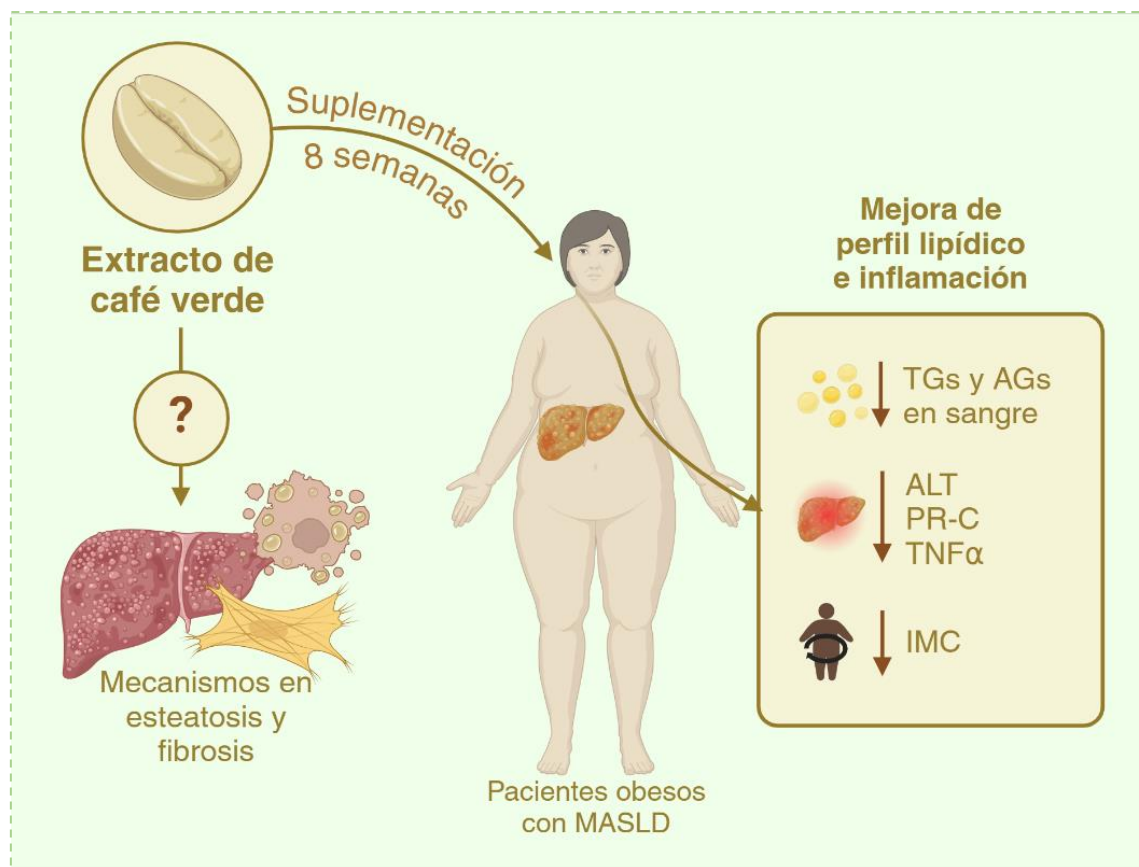


Figura 7. Efecto de la suplementación con extracto de café verde en pacientes obesos con MASLD. La suplementación con extracto de café verde ha demostrado reducir los niveles de lípidos en sangre y de inflamación, así como el IMC de pacientes obesos. TGs: Triglicéridos. AGs: Ácidos grasos. ALT: Alanina aminotransferasa. PR-C: Proteína C reactiva. TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa. IMC: Índice de masa corporal. Elaboración propia.

1.1.3 Nanotecnología para mejorar la entrega de compuestos fitoquímicos del café verde

1.1.3.1 Nanoencapsulación de compuestos bioactivos del café

A pesar de la eficacia demostrada por muchos compuestos fitoquímicos en el tratamiento de diversas enfermedades, su aplicación biomédica enfrenta varios desafíos. Entre los más importantes se encuentran su limitada solubilidad y baja absorción en los fluidos corporales, la dificultad para alcanzar los tejidos específicos, y su reducida biodisponibilidad, lo que restringe su efectividad en tratamientos médicos. En ese sentido, la nanotecnología ha emergido como una herramienta importante en la optimización de la entrega de sustancias bioactivas a través de la nanoencapsulación, que es una técnica que permite formular y cargar sustancias dentro de vehículos de tamaño nanométrico ($<1 \mu\text{M}$), con la capacidad de retener, transportar y liberar las moléculas en el sitio deseado. Este proceso puede llevarse a cabo utilizando dendrímeros, nanopartículas (NPs) poliméricas, liposomas, entre otros sistemas de liberación (Figura 8). Estas estrategias presentan un gran potencial para encapsular fitoquímicos, mejorando su estabilidad, biodisponibilidad y eficacia, lo que las convierte en herramientas prometedoras para la administración controlada de estos compuestos en aplicaciones terapéuticas (Ling et al., 2019; Pachau et al., 2021).

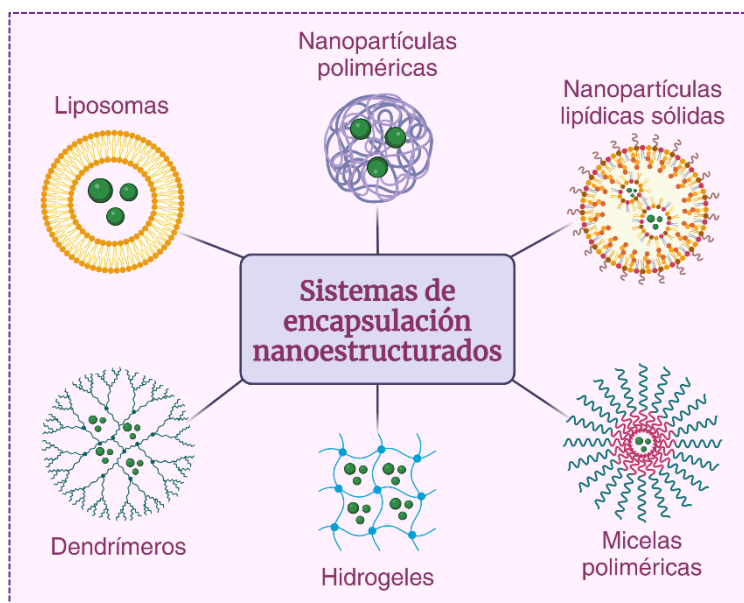


Figura 8. Sistemas de nanoencapsulación de compuestos bioactivos más comunes. El extracto de café verde se ha encapsulado en nanopartículas poliméricas y lipídicas sólidas mejorando aspectos como su farmacocinética y reduciendo su toxicidad. Elaboración propia.

Se ha reportado la encapsulación del extracto de café verde con la finalidad de mejorar su liberación controlada, reducir su toxicidad y proteger su integridad química. En un estudio realizado en 2020, se encapsuló extracto de café verde en nanopartículas de maltodextrina con el fin de proteger y conservar los polifenoles presentes en el extracto. Las pruebas de bioactividad *in vitro* revelaron que aproximadamente el 80% del extracto se liberaba de manera controlada en el intestino. Asimismo, la estabilidad del extracto mejoró significativamente durante su almacenamiento en comparación con el extracto sin encapsular. Estos hallazgos indican que las nanopartículas de café verde recubiertas con maltodextrina son una estrategia eficaz para la liberación controlada del extracto de café verde (Desai et al., 2020). Por otro lado, Moussa y colaboradores desarrollaron nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) cargadas con extracto de café verde para mejorar su biodisponibilidad. Las SLNs presentaron un tamaño de partícula de aproximadamente 235 nm y una elevada eficiencia de encapsulación (~58%). Además, la permeabilidad intestinal del extracto se incrementó de manera significativa gracias a la nanoencapsulación. Estos resultados indican que las SLNs tienen un gran potencial para mejorar la absorción intestinal del extracto de café verde (Moussa et al., 2023). Finalmente, se ha demostrado que la encapsulación del extracto de café verde en micropartículas de maltodextrina y goma arábiga reduce su toxicidad durante un periodo de 30 días, incluso a dosis elevadas de hasta 1000 mg/kg. Este hallazgo se estableció mediante pruebas de toxicidad aguda y subaguda realizadas en ratones y ratas (Silva Faria et al., 2020). La encapsulación de compuestos bioactivos presentes en el café a través de formulaciones nanotecnológicas representa una estrategia prometedora para su utilización como agentes terapéuticos. Esta técnica no solo permite la protección de estos compuestos sensibles, sino que también optimiza su biodisponibilidad y eficacia en aplicaciones clínicas. Sin embargo, la selección de un sistema de encapsulación óptimo sigue siendo un área activa de investigación. Diversos materiales y métodos de encapsulación han mostrado propiedades alentadoras que podrían contribuir significativamente a mejorar las características de los extractos con potencial terapéutico, como el extracto de café verde.

1.1.3.2 Nanopartículas híbridas de polímero-lípido

Dentro de los sistemas de entrega de fármacos (SDEFs), las NPs híbridas de polímero-lípido (NHPLs) representan un área clave. Estas NPs combinan las ventajas de los SDEFs poliméricos y vesiculares lipídicos, ofreciendo una amplia gama de materiales y composiciones químicas. Los SDEFs poliméricos utilizan tanto polímeros sintéticos como naturales. Se han empleado, por ejemplo, diferentes polímeros de origen sintético y natural para su aplicación biomédica, como el ácido poli-láctico, co-glicólico (PLGA), policaprolactona (PLC), quitosano, etc. En cuanto a los sistemas vesiculares, los liposomas y niosomas son

relevantes; los primeros están compuestos por vesículas lipídicas, mientras que los niosomas contienen surfactantes no iónicos en lugar de fosfolípidos. Estos sistemas ofrecen una excelente compatibilidad con gran variedad de fármacos, permitiendo una mayor encapsulación simultánea de sustancias hidrofílicas y lipofílicas. Además, debido a su naturaleza lipídica, mejoran los perfiles farmacocinéticos, lo que puede resultar en una respuesta terapéutica más eficaz del fármaco encapsulado. Sin embargo, presentan desafíos como fugas del fármaco, problemas de estabilidad y dificultades en la escalabilidad del proceso. Estos inconvenientes, comunes en sistemas como los liposomas y nanopartículas poliméricas, pueden resolverse mediante la combinación de sus componentes estructurales en NHPLs. Además, estos SDEFs pueden mejorar su especificidad mediante la conjugación de moléculas de direccionamiento en su superficie, como proteínas, anticuerpos, o vitaminas. Este proceso se facilita a través de lípidos PEGilados (lípidos unidos a polietilenglicol), que actúan como un puente para incorporar estos agentes de direccionamiento (Mandal et al., 2013; Tahir et al., 2020).

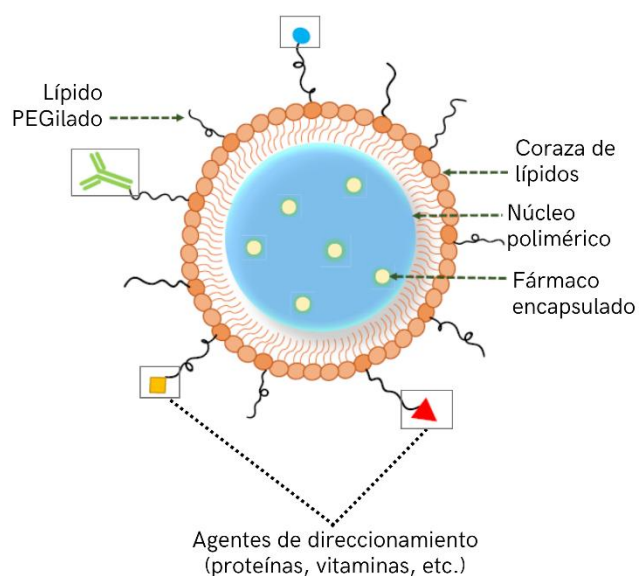


Figura 9. Estructura típica de una nanopartícula híbrida de polímero-lípido. Consta de un núcleo polimérico que encapsula una carga útil, una cubierta lipídica y en algunas ocasiones una capa externa de lípido-PEG que puede conjugarse con una variedad de agentes de direccionamiento. Modificado de Mukherjee et al., 2019.

De hecho, los SDEFs basados en polímero y lípidos se han estudiado como potenciales vehículos para entregar fármacos con efecto terapéutico en enfermedades crónicas del hígado como la MASLD, ya que, una característica que comparten tanto las NPs poliméricas y lipídicas es su capacidad para acumularse en regiones con permeabilidad vascular aumentada, como los focos de inflamación, infección o tumores, lo

que se conoce como efecto de permeabilidad y retención aumentadas (EPR). La combinación de estas propiedades con la capacidad de las NPs para dirigirse específicamente al hígado las hace especialmente adecuadas para aplicaciones terapéuticas en este órgano, maximizando el potencial de los tratamientos mientras se minimizan los efectos adversos en otros tejidos (Böttger et al., 2020).

Se han desarrollado varios métodos para formular NHPLs, basados en las propiedades de los componentes y los objetivos terapéuticos. Existen dos enfoques principales: el de dos pasos, donde se combinan núcleo y capas externas, y el de un solo paso, en el que lípido y polímero se ensamblan simultáneamente. En el enfoque de dos pasos, las distintas capas, formadas por componentes estructurales diferentes, se fabrican de manera individual y luego se combinan mediante procesos como la adsorción, el autoensamblaje o la encapsulación para formar una partícula completa. La morfología del núcleo y la coraza se puede ajustar utilizando técnicas como sonicación, emulsificación con disolvente, evaporación, nanoprecipitación, extrusión y homogeneización a alta velocidad. Por otro lado, el método de un solo paso para la creación de nanopartículas híbridas consiste en la mezcla de las dos fases (lípido y polímero), que se autoensamblan para formar el núcleo de las NPs. Posteriormente, se incorpora la capa lipídica y se ajustan las propiedades de tamaño y dispersión de las NHPLs mediante técnicas como sonicación o agitación.

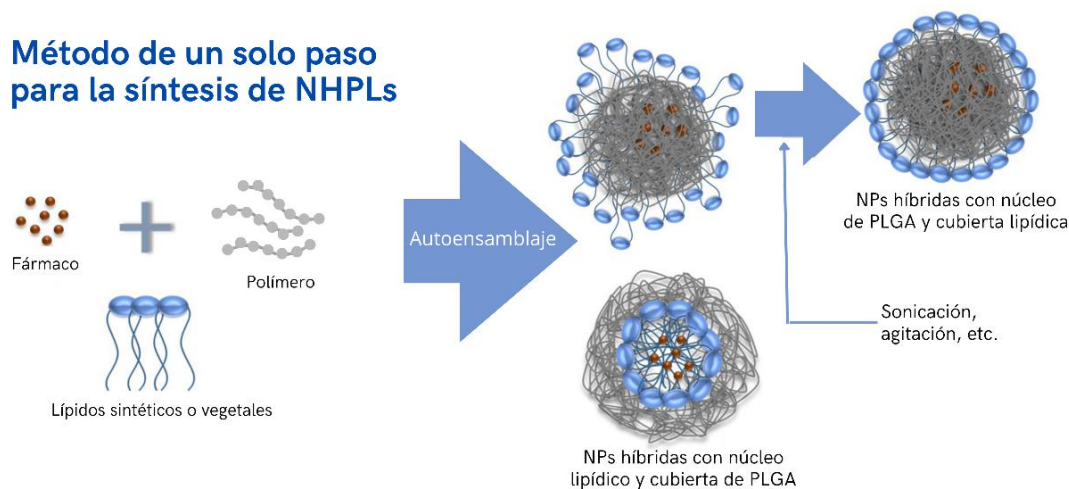


Figura 10. Método de un solo paso para la obtención de NHPLs. Este método implica la mezcla de fases lipídica y polimérica que se autoensamblan para formar el núcleo de las nanopartículas. Luego, se añade la capa lipídica y se ajustan las propiedades de tamaño y dispersión mediante técnicas como sonicación o agitación. Este enfoque es más eficiente y favorece una mejor integración estructural. NHPLs: Nanopartículas híbridas polímero-lípido. PLGA: Ácido poli-láctico co-glicólico. Modificado de Ghitman et al., 2020.

Este enfoque es más eficiente y facilita una mejor integración de los componentes estructurales. Las formulaciones de NHPLs han avanzado significativamente en cuanto a su estrategia de preparación, pasando de los métodos convencionales de dos pasos a los modernos enfoques de autoensamblaje en un solo paso. Por ejemplo, el método de un solo paso es preferido cuando los materiales de encapsulación son miscibles con la sustancia de recubrimiento y solubles en el disolvente orgánico, lo que facilita un proceso de encapsulación más eficiente y homogéneo. De este modo, el método de un solo paso permite un control preciso sobre el tamaño de partícula, el índice de polidispersidad (PDI) y la uniformidad de los componentes estructurales de las NHPLs, mejorando las propiedades fisicoquímicas y la estabilidad (Mukherjee et al., 2019; Tahir et al., 2020). Las propiedades de las NHPLs suponen una gran ventaja para la encapsulación de diversidad de fármacos con potencial efecto terapéutico en la MASLD, mejorando algunos aspectos como la farmacocinética, biodisponibilidad y retención en el hígado de compuestos bioactivos como los presentes en el extracto de café verde.

1.1.3.3 Nanopartículas híbridas de PLGA y lecitina

El copolímero PLGA, aprobado por la FDA, se utiliza ampliamente en el diseño y formulación de SDEFs debido a su excelente biodegradabilidad, biocompatibilidad. Estas propiedades son resultado de la hidrólisis de sus enlaces éster en presencia de agua, lo que libera ácido láctico y glicólico, ambos metabolizados sin toxicidad sistémica a través del ciclo de Krebs. Asimismo, posee la capacidad para encapsular una amplia variedad de fármacos hidrófobos. Las NPs de PLGA han demostrado ser efectivas en diversas aplicaciones biomédicas, como en trastornos neurológicos, terapia del cáncer, inflamación, enfermedades cardiovasculares, e inmunológicas, encapsulando moléculas bioactivas como fármacos, proteínas, vacunas, y ácidos nucleicos. Además, pueden adaptarse a varias vías de administración, incluyendo la sistémica, oral e inhalable, optimizando así la biodisponibilidad según el tipo de tratamiento requerido. Sin embargo, las NPs de PLGA enfrentan ciertas limitaciones: baja capacidad de carga de fármacos, uso de solventes orgánicos durante su preparación, liberación rápida de los fármacos (efecto de liberación de estallido), agregación de partículas, y desafíos relacionados con el costo y la escalabilidad de la fabricación. Otra barrera importante es la rápida eliminación del fármaco, ya que las proteínas plasmáticas (opsoninas) tienden a adherirse a la superficie de las NPs, lo que facilita su captación por el sistema reticuloendotelial (RES) antes de que lleguen a los tejidos o los órganos objetivo (Ghitman et al., 2020; Pandita et al., 2015).

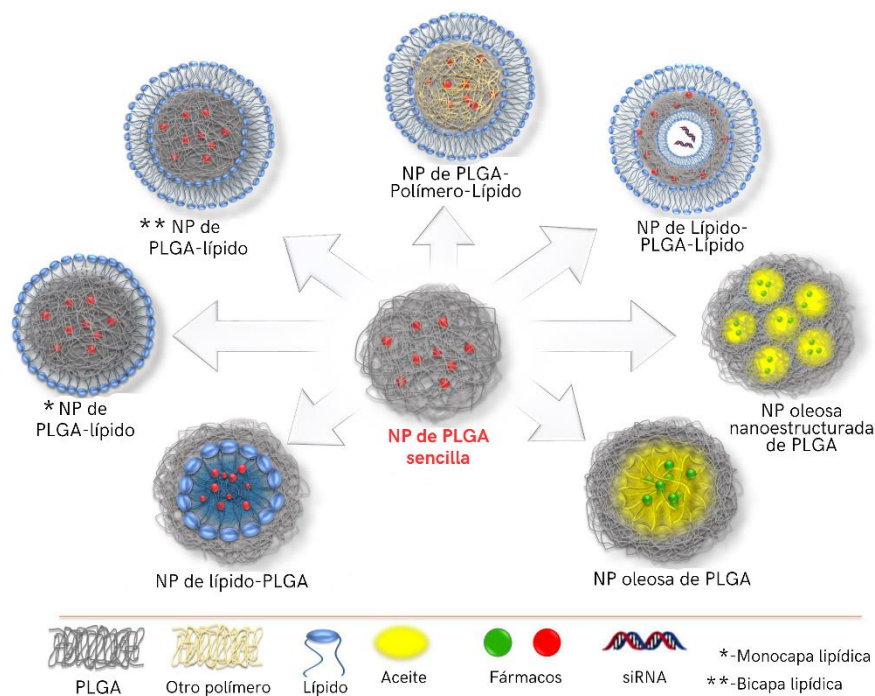


Figura 11. Tipos de nanopartículas híbridas de PLGA y lípidos. NP: Nanopartícula. PLGA: Ácido poli-láctico co-glicólico. siRNA: ARN pequeño de interferencia. Modificado de Ghitman et al., 2020.

Para superar las limitaciones de NPs de PLGA, la investigación se ha enfocado en el desarrollo de NPs híbridas de PLGA-lípido, que combinan las propiedades de los lípidos y las NPs poliméricas. La incorporación de un sistema vesicular lipídico a las NPs de PLGA permite un control más preciso de la liberación de sustancias bioactivas encapsuladas, ya que la membrana lipídica actúa como una barrera contra la difusión de agua, reduciendo la velocidad de hidrólisis del polímero y facilitando una liberación controlada del fármaco. Además, la matriz polimérica de PLGA proporciona integridad estructural, morfología controlada y alta capacidad de encapsulación de fármacos. Las características físicas y farmacocinéticas *in vivo*, como el tiempo de circulación y la localización específica en células o tejidos, pueden ser ajustadas mediante modificaciones adecuadas de la superficie lipídica. En este contexto, los sistemas vesiculares basados en lípidos anfifílicos, como los liposomas, resultan particularmente atractivos para su combinación con NPs de PLGA, debido a su capacidad para mejorar la administración intracelular y su versatilidad en la modificación de la superficie (Pandita et al., 2015; Varghese et al., 2016).

La fosfatidilcolina, más conocida como lecitina, ha ganado notable atención como un lípido clave en la formulación de SDEFs debido a su abundancia natural en el cuerpo como componente esencial de las

membranas celulares. Su biocompatibilidad y versatilidad permiten su uso en diversas vías de administración, como la parenteral, oral y dérmica, lo que la convierte en un objetivo de investigación fundamental en el ámbito farmacéutico. Además de su función como fosfolípido estructural, la lecitina se emplea frecuentemente NHPLs de PLGA, actuando como agente emulsionante y estabilizador. Esto elimina la necesidad de tensioactivos adicionales como el alcohol polivinílico (PVA), que presenta limitaciones de toxicidad y dificultad para su eliminación en el cuerpo (Varghese et al., 2016). Estudios han demostrado que la lecitina forma una monocapa estable alrededor del núcleo polimérico, mejorando la integridad estructural y la estabilidad de las NPs. Su recubrimiento también asegura una forma esférica uniforme y una liberación controlada y sostenida del fármaco encapsulado, optimizando el efecto terapéutico. Adicionalmente, su baja citotoxicidad y alta biocompatibilidad la hacen adecuada para aplicaciones biomédicas, mientras que facilita la administración dirigida de fármacos al mejorar la captación celular y permitir la adición de agentes de direccionamiento en su estructura lipídica, maximizando la eficacia terapéutica (Ahmaditabar et al., 2017; Godara et al., 2020; Wu et al., 2015).

La combinación de lecitina y PLGA en la estructuración de NHPLs, resultan en SDEFs con buena estabilidad estructural, liberación controlada, alta eficacia de encapsulación y biocompatibilidad, mejorando así la eficacia terapéutica y reduciendo los efectos secundarios. Estas características hacen de las NPs híbridas PLGA y lecitina una plataforma prometedora para la administración de sustancias bioactivas en enfermedades crónicas como la MASLD, al mejorar la eficacia terapéutica y permitir una administración más específica de sustancias bioactivas.

1.2 Justificación

Hoy en día México es uno de los países con las tasas más altas de prevalencia de MASLD en Latinoamérica. Diversos factores, como el aumento en los índices de obesidad, la diabetes tipo 2 y el sedentarismo, contribuyen significativamente a la elevada predisposición de la población mexicana al desarrollo de MASLD y sus formas avanzadas. La MASH es una forma severa de MASLD y es un punto crítico para la intervención terapéutica. En esta etapa, la esteatosis y fibrosis hepáticas pueden llegar a coexistir, lo que aumenta el riesgo de cirrosis, un punto de no retorno en la enfermedad. Esto resalta la necesidad urgente de estrategias que detengan o prevengan la progresión de MASLD en esta fase. Las propiedades antilipogénicas y antifibróticas de diversos compuestos fitoquímicos presentes en el café, han demostrado tener un efecto atenuante en las enfermedades hepáticas crónicas como la MASLD, sin embargo, algunas limitaciones como su baja biodisponibilidad, reduce su eficacia terapéutica. En este contexto, el diseño

racional de un sistema de liberación controlada de compuestos bioactivos del café, junto con su evaluación farmacológica *in vitro*, podría abrir nuevas vías para el desarrollo de terapias basadas en compuestos fitoquímicos del café dirigidas al tratamiento de la MASLD.

1.3 Hipótesis

Los compuestos fitoquímicos extraídos de café reducirán la esteatosis y/o fibrosis hepática, en un modelo *in vitro* de enfermedad hepática esteatósica asociada a disfunción metabólica.

1.4 Objetivos

Objetivo general

Mostrar evidencia, a través de un modelo *in vitro*, de que los compuestos fitoquímicos extraídos del café pueden ser un agente terapéutico para MASLD y/o MASH.

Objetivos específicos

1. Obtener un extracto de café verde y encapsularlo en nanopartículas híbridas de polímero lípido.
2. Determinar el efecto antifibrótico del extracto de café verde liberado de las ECV-NPLs en un monocultivo de células estrelladas hepáticas activas.
3. Determinar el efecto del extracto de café verde liberado de las ECV-NPLs en un modelo *in vitro* de esteatosis.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Extracción de compuestos fitoquímicos de café verde

Para la extracción de compuestos fitoquímicos del café, se utilizaron granos de café verde lavado de la especie *Coffea canephora* (Robusta) adquiridos de Cafetalera San Felipe (Veracruz, México), el cual, según la información del proveedor, fue cosechado a 900 metros sobre el nivel del mar. El proceso de extracción de compuestos fitoquímicos se dividió en tres partes, 1) molienda, 2) extracción y 3) concentración, dicha metodología se describe detalladamente a continuación:

- 1) Molienda: Se colocaron 200 g de granos de café verde en un molino de rebabas automático Hamilton Beach, modelo 80385. Se seleccionó la opción de molido tipo “Expreso” para obtener un tamaño de partícula lo más fino posible, asegurando así una mayor superficie de contacto en posteriores procesos de extracción (Figura 12 A-B). El producto resultante de la molienda se almacenó en un frasco de vidrio a temperatura ambiente, protegido de la luz.
- 2) Extracción: Se utilizó el método de extracción sólido-líquido descrito por Sharaf et al., 2022 con algunas modificaciones. Primero, los granos de café molidos se secaron en un horno a 50 °C durante 24 horas para eliminar la mayor cantidad de agua posible. Posteriormente, 25 g del café verde molido se colocaron en 250 mL de metanol absoluto (Jalmek, México; M6125), y la mezcla se mantuvo bajo agitación a 1000 rpm a temperatura ambiente (~22 °C) durante 60 minutos. Una vez completada la extracción, la solución fue filtrada inicialmente con un filtro de café convencional, seguido de un filtrado con jeringa con poros de 0.20 µm. El filtrado resultante se almacenó a 4 °C, protegido de la luz, para su posterior uso.
- 3) Concentración: Para eliminar completamente el metanol del extracto, se utilizó un evaporador modelo Rocket Synergy (Genevac, Reino Unido) a 45 °C y 30 mBar durante 2 h. El sólido resultante, una vez seco, se almacenó a -20 °C protegido de la luz y se etiquetó como ECV para su posterior análisis y uso experimental. (Figura 12 C).



Figura 12. Procesamiento de los granos de *C. canephora* para la obtención del extracto. (A) Molienda de los granos de café verde lavado. (B) Granos molidos secados durante 24 h a 50 °C. (C) Extracto concentrado.

2.2 Caracterización del extracto de café verde

2.2.1 Determinación del contenido fenólico total

Con el fin de determinar el contenido fenólico del ECV, se realizó el ensayo de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999). El ensayo Folin-Ciocalteu es un método colorimétrico donde se mide el cambio de color de la reacción entre una muestra con polifenoles y el reactivo Folin-Ciocalteu en presencia de Na_2CO_3 . Para ello, se siguió la metodología de Rubio-Elizalde et al., 2019. Brevemente, en una placa de 96 pozos, se colocaron 100 μL de reactivo Folin-Ciocalteu 0.2 N (Sigma-Aldrich, EUA; F9252), junto con 20 μL de muestra de ECV a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 5 minutos después, se agregaron 80 μL de Na_2CO_3 700 mM y la reacción se incubó en oscuridad por 2 h a temperatura ambiente ($\sim 22^\circ\text{C}$), las muestras se analizaron por triplicado ($n=3$). Transcurridas las 2 h, la placa se leyó a 760 nm en un lector de placas Epoch (BioTek, EUA). El contenido fenólico total de las muestras se calculó con base en una curva estándar de ácido gálico (AG) (Anexo A - Figura 26), utilizando la ecuación de la recta despejada para "x" (1) que es igual a los equivalentes de ácido gálico (EAG) en μM , y los resultados se expresaron en miligramos de EAG por gramo de ECV (mgEAG/g ECV).

$$EAG (\mu\text{M}) = \left[\frac{y - 0.0154}{0.0009} \right] \quad (1)$$

Donde y , es el valor de absorbancia de la muestra con reactivo Folin-Ciocalteu 0.2 N y Na_2CO_3 700 mM a 760 nm posterior a 2 h de incubación en oscuridad.

2.2.2 Evaluación de la actividad antioxidante relacionada a la remoción de radicales libres

La actividad antioxidante del ECV se determinó mediante el ensayo 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH[•]). El DPPH[•] es un radical estable de apariencia púrpura, que, en presencia de un antioxidante, se reduce y cambia su apariencia a un tono amarillo, el cambio en la coloración se mide a 517 nm (Mishra et al., 2012).

Para llevar a cabo el ensayo, en una placa de 96 pozos se colocaron 50 μ L de muestra de ECV disuelto en metanol a 100 μ g/mL, seguido de 150 μ L de solución etanólica de DPPH[•] 60 μ M, dicha mezcla se incubó 30 min en oscuridad y se leyó en un lector de placas Epoch a 517 nm. El porcentaje de inhibición de DPPH[•] se calculó utilizando la ecuación (2). El porcentaje de inhibición de DPPH[•] se comparó con una curva estándar de ácido cítrico (AC) (Anexo A - Figura 27), utilizando la ecuación de la recta despejada para "x" (3) que es igual a los equivalentes de ácido cítrico (EAC) en μ M.

$$\text{Inhibición de DPPH}^{\bullet} (\%) = \left[\frac{DO_{\text{Control}} - (DO_{\text{muestra}} - DO_{\text{blanco}})}{DO_{\text{control}}} \right] \times 100. \quad (2)$$

donde: DO_{control} , DO_{muestra} y DO_{blanco} son valores de absorbancia del control, de la muestra con DPPH[•] 60 μ M y el blanco a los 30 min de incubación, respectivamente. DO_{control} corresponde a una solución de 150 μ L de DPPH[•] 60 μ M + 50 μ L de metanol absoluto.

$$EAC (\mu M) = \left[\frac{\text{Inhibición de DPPH}^{\bullet} (\%) - 3.6335}{0.987} \right] \quad (3)$$

2.3 Síntesis de nanopartículas híbridas polímero-lípido

La síntesis de nanopartículas híbridas de polímero-lípido (NPLs), se llevó a cabo mediante la técnica de nanoprecipitación combinada con autoensamblaje, siguiendo la metodología propuesta por Fang et al., 2010, con algunas modificaciones basadas en Ahmaditabar et al., 2017. Primero, se prepararon soluciones stock de PLGA 50:50 (Nanosoft Polymers, EUA; 11088-20-50K) a 20 mg/mL en acetonitrilo y de lecitina de soya (HSPC) (Nanosoft Polymers, EUA; 26372) a 10 mg/mL en etanol (EtOH) al 4%, esta última fue preparada a 65 °C para lograr la correcta homogenización del fosfolípido. En un vial de vidrio, se preparó la fase orgánica con el ECV (FOc) o sin el ECV (FOv). La FOc consistió en 500 μ L de solución stock de PLGA 20 mg/mL y 100 μ L de solución stock de ECV 10 mg/mL, de tal manera que la FOc representara el 10% del

volumen total de síntesis, así como el ECV el 10% en peso respecto al PLGA utilizado para la obtención de las ECV-NPLs. La FOv no contenía el ECV y en su lugar se añadieron 100 μ L de metanol absoluto, que era el solvente donde estaba disuelto el ECV. En un vaso de precipitados, se colocaron 3.8 mL de agua Milli-Q seguidos de 200 μ L de HSPC 10 mg/mL en agitación constante a 180 rpm y 65 °C, posteriormente, a esta solución en agitación a 200 RPM y 65 °C, se gotearon la FOc o FOv (1 mL/min), enseguida se añadieron 5 mL de agua Milli-Q y la solución resultante se llevó a sonicación durante 7 min a 42 kHz en un baño ultrasónico serie MH 2800 (Branson Ultrasonics, EUA). Finalmente, se realizaron lavados por centrifugación a 12000 x g por 3, 6, 12 y 18 min utilizando filtros Microsep™ Advance con límite de peso molecular (MWCO, por sus siglas en inglés) de 10 kDa (Cytiva/Pall Life Sciences, EUA) para eliminar las moléculas libres y purificar las nanopartículas, las cuales fueron recuperadas del filtro con 2 mL de buffer fosfato salino 1X (PBS) (pH 7.4) y almacenadas a 4 °C. Las nanopartículas híbridas de polímero-lípido cargadas con el extracto se etiquetaron como ECV-NPLs y las vacías como NPLs.

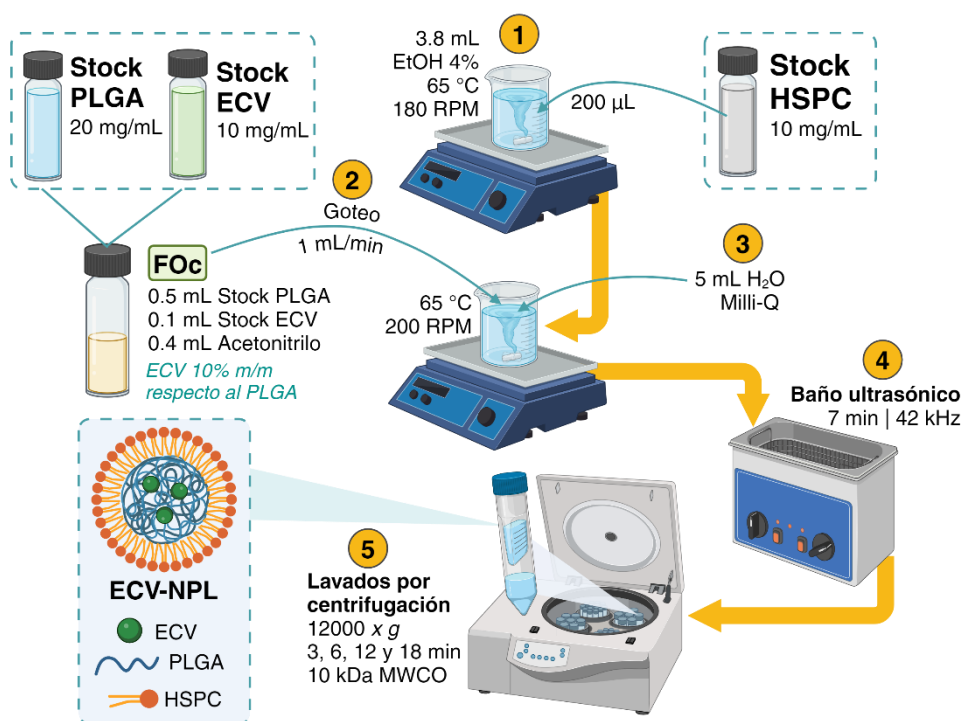


Figura 13. Metodología de la síntesis de nanopartículas híbridas polímero-lípido cargadas con extracto de café verde mediante nanoprecipitación combinada con autoensamblaje. (1) La fase acuosa se preparó con EtOH 4% y 2 mg de HSPC. (2) Luego, la fase orgánica se goteó lentamente a la solución de HSPC en agitación constante. (3) El volumen de síntesis fue completado a 10 mL con agua Milli-Q. (4) Subsecuentemente, la solución resultante fue llevada a baño ultrasónico por 7 min. (5) Finalmente, la misma solución se purificó mediante lavados por centrifugación con filtros de 10 kDa de MWCO para eliminar el ECV no encapsulado y los residuos de solvente orgánico. PLGA: Ácido poli-láctico co-glicólico. HSPC: Lecitina de soya. FOc: Fase orgánica cargada. ECV: Extracto de café verde. MWCO: Límite de peso molecular. NPL: Nanopartícula polímero-lípido. Elaboración propia en BioRender.com

2.4 Caracterización de NPLs y ECV-NPLs

2.4.1 Diámetro hidrodinámico y potencial Zeta

El diámetro hidrodinámico y el potencial zeta de las ECV-NPLs y NPLs, fueron evaluados en un analizador de partículas Malvern ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). El método de dispersión dinámica de la luz (DLS) indica el diámetro hidrodinámico y el índice de polidispersidad (PDI) de las ECV-NPLs y NPLs, mientras que el análisis del potencial zeta demuestra el potencial eléctrico en el plano deslizante del sistema de partículas (Clogston & Patri, 2011). Las mediciones se llevaron a cabo por triplicado (n=3) utilizando 200 µL de cada muestra suspendida en PBS 1X (pH 7.4) y se reportó el valor promedio de cada una de las variables medidas.

2.4.2 Morfología y tamaño

La morfología y el tamaño en seco de las ECV-NPLs y NPLs se estudiaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM, por sus siglas en inglés) utilizando un microscopio electrónico H-7500 (Hitachi, Ltd, Japón). Las muestras se prepararon depositando 10 µl de ECV-NPLs o NPLs recién sintetizadas sobre una rejilla de cobre de 400 mesh con membrana de formvar/carbono. Las muestras se dejaron reposar durante 30 min a temperatura ambiente y el exceso se eliminó con papel filtro. Se obtuvieron imágenes de TEM con aumentos de 15-70 kx y se analizaron con el software ImageJ (National Institutes of Health & Laboratory for Optical and Computational Instrumentation, EUA) para determinar el tamaño promedio de las partículas (n=25).

2.4.3 Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier

El análisis de los grupos químicos presentes en las ECV-NPLs y NPLs se llevó a cabo mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés). Para ello se empleó 1 mg de ambas formulaciones previamente liofilizadas durante 24 h en un liofilizador FreeZone 1 (Labconco, EUA), y se leyeron en un espectrofotómetro Agilent Cary 630 (Agilent Technologies, EUA). Asimismo, se analizaron muestras de PLGA, HSPC y ECV por separado para comparar las señales de grupos químicos con los de las ECV-NPLs.

2.4.4 Eficiencia de encapsulación

Para determinar la cantidad de ECV encapsulado en el sistema de NPLs se empleó el método directo propuesto por Pereira et al., 2018 con algunas modificaciones. Inicialmente, se sintetizaron tres lotes de ECV-NPLs, los cuales fueron liofilizados durante 24 horas en un liofilizador FreeZone 1 (Labconco, EUA). Posteriormente, se añadió metanol al 95% a cada lote y se sometieron a agitación vigorosa por vórtex para desintegrar la estructura de las nanopartículas. Luego, las muestras se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente, protegidas de la luz. Finalmente, el ECV encapsulado fue detectado a 324 nm utilizando un lector de placas Epoch. Esta longitud de onda corresponde a la absorbancia típica de los ACGs (Moussa et al., 2023), uno de los compuestos principales del ECV; dicha información fue verificada leyendo la absorbancia del ECV suspendido en agua entre 300 y 600 nm en un espectrofotómetro UV-Vis Cary 60 (Agilent Technologies, EUA) (Anexo A - Figura 28A). La cantidad de compuesto encapsulado se determinó utilizando una curva estándar de ECV (Anexo A - Figura 28B) y la eficiencia de encapsulación (EE%) se calculó mediante la siguiente ecuación (4):

$$\text{Eficiencia de Encapsulación (\%)} = \left(\frac{Me}{Mt} \right) \times 100 \quad (4)$$

donde: Mt son los μg de ECV utilizados para la síntesis de ECV-NPLs y Me son los μg de ECV detectados a 324 nm.

2.4.5 Ensayo de liberación del ECV de las NPLs

El perfil de liberación de las ECV-NPLs fue evaluado utilizando la técnica de diálisis, la cual se llevó a cabo con un kit de mini diálisis de 8 kDa de MWCO (Cytiva, EUA; 80648432). Para este propósito, las ECV-NPLs recién sintetizadas fueron cuidadosamente recuperadas y colocadas dentro de una membrana de diálisis de 8 kDa en 1 mL de PBS 1X (pH 7.4), asegurando una adecuada dispersión del material. La solución externa de liberación consistió en 6 mL del mismo buffer.

El ensayo de liberación se llevó a cabo en un incubador con agitación constante a 37 °C y 120 RPM, condiciones que emulan el entorno fisiológico para proporcionar un modelo más realista de liberación controlada. A intervalos específicos, desde 1 hasta 72 horas, se tomaron muestras de la solución de liberación para cuantificar la cantidad de ECV liberado, el volumen de muestra (0.6 mL) fue reemplazado

por el mismo volumen de PBS 1X para mantener un volumen constante en la solución de liberación. La cuantificación se realizó utilizando el mismo método de detección espectrofotométrica detallado en la sección 2.4.4, asegurando la consistencia en la medición de la concentración de ECV.

Los datos obtenidos se utilizaron para construir la curva de liberación del ECV desde las nanopartículas, empleando la ecuación (5) propuesta por Moghaddam et al., 2022, para determinar la masa de ECV en la solución de liberación en cada tiempo de muestreo, luego se calculó la liberación acumulada de ECV con base en la cantidad de ECV encapsulado según los resultados de la sección 2.4.4 (6):

$$Mn (\mu g) = ((C_n)(V_t)) + \left(\sum (C_{n-1}) (V_m) \right) \quad (5)$$

donde: Mn son los μg de ECV detectados en la solución de liberación al tiempo "n"; C_n es la concentración en $\mu g/mL$ de ECV detectada en la solución de liberación al tiempo "n"; V_t es el volumen en mL de la solución de liberación; C_{n-1} es la concentración en $\mu g/mL$ de ECV antes del tiempo "n" y V_m es el volumen en mL de la muestra.

$$Liberación\ acumulada\ (\%) = \left(\frac{Mn}{Me} \right) \times 100 \quad (6)$$

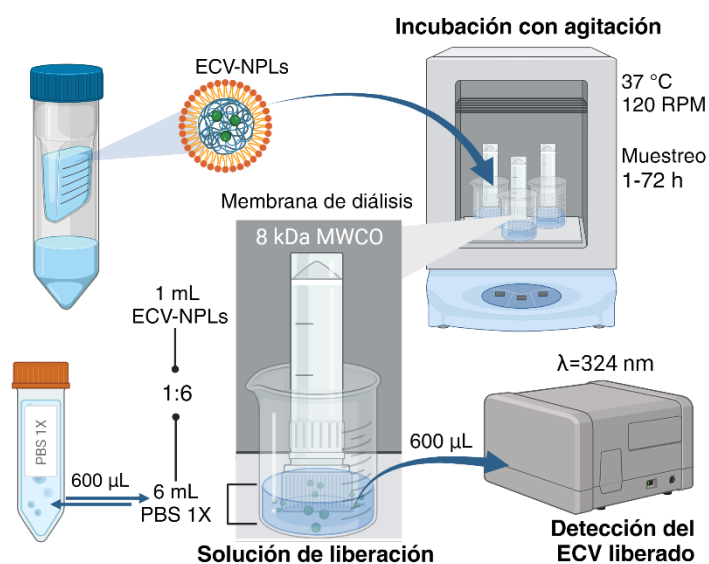


Figura 14. Ensayo de liberación de las ECV-NPLs por diálisis. ECV: Extracto de café verde. ECV-NPLs: Nanopartículas cargadas con ECV. MWCO: Límite de peso molecular. PBS: Buffer fosfato salino.

2.5 Cultivo celular

2.5.1 Cultivo de fibroblastos de ratón (L929) y humanos (CCD-112Sk)

Con el fin de realizar pruebas preliminares de viabilidad celular, se utilizaron fibroblastos de tejido conectivo de ratón L929 (American Type Culture Collection, EUA; CCL-1) y fibroblastos dérmicos de prepucio de neonato humano CCD -112Sk (American Type Culture Collection, EUA; CRL-2429). Ambas líneas celulares se cultivaron en Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) (Corning Incorporated, EUA; 10-013-CV) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) (Gibco, EUA; 26140-079) y 1 % de antibiótico/antimicótico (A/A) (Gibco, EUA; 15140-122). Las células se mantuvieron en cultivo en placas de 100 mm a 37 °C y 5% CO₂, el medio de cultivo se reemplazó cada 48 h hasta que alcanzaran una confluencia del 70-80%. Una vez alcanzada esta confluencia, las células fueron desprendidas utilizando tripsina 0.25%-EDTA 1X (Gibco, EUA; 25200056), luego, fueron contadas manualmente utilizando un hematocitómetro y un microscopio invertido EVOS XL (Invitrogen, EUA) a 20X para utilizarse en los ensayos correspondientes.

2.5.2 Cultivo de células hepáticas humanas (HepG2 y HHSC-N)

Para establecer los modelos de esteatosis y fibrosis hepáticas, se utilizaron hepatocitos humanos de carcinoma hepatocelular HepG2 (Addexbio Technologies, EUA; C0015002) y células estrelladas hepáticas activas provenientes de un paciente con MASH (HHSC-N) (iX Cells Biotechnologies, EUA; 10HU-210N). Los HepG2 fueron activados en medio mínimo esencial de Eagle (EMEM, por sus siglas en inglés) (Addexbio Technologies, EUA; C0005-01) y posteriormente se adaptaron de forma gradual a DMEM alto en glucosa (4.5 g/L) (Gibco, EUA; 10569010), ambos suplementados con 10% SFB y 1% A/A. Por otro lado, las HHSC-N fueron activadas y cultivadas en DMEM con 10% SFB y 1% A/A. Las células se mantuvieron en cultivo en placas de 100 mm a 37 °C y 5% CO₂, el medio de cultivo se reemplazó cada 48 h hasta que alcanzaran una confluencia del 70-80%. Una vez alcanzada esta confluencia, las células fueron desprendidas utilizando tripsina 0.25%-EDTA 1X, luego, fueron contadas manualmente utilizando un hematocitómetro y un microscopio invertido EVOS XL a 20X para utilizarse en los ensayos correspondientes. Las células HepG2 se utilizaron entre los pases 14 y 22, mientras que las HHSC-N no se emplearon más allá del pase 7 (por recomendación del proveedor).

2.6 Estudios de viabilidad celular

2.6.1 Ensayos de viabilidad celular en L929 y CCD-1112Sk

La viabilidad celular se evaluó preliminarmente en las líneas celulares L929 y CCD-1112Sk para encontrar una concentración de trabajo biocompatible de ECV. Ambas líneas celulares fueron tratadas con 10, 100 y 1000 µg/mL de ECV por 24 h y el porcentaje de viabilidad celular se cuantificó mediante el ensayo colorimétrico de bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazo (MTT) (Sigma-Aldrich, EUA; M5655), el cual se basa en la conversión de la sal de tetrazolio MTT en cristales de formazán por parte de las células vivas, lo que determina la actividad mitocondrial. Dado que, para la mayoría de las poblaciones de células, la actividad mitocondrial total está relacionada con el número de células viables, este ensayo se usa ampliamente para medir los efectos citotóxicos *in vitro* de fármacos y nuevas terapias (van Meerloo et al., 2011). Para ello, se utilizaron los L929 y CCD-1112Sk previamente cultivados y se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 7.5×10^3 células por pozo (cel/pozo) en DMEM, luego se dejaron adherir por 24 h en incubación a 37 °C y 5% CO₂ y se retiró el medio para agregar medio nuevo con ECV a concentraciones de 10, 100 y 1000 µg/mL. El ECV se preparó en PBS 1X a 10 mg/mL y se añadió el volumen necesario al DMEM para alcanzar la concentración requerida. El control fue adicionado con el volumen de PBS 1X utilizado para preparar la concentración más alta de ECV (1000 µg/mL). Las células se dejaron en incubación por 24 h con los tratamientos a 37 °C y 5% CO₂. Una vez transcurridas las 24 h, se retiró el medio y se lavaron todos los pozos con PBS 1X para retirar cualquier remanente de ECV y residuos celulares. Después, se agregaron 90 µL de DMEM seguidos de 10 µL de solución de MTT (5 mg/mL) a todos los pozos y se incubó la placa por 4 h a 37 °C, 5 % CO₂. Luego, se agregaron 100 µL de ácido clorhídrico (HCl) 0.01 M con dodecilsulfato sódico (SDS) al 10 % como buffer de lisis y para solubilizar los cristales de formazán y se dejó en incubación a 37 °C por 18 h para finalmente leer la absorbancia de la placa a 570 nm en un lector de placas Epoch. El porcentaje de viabilidad celular se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$Viabilidad\ celular\ (\%) = \frac{DO_{muestra}}{DO_{control}} \times 100 \quad (7)$$

donde: DO_{muestra} es el valor de absorbancia de los pozos con células tratadas posterior a la incubación con HCl/SDS. DO_{control} corresponde a la absorbancia de los pozos con células sin tratamiento.

2.6.2 Ensayos de viabilidad celular en HepG2 y HHSC-N

La viabilidad celular de las líneas celulares HepG2 y HHSC-N tratadas con ECV (100 µg/mL), ECV-NPLs (equivalente a 100 µg/mL de ECV) y NPLs (equivalente a la cantidad de ECV-NPLs), se evaluó después de 48 h de tratamientos con las formulaciones previamente mencionadas. Para el caso de HepG2, se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo de MTT de la sección 2.6.1, pero con algunas modificaciones que se detallan a continuación: Se sembraron 2×10^4 cel/pozo en una placa de 96 pozos utilizando como medio DMEM alto en glucosa, luego, los HepG2 se dejaron adherir a la placa por 24 h a 37 °C y 5% CO₂ y posteriormente se retiró el medio para agregar medio nuevo con las concentraciones correspondientes de ECV, ECV-NPLs y NPLs. Luego de 48 h, se retiró el medio de cultivo y se lavó cada pozo con 100 µL de PBS 1X y se añadieron 90 µL de DMEM con 10 µL de MTT a 5 mg/mL y se incubó la placa por 4 h a 37 °C, 5 % CO₂. Después, se agregaron 100 µL HCl 0.01 M con SDS al 10 % y se dejó incubando la placa a 37 °C por 18 h para finalmente leer la absorbancia de la placa a 570 nm en un lector de placas Epoch. El porcentaje de viabilidad celular se calculó utilizando la ecuación (7).

Por otra parte, la viabilidad celular de las HHSC-N se evaluó mediante el método de exclusión de azul tripano (Gibco, EUA; 15250061); para ello, en una placa de 6 pozos se sembró una densidad inicial de 2.5×10^5 cel/pozo, las HHSC-N se dejaron 24 h en incubación a 37 °C y 5% CO₂ y posteriormente se retiró el medio para agregar DMEM completo con los tratamientos de ECV, ECV-NPLs y NPLs; consecuentemente, se dejaron 48 h en incubación bajo las mismas condiciones. Transcurrido este periodo de incubación con los tratamientos, las células fueron desprendidas de la placa de 6 pozos utilizando tripsina 0.25%-EDTA 1X y se mezclaron 20 µL de solución de células con 20 µL de solución de azul tripano 0.4% m/v, luego, fueron contadas manualmente utilizando un hematocitómetro y un microscopio invertido EVOS XL a 20X. Los resultados se expresaron en número de células/mL y se compararon con el número de células inicialmente sembradas (0 h) para determinar el número de células viables posterior a los tratamientos.

2.7 Inducción de esteatosis en HepG2

2.7.1 Conjugación de ácidos grasos libres

Para inducir condiciones de esteatosis en los hepatocitos HepG2, las células se expusieron a una mezcla de ácidos grasos libres, compuesta por ácido oleico (AO) (Sigma-Aldrich, EUA; O1008) y ácido palmítico

(AP) (MedChemExpress, EUA; HY-N0830). Estos ácidos grasos se conjugaron con albúmina de suero bovino (BSA) libre de ácidos grasos (MP Biomedicals, EUA; 152401) en una proporción molar 2:1 de AO:AP, siguiendo el protocolo de Knight et al., 2021. Brevemente, el AO y el AP se disolvieron en etanol absoluto grado biología molecular a concentraciones de 500 mM y 250 mM, respectivamente. A partir de estas soluciones, se preparó un stock de 7.5 mM (5 mM AO, 2.5 mM AP) en medio DMEM (con 10% de SFB y 1% de A/A), adicionado con un 10% de BSA libre de ácidos grasos. La conjugación se realizó incubando esta mezcla de BSA y ácidos grasos a 37 °C durante 1 hora. Tras la incubación, la solución fue filtrada mediante un filtro de jeringa de 0.22 µm y almacenada a -20 °C, protegida de la luz, para su uso en experimentos futuros con células HepG2.

2.7.2 Cultivo de HepG2 con ácidos grasos libres

Para promover la acumulación de TGs en los HepG2, estos fueron cultivados en presencia de AGs libres previamente conjugados con BSA a una proporción molar de 2:1. Los HepG2 fueron incubados por 24 h con concentraciones de 0.1 a 1 mM de la mezcla de AO:AP utilizando como medio de cultivo DMEM (con 10% SFB y 1% A/A) adicionado con 1% de BSA (Ricchi et al., 2009). Una vez cumplidas las 24 h de incubación, se llevó a cabo el ensayo MTT como se describió previamente en la sección 2.6.2, para determinar el efecto de los tratamientos con la mezcla de AO:AP en la viabilidad celular de los HepG2. La esteatosis en HepG2 se confirmó mediante la sobreexpresión de los genes asociados a esteatosis detallados en la sección 2.8.

2.8 Análisis de expresión de genes mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

Con el fin de estudiar el efecto de las ECV-NPLs en la expresión de genes asociados a esteatosis y fibrosis hepática, se realizó el tratamiento de los HepG2 esteatósicos y las HHSC-N con ECV (100 µg/mL), ECV-NPLs (equivalente a 100 µg/mL de ECV) y NPLs (equivalente a la cantidad de ECV-NPLs) durante 48 h, para extraer el ácido ribonucleico (ARN) y cuantificar la expresión de genes profibróticos.

Las HepG2 y HHSC-N fueron sembradas en placas de 6 pozos a una densidad celular de 4×10^5 y 2.5×10^6 cel/pozo, respectivamente. Para el caso de las HepG2, se indujeron las condiciones de esteatosis con el método previamente descrito en la sección 2.7 de este documento. Una vez completados los tratamientos

con ECV, ECV-NPLs y NPLs, el ARN se extrajo de ambas líneas celulares utilizando el kit PureLink™ RNA Mini (Invitrogen, EUA, 12183018A), siguiendo las indicaciones de proveedor. La pureza y concentración de ARN extraído se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA), así como su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (m/v) a 80 V durante 40 min. El ARN resultante se suspendió en agua libre de RNasas y se almacenó a -20 °C para futuros experimentos.

La expresión de genes relacionados con la esteatosis y fibrosis se evaluó mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), utilizando ARN extraído de células HepG2 y HHSC-N. La cuantificación de la expresión génica se realizó en un sistema de PCR en tiempo real 7500 (Applied Biosystems, EUA) empleando el kit GoTaq® 1-Step RT-qPCR System (Promega, EUA; A6020). Los oligonucleótidos sentido (F) y antisentido (R) se diseñaron con base en la literatura y se validaron con el software SnapGene (GSL Biotech LLC, EUA), posteriormente fueron adquiridos de la empresa T4 OLIGO (México). Para cada reacción, los oligonucleótidos se ajustaron a 50 nM para HepG2 y 100 nM para HHSC-N, mientras que la cantidad de ARN se estableció en 20 ng para HepG2 y 100 ng para HHSC-N. La normalización de los datos se realizó usando GAPDH como control endógeno en HepG2 y HPRT1 en HHSC-N, y la expresión relativa de los genes se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (García-Topete et al., 2024; Taylor et al., 2019).

Se cuantificó la expresión de los genes carnitina palmitoiltransferasa I (CPT1A), factor de necrosis tumoral alfa (TNFa), perilipina 1 (PLIN1), y como gen endógeno, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en HepG2; mientras que en las células HHSC-N se analizaron los genes actina alfa 2 de músculo liso (ACTA2), cadena alfa 1 del colágeno tipo I (COL1A1), receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRB), factor de crecimiento transformante beta 1 (TGFB1), y como gen endógeno, hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (HPRT1). En la Tabla 1 se encuentra la información sobre la secuencia de los oligonucleótidos.

Tabla 1. Oligonucleótidos de los genes evaluados en HepG2 y HHSC-N.

	Gen	ID	F (5' 3')	R (5' 3')
HepG2	CPT1A	NM_001876.4	GATCCTGGACAATACCTCGGAG	CTCCACAGCATCAAGAGACTGC
	TNFa	NM_000594.4	CTCTTCTGCCTGCTGCACTTTG	ATGGGCTACAGGCTTGTCACTC
	PLIN1	NM_002666.5	GCGGAATTTGCTGCCAACACTC	AGACTTCTGGGCTTGTGGTGT
	GAPDH	NM_002046.7	GCATCTTCTTGTGCAGTGCC	GAGAAGGCAGCCCTGGTAAC
HHSC-N	ACTA2	NM_001613.4	CTGTTCCAGCCATCCTTCAT	TCATGATGCTGTTGTAGGTGGT
	COL1A1	NM_000088.4	GCCTCAAGGTATTGCTGGAC	ACCTGTTT GCCAGGTTACAC
	PDGFRB	NM_002609.4	GCCCTTATGTCCGAGCTGAAGA	GTTGCGGTGCAGGTAGTCCA
	TGFB1	NM_000660.7	CACTCCCTCTCTCCCTCT	AGTGCCCAAGGTGCTCAATA
	HPRT1	NM_000194.3	TGGTCAGGCAGTATAATCCAAAGA	TTCAAATCCAACAAAGTCTGGCT

2.9 Análisis estadístico

Los datos fueron procesados utilizando el software GraphPad Prism, versión 9.4.1 (Dotmatics, Reino Unido). Se empleó análisis de varianza (ANOVA) unidireccional o bidireccional con pruebas de comparación múltiple de Tukey o Dunnett para evaluar los resultados. Las barras verticales en los gráficos representan la desviación estándar (SD) o el error estándar de la media (SEM). Todos los ensayos se realizaron por triplicado ($n=3$). Se consideraron estadísticamente significativas las diferencias con $p<0.05$, siendo los niveles de significancia representados de la siguiente manera: no significativo (ns), $p<0.05$ (*), $p<0.01$ (**), $p<0.001$ (***) y $p<0.0001$ (****).

Capítulo 3. Resultados y discusión

3.1 Caracterización del extracto de café verde

3.1.1 Contenido fenólico total y actividad antioxidante del ECV

Para determinar el contenido fenólico total y la actividad antioxidante del ECV, se utilizaron los ensayos colorimétricos de Folin-Ciocalteu y de inhibición de DPPH*, respectivamente. El ECV presentó un contenido fenólico total de 180.51 ± 30.26 mgEAG/g y una actividad antioxidante de 30.86 ± 4.3 μ M de EAC, lo que equivale a una inhibición del 40% de DPPH*. Estos resultados son consistentes con estudios previos en extractos de granos de café Robusta (Pergolizzi et al., 2020; Suryanti et al., 2023), donde se ha demostrado que la actividad antioxidante está estrechamente relacionada con el contenido de fenoles. En particular, la especie Robusta ha mostrado tener niveles más altos de estas propiedades (Asy'Ari Hasbullah & Rini Umiyati, 2021; Jeszka-Skowron et al., 2016), lo que respalda su selección como fuente de compuestos fitoquímicos para la obtención del ECV.

3.2 Síntesis y caracterización de nanopartículas híbridas polímero-lípido

3.2.1 Tamaño promedio, morfología y potencial Zeta

Las formulaciones híbridas de polímero-lípido combinan las ventajas estructurales de los polímeros con las propiedades de los lípidos, mejorando la administración de fármacos, ya que ofrecen una liberación controlada, solubilidad mejorada y reducen la toxicidad (Ghitman et al., 2020). Nuestro sistema de encapsulación consistió en nanopartículas híbridas (NPLs) obtenidas mediante nanoprecipitación combinada con autoensamblaje. Como se muestra en la figura Figura 15, se obtuvieron suspensiones de aspecto lechoso, sin variaciones visibles entre ellas. Estas nanopartículas presentan un núcleo de PLGA que incorpora el ECV y una cubierta lipídica de HSPC, la cual mejoraría la estabilidad y reduciría la degradación de las nanopartículas (Mandal et al., 2013). Las dos formulaciones fueron caracterizadas para

conocer su tamaño, morfología, carga superficial, grupos químicos y eficiencia de encapsulación, como se describió en la sección 2.4.

El efecto de la incorporación del ECV en el tamaño y potencial zeta de las ECV-NPLs se estudió mediante las técnicas de DLS y TEM. La incorporación del ECV provocó una reducción tanto en el diámetro hidrodinámico como en el PDI del sistema de nanopartículas. Los resultados indicaron una reducción del diámetro hidrodinámico de aproximadamente un 20% tras la incorporación del ECV, y un PDI de 0.291 ± 0.016 en las ECV-NPLs (Tabla 2). Tanto el tamaño de las nanopartículas como el PDI son parámetros clave en la administración de fármacos, ya que un PDI inferior a 0.3 y tamaños entre 10 y 200 nm mejoraran la eficacia y estabilidad del sistema de entrega (Abdelghany et al., 2019; Hickey et al., 2015; Wan et al., 2018). La disminución del tamaño en las ECV-NPLs podría estar relacionada con la interacción entre el extracto y el polímero, influenciada por factores como la hidrofobicidad, la carga y el peso molecular del polímero, así como la compactación de la matriz polimérica, los cuales afectan en conjunto las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas, como el tamaño y la polidispersidad (Rosiuk et al., 2019; Tahir et al., 2019; Teng et al., 2013)

Tabla 2. Diámetro hidrodinámico e índice de polidispersidad (PDI) de las nanopartículas cargadas con extracto de café verde y vacías, ambas suspendidas en PBS 1X (pH 7.4).

Formulación	Diámetro hidrodinámico (nm)	PDI
ECV-NPLs	191.5 ± 3.6	0.291 ± 0.016
NPLs	218.2 ± 8.0	0.394 ± 0.021

La formación y el tamaño de las nanopartículas se confirmó mediante TEM. Tanto las ECV-NPLs como las NPLs mostraron una forma esférica con una estructura tipo núcleo-coraza, en la que se distinguen dos fases claramente diferenciadas: un núcleo bien contrastado correspondiente al PLGA, y una capa fina de menor contraste que rodea el núcleo, atribuida a la HSPC (Ismail et al., 2024; Shi et al., 2014). El estudio de las imágenes de TEM mostró que las ECV-NPLs fueron más pequeñas que las NPLs, con valores de 145.4 ± 26 nm para las ECV-NPLs y de 179 ± 36.7 nm para las NPLs, lo que corrobora los resultados de diámetro hidrodinámico obtenidos por DLS. El análisis del potencial zeta mostró valores muy similares entre ambas formulaciones de nanopartículas, sin diferencias estadísticamente significativas. Los resultados obtenidos son consistentes con los valores previamente reportados para NPLs recubiertas con HSPC, reflejando la naturaleza aniónica de dicho recubrimiento lipídico (Ahmaditabar et al., 2017; Yang et al., 2017).

En la administración de fármacos, la carga superficial de los vehículos de entrega es un factor clave para determinar su eficacia y seguridad. Se prefiere una carga casi neutra (entre -10 mV y +10 mV) para la administración sistémica, ya que influye en la interacción con los sistemas biológicos, las tasas de eliminación y la eficacia general del tratamiento (Dilliard et al., 2021; Martin et al., 2015; Xu et al., 2022). Asimismo, las nanopartículas con carga negativa son más seguras para aplicaciones *in vivo*, ya que presentan menor citotoxicidad y actividad hemolítica en comparación con las cargadas positivamente debido a su interacción con la membrana celular. Además, su biodistribución es ventajosa para terapias dirigidas al hígado, pues tienden a acumularse en este órgano, mientras que las nanopartículas con carga positiva son excretadas rápidamente a través del sistema hepatobiliar (Hirn et al., 2011; Xie et al., 2014).

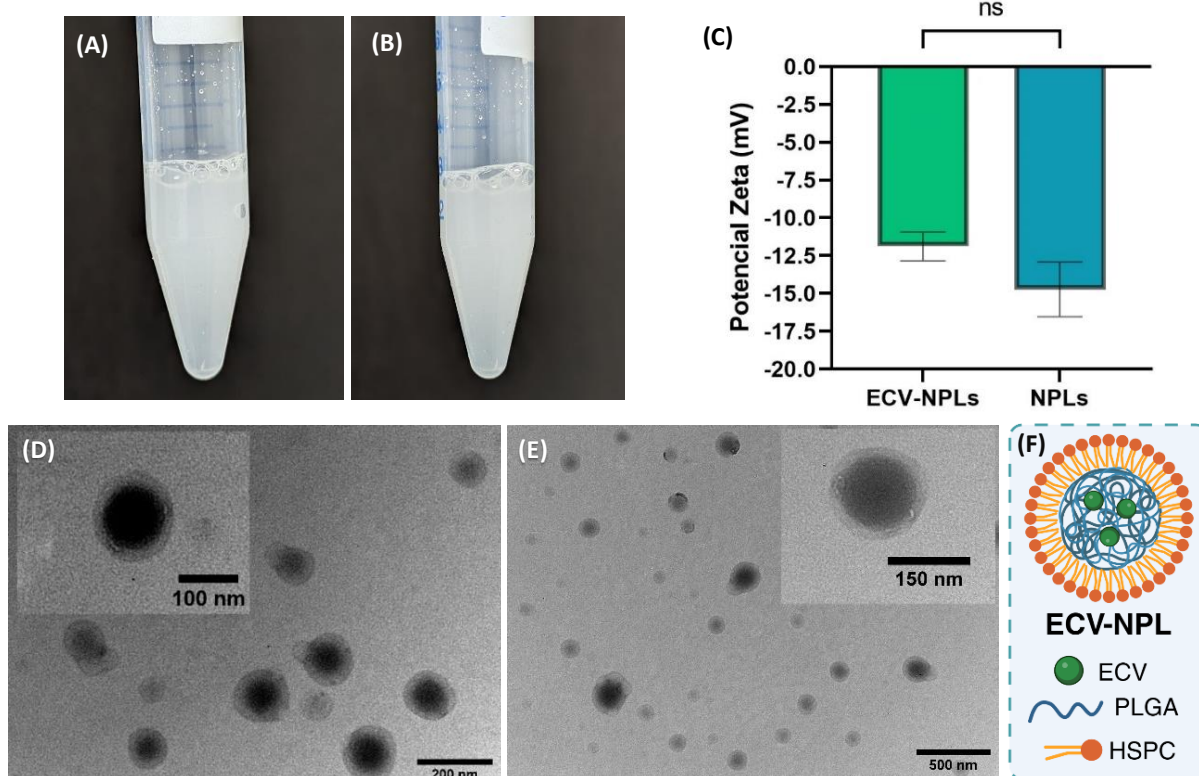


Figura 15. Potencial Zeta, diseño propuesto y morfología de las ECV-NPLs y NPLs. (A) ECV-NPLs y (B) NPLs recién sintetizadas. (C) Valores de potencial zeta de ECV-NPLs y NPLs. Las micrografías obtenidas por TEM muestran una morfología esférica con un núcleo de polímero bien contrastado y una corona lipídica que rodea el núcleo de las ECV-NPLs a 40kx (D) y de las NPLs a 15kx (E). El tamaño determinado a partir de las imágenes de TEM para las ECV-NPLs y NPLs fue de 145.4 ± 26 y 179 ± 36.7 nm respectivamente. La estructura observada es consistente con el diseño propuesto para las ECV-NPLs (F). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media ($n=3$). Datos analizados estadísticamente mediante análisis *t* de Student de dos colas con $p < 0.05$. Los niveles de significancia están dados como ns (no significativo). ECV-NPLs: Nanopartículas cargadas con ECV. NPLs: Nanopartículas vacías. PLGA: Ácido poli-láctico co-glicólico. HSPC: Lecitina de soya.

3.2.2 Grupos funcionales de las nanopartículas

Los grupos funcionales presentes en las ECV-NPLs y NPLs se estudiaron mediante la técnica de FTIR. En la Figura 16 se muestran las señales características de ambas formulaciones, así como de los materiales utilizados para su elaboración (HSPC, PLGA y ECV).

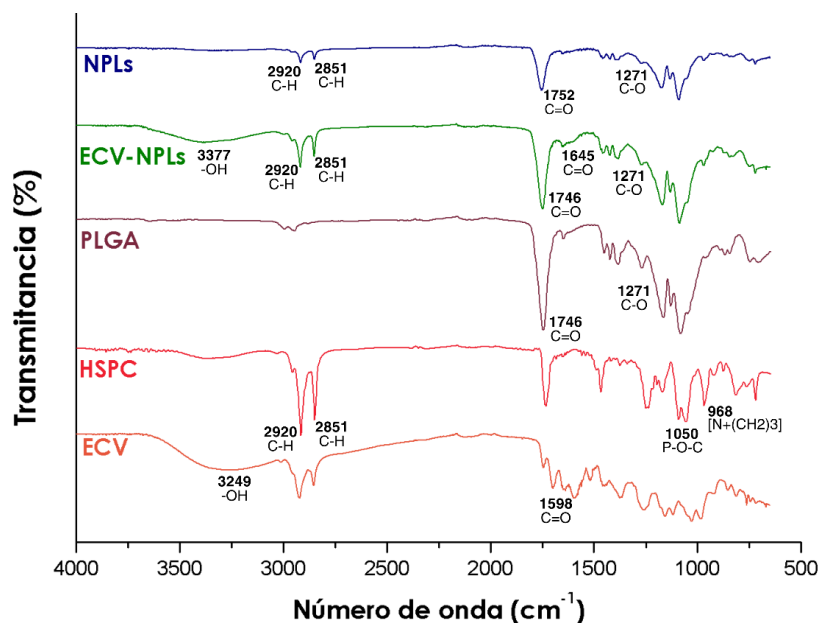


Figura 16. Espectros FTIR de las formulaciones de nanopartículas y los materiales utilizados en la síntesis. NPLs: Nanopartículas vacías. ECV-NPLs: Nanopartículas cargadas con ECV. PLGA: Ácido poli-láctico, co-glicólico. HSPC: Lecitina de soja. ECV: Extracto de café verde.

El PLGA presentó dos picos característicos a 1746 y 1271 cm^{-1} , correspondientes al C=O del éster y al estiramiento C-O, respectivamente (Gaspar et al., 2018; Kumar et al., 2015). Estos picos también se observaron en los espectros de ECV-NPLs y NPLs, confirmando la presencia de PLGA en la composición de las nanopartículas. Por su parte, la HSPC mostró dos picos bien definidos a 2920 y 2851 cm^{-1} , asociados a los estiramientos del enlace C-H de las cadenas hidrofóbicas del fosfolípido, los cuales también son visibles en los espectros de ECV-NPLs y NPLs. Además, se detectaron las señales típicas del enlace P-O-C y la fracción de colina $[-\text{N}^+(\text{CH}_2)_3]$ de la HSPC a 1050 y 968 cm^{-1} , respectivamente (Biswas et al., 2021; Leimann et al., 2015). El ECV mostró dos picos a 3249 y 1598 cm^{-1} que hacen referencia a los grupos funcionales C=O y -OH asociados a los compuestos fenólicos y otros compuestos fitoquímicos del extracto (Masek et al., 2020; Topala & Tataru, 2015). Estas señales exhibieron un desplazamiento en las ECV-NPLs (3377 y 1645 cm^{-1}), lo que sugiere la posible adsorción de algunos de estos compuestos en la superficie de las

nanopartículas. Sin embargo, la ausencia de otras señales características del ECV y la intensidad predominante de las señales del PLGA y HSPC en las ECV-NPLs indican una encapsulación exitosa del ECV (Abosabaa et al., 2021; Garcia-Solis et al., 2022; Kesente et al., 2017).

3.2.3 Eficiencia de encapsulación y perfil de liberación

La eficiencia de encapsulación de las ECV-NPLs determinada mediante método directo fue de 55.08 ± 2.86 % relacionada a la detección espectroscópica de los ACGs del ECV a 324 nm. Además, la liberación del ECV encapsulado en el sistema de nanopartículas monitoreada durante 72 horas (Figura 17), mostró una liberación inicial rápida en las primeras 6 horas (~85%), seguida de una liberación sostenida que se mantuvo hasta las 24 horas, momento en el cual se alcanzó la liberación completa del ECV encapsulado. Posteriormente, a partir de las 36 horas, se observó una disminución en la acumulación de ECV en la solución de liberación.

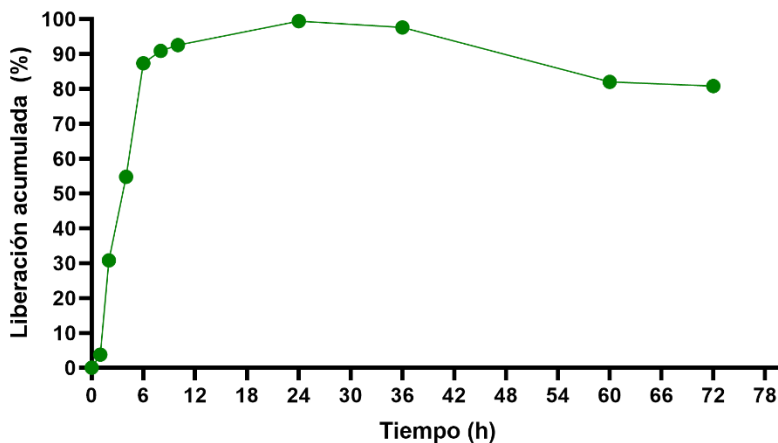


Figura 17. Liberación acumulada del ECV de las NPLs. La liberación del extracto fue cuantificada mediante diálisis durante 72 h a pH 7.4, 37 °C y 120 RPM. El ECV fue liberado por completo en un periodo de 24 h.

El valor obtenido de EE% es menor al reportado por otros autores utilizando sistemas de encapsulación diferentes al nuestro (Desai et al., 2020; Moussa et al., 2023). Esta EE% podría relacionarse con la hidrofobicidad del ECV y el polímero utilizado para su encapsulación (PLGA 50:50). Estos factores están interrelacionados, ya que estudios previos han demostrado que los extractos predominantemente hidrofílicos logran mayores EE% con PLGA 50:50, mientras que los extractos más hidrofóbicos, como el ECV, suelen presentar una menor EE% con este polímero. El uso de PLGA 65:35 podría incrementar el la

EE%, ya que se ha informado que esta proporción favorece la encapsulación de compuestos con propiedades hidrofóbicas, como el ECV (Oseni et al., 2021; Pereira et al., 2018).

La liberación inicial en forma de estallido observada en las ECV-NPLs podría estar relacionada con la presencia de compuestos fitoquímicos del ECV cercanos a la superficie de las nanopartículas. Estos compuestos, debido a los mecanismos de degradación de las nanopartículas, tienden a difundirse rápidamente hacia la solución de liberación (Mandal et al., 2016; Moussa et al., 2023). Nuestro método de detección se basa en la medición de ACGs presentes en el ECV, los cuales tienen un coeficiente de partición ($\log P$) de 1.42 (Scherbl et al., 2014), lo que los convierte en moléculas moderadamente hidrofílicas. Esta característica facilita su distribución en medios acuosos como el PBS, lo que a su vez promueve su difusión a través de las NPLs y contribuye a la liberación inicial rápida observada en nuestro sistema. Por último, la disminución en el contenido de ECV después de las 36 horas de monitoreo en la solución de liberación sugiere una posible degradación de los ACGs (Pereira et al., 2018).

3.3 Estudios de viabilidad celular en L929 y CCD-1112Sk

Después de 24 horas de incubación con 10, 100 y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ECV, los fibroblastos L929 mostraron una viabilidad celular mayor al 80%, cumpliendo con los criterios establecidos por la norma ISO 10993-5 (mayor al 70%) (International Organization for Standardization, 2009), para considerar que el tratamiento no es citotóxico. Este resultado indica que el ECV no afecta de manera adversa la viabilidad celular de los fibroblastos en las concentraciones probadas. No obstante, en el caso de la línea celular CCD-1112Sk, la concentración más alta evaluada (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) resultó ser tóxica, con una disminución significativa en la viabilidad celular, que alcanzó un $58.02 \pm 5.03 \%$ (Figura 18), por esta razón, se seleccionó la concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ECV para los ensayos posteriores en los modelos de fibrosis y esteatosis hepáticas.

Este comportamiento podría estar relacionado con la sensibilidad diferencial de esta línea celular a compuestos bioactivos presentes en el ECV, o bien con una sobreexposición a los polifenoles y otros componentes del extracto en concentraciones elevadas. Debido a esta citotoxicidad observada en CCD-1112Sk, se seleccionó una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ECV como la dosis óptima para llevar a cabo los ensayos posteriores en los modelos *in vitro* de fibrosis y esteatosis hepática, ya que en esa concentración no se observaron efectos adversos significativos sobre la viabilidad celular.

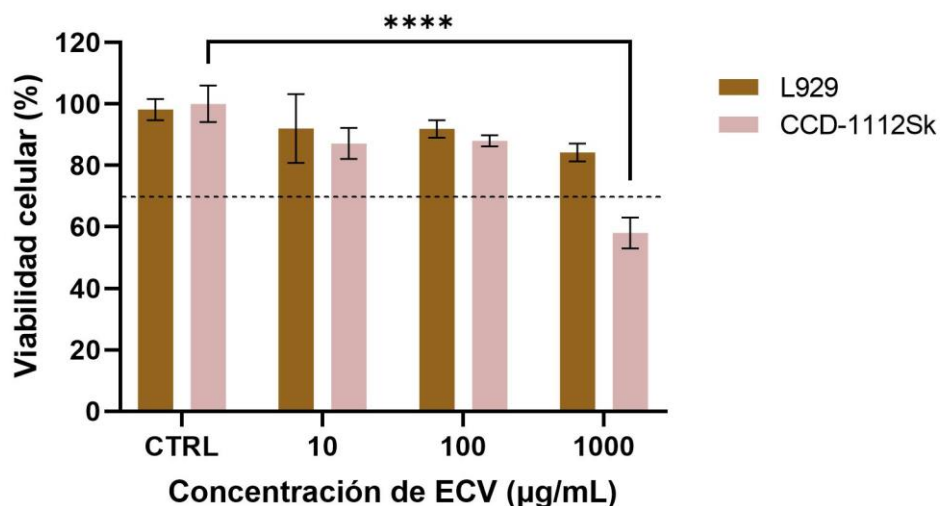


Figura 18. Viabilidad celular de fibroblastos L929 y fibroblastos CCD-112Sk tratados con diferentes concentraciones de ECV por 24 h. El ECV exhibió un efecto citotóxico en CCD-112Sk a 1000 µg/mL. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3). La línea punteada hace referencia al límite de viabilidad celular indicado para muestras no citotóxicas según la ISO 10993-5. Datos analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía utilizando el análisis a posteriori de Tukey con $p < 0.05$. Los niveles de significancia están dados como **** ($p < 0.0001$). CTRL: Células sin tratamiento. ECV: Extracto de café verde.

3.4 Modelo *in vitro* de esteatosis y fibrosis hepáticas

3.4.1 Establecimiento de las condiciones de esteatosis en HepG2

Para inducir condiciones de esteatosis en el cultivo de HepG2, las células fueron tratadas durante 24 horas con una mezcla de ácido oleico (AO) y ácido palmítico (AP) en una proporción molar de 2:1. La concentración óptima de la mezcla de ácidos grasos se determinó en concentraciones de AO y AP de entre 0.1 y 1 mM. Los resultados del ensayo MTT mostraron que ninguna de las concentraciones fue citotóxica para las HepG2 tras 24 horas de incubación, y no se observaron diferencias significativas en viabilidad celular entre las distintas concentraciones probadas (Figura 19).

La respuesta citocompatible de los tratamientos con AO:AP, podría deberse al efecto protector que tiene el AO en los hepatocitos, en contraste al AP, que ha demostrado inducir lipotoxicidad mediada por el estrés del RE y mecanismos de muerte celular como la piroptosis en condiciones esteatóticas *in vitro*. La proporción de AO dos veces mayor respecto al AP, favorece la viabilidad celular a las 24 h de incubación con la mezcla AO:AP (X. Zeng et al., 2020; M. Zhang et al., 2023).

En modelos previos, se ha estudiado el papel del AO y AP en la acumulación de lípidos en el hígado y en el daño hepático asociado, ya que ambos son abundantes en dietas típicas. Estos ácidos grasos se han utilizado en modelos experimentales de esteatosis hepática debido a su capacidad para inducir la acumulación de TGs dentro de los hepatocitos, simulando las condiciones observadas en pacientes con enfermedades hepáticas metabólicas (Müller & Sturla, 2019; S. Sharma et al., 2011). Para inducir esteatosis en hepatocitos *in vitro*, se han establecido concentraciones ≥ 1 mM de AO:AP, la cuales reflejan los niveles elevados de ácidos grasos libres en el plasma sanguíneo de pacientes con MASH. Esta concentración ha demostrado ser eficaz en la inducción de un ambiente esteatótico sin comprometer la viabilidad celular (Egnatchik et al., 2014; Giraudi et al., 2015; Moravcová et al., 2015). En nuestro trabajo, esta concentración fue seleccionada para tratar el cultivo de células HepG2, estableciendo un modelo de esteatosis *in vitro*. La inducción de la esteatosis se confirmó mediante la sobreexpresión de genes relacionados con el almacenamiento de lípidos, lo que valida el modelo como representativo de la condición hepática patológica.

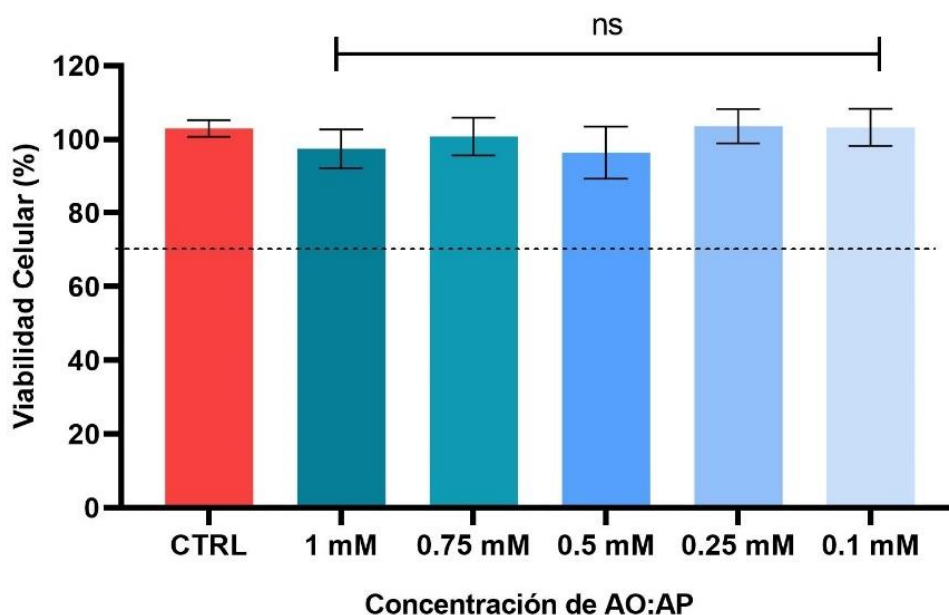


Figura 19. Viabilidad celular de las células HepG2 después de la incubación con la mezcla de AO:AP. Ninguna concentración de ácidos grasos resultó citotóxica para las HepG2 a las 24 h de incubación. AO: Ácido oleico. AP: Ácido palmítico. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3). La línea punteada hace referencia al límite de viabilidad celular indicado para muestras no citotóxicas según la ISO 10993-5. Datos analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía utilizando el análisis a posteriori de Tukey con $p < 0.05$. Los niveles de significancia están dados como **** ($p < 0.0001$). CTRL: Células sin tratamiento. ECV: Extracto de café verde.

3.4.2 Concentración, pureza e integridad del ARN extraído de las HHSC-N y HepG2

La calidad e integridad del ARN extraído de las células HepG2 y HHSC-N después de 24 y 48 h de tratamientos, se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 y por electroforesis en gel de agarosa al 2% (m/v) respectivamente.

Tabla 3. Concentración y pureza del ARN extraído de HHSC-N y HepG2 a las 48 h de tratamientos. La relación $Abs_{260/280}$ indica la pureza de la muestra respecto a la cantidad de proteínas, una muestra pura se considera para un valor ≥ 1.8 . CTRL: Células sin tratar. CTRL_EST: Células tratados con ácidos grasos. ECV: Extracto de café verde. ECV-NPLs: Nanopartículas cargadas con ECV. NPLs: Nanopartículas vacías.

	Muestra	Concentración (ng/ μ L)	$Abs_{260/280}$
HepG2	CTRL	727.3	2.10
	EST	742.7	2.09
	ECV	683.4	2.08
	ECV-NPLs	715.4	2.07
	NPLs	703.0	2.07
HHSC-N	CTRL	236.4	2.06
	ECV	123.2	2.06
	ECV-NPLs	142.4	2.03
	NPLs	153.0	2.08

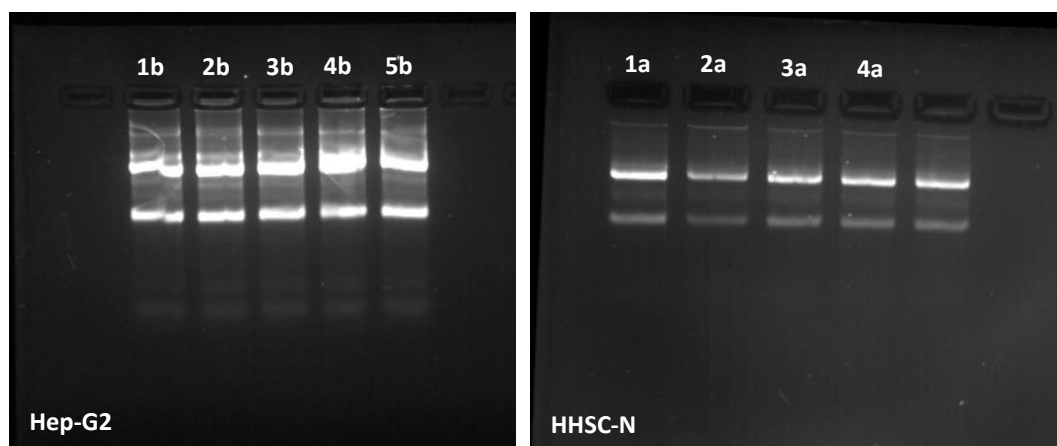


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 2% (m/v) del ARN extraído de las células Hep-G2 y HHSC-N posterior a 24 y 48 h de tratamientos respectivamente. Todas las muestras resultaron íntegras debido a la clara aparición de las bandas 28s y 18s de ARNr. Condiciones: (1a) CTRL, (2a) ECV, (3a) ECV-NPLs, (4a) NPLs, (1a) CTRL, (1b) CTRL, (2b) EST, (3b) ECV, (4b) ECV-NPLs y (5b) NPLs. CTRL: Células sin tratar. CTRL_EST: Células tratados con ácidos grasos. ECV: Extracto de café verde. ECV-NPLs: Nanopartículas cargadas con ECV. NPLs: Nanopartículas vacías.

Todas las muestras resultaron con una pureza y concentración adecuadas para su uso en ensayos posteriores con valores de concentración mayores a 100 ng/ μ L y relación de absorbancia 260/280

($Ab_{S_{260/280}}$) mayor a 1.8 como se puede observar en la Tabla 3 (Carvalhois et al., 2013). De la misma manera, la electroforesis en gel reveló una buena integridad de todas las muestras, basada en la visibilidad de las bandas 28s y 18s del ARN ribosomal (ARNr) (Figura 20) (Fleige & Pfaffl, 2006).

3.4.3 Efecto de las ECV-NPLs en la viabilidad celular de HepG2 y HHSC-N

Después de ser expuestas a la combinación de AO:AP 1 mM, las HepG2 fueron incubadas con ECV libre, ECV-NPLs y NPLs por 24 h. Con base en los resultados del ensayo MTT, ninguno de los tratamientos resultó ser citotóxico, ya que la viabilidad celular no fue menor al 80% con respecto al control de células sin tratamiento (Figura 21). La muerte celular de los hepatocitos en el contexto de la MASLD está estrechamente vinculada con disfunciones mitocondriales, un aumento en el estrés oxidativo y la acumulación excesiva de TGs. Mantener la viabilidad de los hepatocitos es fundamental para el tratamiento y manejo de la MASLD, ya que prevenir su muerte celular ayuda a evitar la progresión de la enfermedad y facilita la regeneración del tejido hepático (Grossini et al., 2021; Zhou et al., 2019).

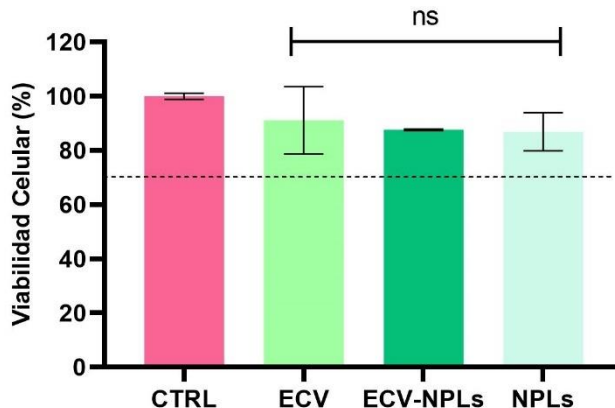


Figura 21. Viabilidad celular de las células HepG2 tratadas durante 24 h. Las barras verticales representan la desviación estándar de la media ($n=3$). La línea punteada hace referencia al límite de viabilidad celular indicado para muestras no citotóxicas según la ISO 10993-5. Datos analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía utilizando el análisis a posteriori de Tukey con $p < 0.05$. Los niveles de significancia están dados como **** ($p < 0.0001$). CTRL: HepG2 sin tratar. ECV: Extracto de café verde. ECV-NPLs: Nanopartículas cargadas con ECV. NPLs: Nanopartículas vacías.

Como se muestra en la Figura 22, el número de células fue similar en el control y en aquellas tratadas con ECV fue similar. Sin embargo, las células incubadas con ECV-NPLs y NPLs mostraron una notable reducción en su número, además de la presencia de residuos en el sobrenadante, posiblemente correspondientes a

HSPC. Estos resultados cualitativos son coherentes con los obtenidos en el ensayo de azul tripano para cada condición, donde se observó un aumento significativo en el número de células vivas del control de células sin tratar (48 h) y en el grupo tratado con ECV. En contraste, las ECV-NPLs y NPLs mantuvieron un número de células cercano al observado en el control de células sin tratar recién sembradas (0 h).

Una vez activadas, las HSCs adquieren un fenotipo proliferativo, y el incremento de aHSCs durante la fibrosis hepática agrava su progresión. Por ello, la proliferación de aHSCs es un factor clave en la resolución de la fibrosis en MASH (Lopez et al., 2016; Zisser et al., 2021). En nuestro modelo, tanto las ECV-NPLs como las NPLs controlaron de manera similar la proliferación de HHSC-N, manteniendo un número de células cercano al inicial, en contraste con el tratamiento con ECV, donde se observó un claro aumento en el número de células de casi dos veces más. Esto sugiere que el sistema de entrega influye en la proliferación de HHSC-N, posiblemente mediante la inducción de apoptosis durante el tratamiento con ECV-NPLs y NPLs. Para aclarar este mecanismo, serían necesarios ensayos específicos que evalúen marcadores de apoptosis y genes relacionados con la proliferación de aHSCs (Chen et al., 2022; J. Li et al., 2014; Zhong et al., 2023).

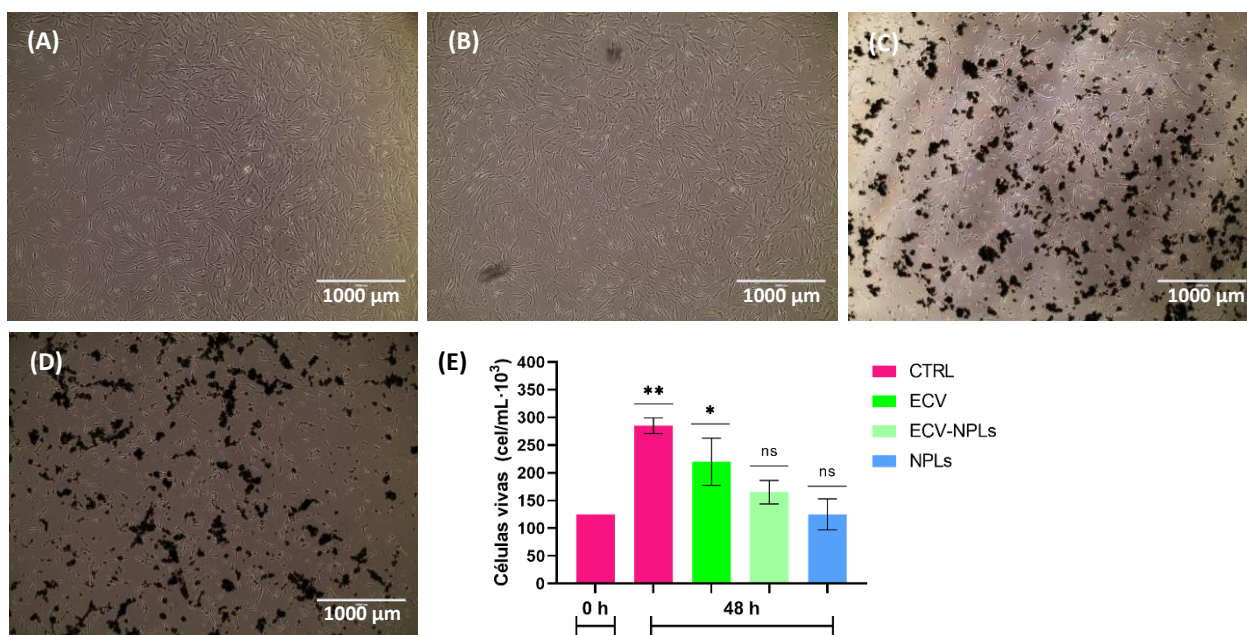


Figura 22. Cultivo y viabilidad celular de HHSC-N tratadas durante 48 h. A) CTRL 48 h. B) ECV. C) ECV-NPLs. D) NPLs. E) Número de células viables (cel/mL) después de las 48 incubación con los tratamientos, los resultados fueron comparados con el CTRL de HHSC-N inicialmente sembradas (0 h). Las barras verticales representan la desviación estándar de la media (n=3). Datos analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía utilizando el análisis a posteriori de Dunnett con $p < 0.05$. Los niveles de significancia están dados como ns (no significativo), * ($p < 0.033$) y ** ($p < 0.002$). CTRL: HHSC-N sin tratar. ECV: Extracto de café verde. ECV-NPLs: Nanopartículas cargadas con ECV. NPLs: Nanopartículas vacías.

3.4.4 Efecto de las ECV-NPLs sobre la expresión de genes esteatósicos en HepG2

Después de 24 horas de incubación con la mezcla de ácidos grasos AO:AP y 24 horas de tratamiento con ECV, ECV-NPLs y NPLs, se cuantificó la expresión de genes relacionados con la esteatosis en las células HepG2 mediante qPCR, empleando el método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Figura 23). Los resultados indicaron que el grupo control esteatósico (EST) mostró un aumento significativo en la expresión de los genes PLIN1 y CPT1A, con incrementos del 76% y 94%, respectivamente, en comparación con el control no tratado (CTRL). Este aumento en la expresión de PLIN1 en el grupo EST corrobora la acumulación de lípidos en los hepatocitos, ya que PLIN1 es una proteína clave en la formación y estabilidad de las LDs, facilitando el almacenamiento de lípidos. De esta manera, la sobreexpresión de estos genes respalda la inducción de un estado esteatósico en el modelo experimental (Greco et al., 2008; Khalifa et al., 2022). Por otra parte, los tratamientos con ECV y ECV-NPLs lograron una reducción significativa en la expresión de ambos genes. En cambio, las nanopartículas vacías (NPLs) no tuvieron un impacto significativo en la expresión de PLIN1 y CPT1A en relación con el control esteatósico, lo que sugiere que los efectos observados están asociados específicamente con el ECV encapsulado y no con las NPLs.

En pacientes con MASLD, varias proteínas asociadas a LDs están reguladas al alza, destacándose entre ellas PLIN1, que normalmente no se expresa en hepatocitos sanos. Durante la MASH, PLIN1 se eleva significativamente, lo que conduce a la esteatosis macrovesicular en los hepatocitos. Esta sobreexpresión de PLIN1 no solo inhibe la lipólisis, sino que también promueve la activación de genes involucrados en la síntesis y almacenamiento de lípidos, como FASN y DGAT2 (Carr & Ahima, 2016; A. Sharma, 2022). La disminución en la expresión de PLIN1 observada en las células tratadas con ECV, tanto en su forma libre como encapsulada, sugiere un efecto en la reducción de los TGs almacenados, lo cual podría traducirse en una atenuación de la esteatosis hepática. Para confirmar la posible reducción de lípidos, sería conveniente cuantificar tanto el contenido intracelular de TGs, así como la expresión de enzimas clave en su formación, como DGAT2 (Gluchowski et al., 2019). Esto proporcionaría una verificación más precisa de la acumulación lipídica y una validación más sólida del impacto del ECV en la esteatosis.

La CPT1A es una enzima esencial en el proceso de oxidación de AGs, desempeñando un papel crítico en la regulación del metabolismo lipídico hepático. Su expresión y actividad están estrechamente relacionadas con la progresión de la MASLD. Mientras que la sobreexpresión de CPT1A puede resultar beneficiosa al mejorar la β -oxidación de AGs y disminuir la inflamación hepática, su deficiencia ha mostrado un efecto protector en ciertos contextos, mitigando el daño hepático inducido por la dieta (Lin et al., 2020; Sun et al., 2022). Estudios han demostrado que una estimulación moderada de la oxidación de ácidos grasos,

mediada por un incremento en la actividad de CPT1A, es suficiente para reducir significativamente la acumulación intracelular de TGs, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (da Silva Lima et al., 2022; Stefanovic-Racic et al., 2008). Por lo tanto, mantener un equilibrio adecuado en la expresión de CPT1A es esencial para preservar la homeostasis del metabolismo lipídico y prevenir desbalances que podrían empeorar la progresión de la enfermedad. En este contexto, el ECV podría favorecer el mantenimiento de dicho equilibrio al no alterar la expresión de CPT1A, contribuyendo a una regulación adecuada de la β -oxidación de ácidos grasos.

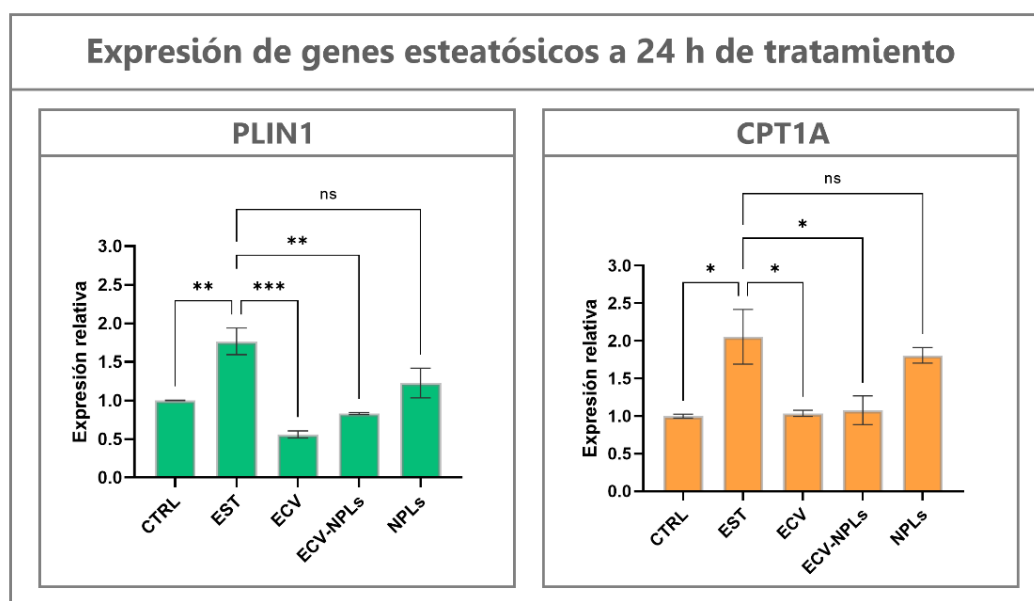


Figura 23. Expresión de genes asociados a esteatosis en HepG2 a las 24 h de tratamiento con ECV, ECV-NPLs y NPLs. Las barras verticales representan el error estándar de la media (n=3). Datos analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía utilizando el análisis a posteriori de Tukey con $p < 0.05$. Los niveles de significancia están dados como ns (no significativo), * ($p < 0.033$), ** ($p < 0.002$) y *** ($p < 0.0002$). CTRL: HepG2 sin tratar. EST: HepG2 tratadas con ácidos grasos. ECV: Extracto de café verde. ECV-NPLs: Nanopartículas cargadas con ECV. NPLs: Nanopartículas vacías.

De la misma manera, se cuantificó la expresión de $\text{TNF}\alpha$ a las 24 h de incubación con las condiciones previamente mencionadas (Figura 24). Solo la muestra de ECV-NPLs mostró un aumento significativo, mientras que el resto de las condiciones tuvieron una expresión cercana al control de células sin tratar sin alguna diferencia significativa entre ellas. El $\text{TNF}\alpha$ es una citocina inflamatoria fundamental en la patogénesis de la MASLD, estando estrechamente relacionada con la severidad de la enfermedad y su progresión hacia MASH (Vachliotis & Polyzos, 2023). Diversos estudios han demostrado que la estimulación con $\text{TNF}\alpha$ se asocia con una disminución en los niveles de PLIN1 y un incremento en la lipólisis

basal en el tejido adiposo. Además, en los hepatocitos, se ha relacionado con un aumento en la secreción de lipoproteínas y la inhibición de enzimas involucradas en la LDN (Bartolome et al., 2007; Greenberg et al., 2011; Liu et al., 2016). Estos hallazgos sugieren que la reducción en la expresión de PLIN1 observada en las células tratadas con ECV-NPLs durante 24 h podría estar vinculada a la sobreexpresión de TNF α , un efecto que parece depender de la combinación sinérgica entre las nanopartículas (NPLs) y el ECV, pero no del ECV o las NPLs por separado.

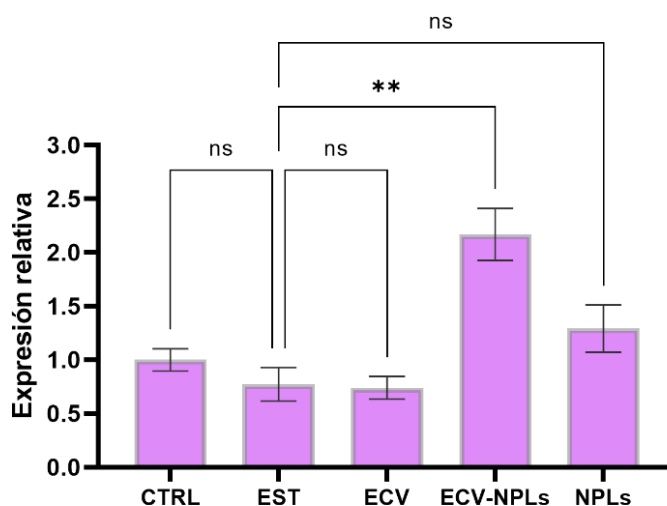


Figura 24. Expresión de TNF α en HepG2 a las 24 h de tratamiento con ECV, ECV-NPLs y NPLs. Las barras verticales representan el error estándar de la media (n=3). Datos analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía utilizando el análisis a posteriori de Tukey con $p < 0.05$. Los niveles de significancia están dados como ns (no significativo), * ($p < 0.033$), ** ($p < 0.002$) y *** ($p < 0.0002$). CTRL: HepG2 sin tratar. EST: HepG2 tratadas con ácidos grasos. ECV: Extracto de café verde. ECV-NPLs: Nanopartículas cargadas con ECV. NPLs: Nanopartículas vacías. TNF α : Factor de necrosis tumoral alfa.

Para evaluar la expresión de genes de ARNm de citocinas como el TNF α , se recomienda medir la expresión entre 3 y 8 h después de la estimulación para obtener niveles máximos. Sin embargo, las mediciones hasta las 24 h pueden seguir proporcionando información relevante debido a los niveles de expresión sostenidos (Abdalla et al., 2003; Budhia et al., 2006). No obstante, sería relevante monitorear la cantidad de TNF α secretado por las células HepG2 a partir de las primeras 2 h de tratamiento bajo nuestras condiciones experimentales. Esto permitiría obtener una comprensión más profunda del efecto de las ECV-NPLs sobre esta citocina (Salvoza et al., 2022).

3.4.5 Efecto de las ECV-NPLs sobre la expresión de genes profibróticos en HHSC-N

La expresión de genes profibróticos se cuantificó mediante qPCR, utilizando ARN extraído de las HHSC-N tras 48 horas de incubación con ECV, ECV-NPLs y NPLs (Figura 25). Los resultados del análisis comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$, normalizados respecto al gen HPRT1, revelan una regulación al alza de TGF β 1 en las HHSC-N tratadas con ECV-NPLs y NPLs, mientras que las tratadas con ECV no mostraron un efecto significativo en comparación con el control de células no tratadas. De manera similar, las NPLs indujeron una regulación positiva de PDGFRB en las HHSC-N, pero este efecto no se observó con ECV ni con ECV-NPLs. Sin embargo, las ECV-NPLs exhibieron una tendencia al alza en la expresión de PDGFRB, que, aunque no fue significativa frente al control de HHSC-N, se aproxima a los valores observados en células tratadas con NPLs. Por otro lado, las ECV-NPLs y NPLs promovieron una regulación significativa a la baja de COL1A1 y ACTA2. Simultáneamente, el ECV redujo significativamente la expresión de ACTA2, aunque no de COL1A1; en este último caso, solo se observó una tendencia a la baja en comparación con el control de HHSC-N no tratadas. Esto indica una mejora del efecto del ECV sobre los genes ACTA2 y COL1A1 al incorporarlo en las NPLs. Sin embargo, este efecto sobre los genes profibróticos parece estar influenciado por el sistema de nanopartículas *per se* y no por el ECV.

TGF- β 1 es una citocina clave en la activación de las HSCs y juega un papel importante en la fibrosis hepática. Está implicada en el aumento de la proliferación y migración de las aHSCs mediante la sobreexpresión de PDGFR- β y la activación de vías profibróticas como SMAD (Shah et al., 2013). Sin embargo, su participación en múltiples procesos fisiológicos limita su viabilidad como blanco terapéutico antifibrótico, lo que resalta la necesidad de identificar y estudiar blancos terapéuticos alternativos para tratar la fibrosis (Dewidar et al., 2019; Meng et al., 2016). En ese sentido, la regulación a la baja de los genes ACTA2 y COL1A1 sugiere un efecto antifibrótico prometedor de las ECV-NPLs, dado que la expresión de ACTA2 en HSCs está directamente vinculada a la fibrogénesis en el hígado (Tsuchiya et al., 2023). Estudios previos han mostrado que la deficiencia de ACTA2 reduce significativamente la producción de colágeno tipo I, lo que coincide con los resultados de este trabajo, donde se observó la subregulación de ACTA2 y COL1A1 en HHSC-N tras 48 horas de tratamiento con ECV-NPLs. Esto denota un efecto antifibrótico mejorado de la combinación de ECV y NPLs en comparación con el ECV libre, que actuaría a través de la transdiferenciación de las HHSC-N y disminuyendo el depósito de MEC, reduciendo así su potencial fibrogénico (Chomsky et al., 2022; Rockey et al., 2019). Sin embargo, sería necesario confirmar este efecto antifibrótico mediante estudios adicionales que evalúen la producción de colágeno tipo I y la contractilidad de las HHSC-N (Q. Li et al., 2024; Rodríguez-Rodríguez et al., 2021).

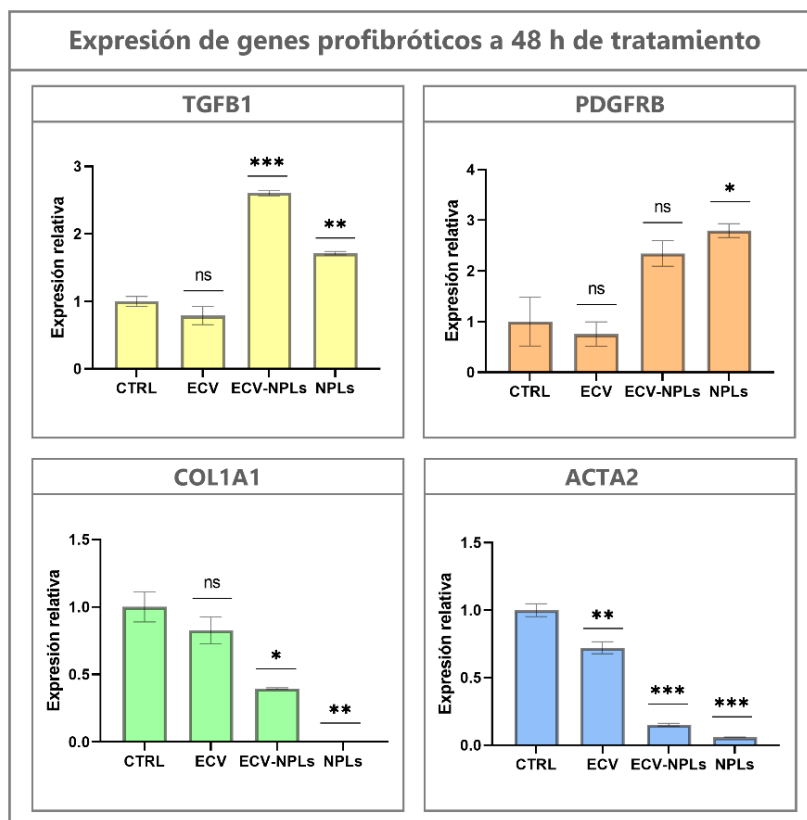


Figura 25. Expresión de genes profibróticos en HHSC-N a las 48 h de tratamiento con ECV, ECV-NPLs y NPLs. Los resultados de qPCR muestran una disminución significativa de la expresión de ACTA2 y COL1A1 en las HHSC-N tratadas con ECV-NPLs por 48 h. Las barras verticales representan el error estándar de la media (n=3). Datos analizados estadísticamente mediante una ANOVA de una vía utilizando el análisis a posteriori de Tukey con $p < 0.05$. Los niveles de significancia comparados con respecto al CTRL, están dados como ns (no significativo), * ($p < 0.033$), ** ($p < 0.002$) y *** ($p < 0.0002$). CTRL: HHSC-N sin tratar. ECV: Extracto de café verde. ECV-NPLs: Nanopartículas cargadas con ECV. NPLs: Nanopartículas vacías.

Capítulo 4. Conclusiones

En nuestro trabajo, se logró la obtención y encapsulación de extracto de granos de café verde (ECV) en nanopartículas híbridas de polímero-lípido (ECV-NPLs), compuestas por PLGA y HSPC. Las ECV-NPLs presentaron un tamaño promedio entre 140 y 200 nm, donde la incorporación del extracto redujo el tamaño de las partículas en un 20%. Además, se observó una carga superficial negativa y una eficiencia de encapsulación del 55%. Las ECV-NPLs demostraron liberar el extracto encapsulado en su totalidad dentro de las primeras 24 horas en condiciones *in vitro*.

Se estableció un modelo *in vitro* de MASLD utilizando células humanas, replicando características moleculares y celulares clave de la esteatosis y fibrosis hepáticas presentes en la enfermedad. Para el estudio del eje de la esteatosis, se indujo acumulación lipídica en hepatocitos HepG2 mediante una mezcla de ácidos grasos libres, mientras que el eje de la fibrosis se modeló utilizando células estrelladas hepáticas activadas (HHSC-N), provenientes de un paciente con diagnóstico de MASH. Tanto el ECV libre como las ECV-NPLs lograron regular la expresión de genes asociados a la esteatosis y fibrosis. En los hepatocitos, ambos tratamientos redujeron la expresión de PLIN1 sin alterar CPT1A, sugiriendo un efecto antiesteatósico que mantiene la homeostasis del metabolismo lipídico. Además, el aumento de TNF α observado con ECV-NPLs parece estar relacionado con la reducción de PLIN1. En cuanto a la fibrosis, la combinación de ECV y NPLs disminuyó significativamente la expresión de COL1A1 y ACTA2, genes involucrados en el fenotipo fibrogénico de las HHSC-N.

Estos resultados proporcionan una comprensión más detallada de los mecanismos antiesteatósicos y antifibróticos asociados al extracto de café verde, poniendo en evidencia el potencial terapéutico de las ECV-NPLs en la intervención de la esteatosis y fibrosis hepáticas características de la MASLD. Sin embargo, es fundamental reconocer varias limitaciones inherentes a este estudio que pueden ser abordadas en investigaciones futuras considerando lo siguiente:

Para mejorar el desarrollo de las nanopartículas híbridas de café verde en el tratamiento de la MASLD, es necesario optimizar su formulación mediante la metodología de superficie de respuesta e incorporar un agente de direccionamiento que incremente su selectividad hepática y eficacia terapéutica. Además, se recomienda realizar un co-cultivo de las dos líneas celulares empleadas, con el fin de simular de manera más precisa el microambiente de la MASLD, lo cual permitiría un análisis más profundo de los mecanismos

de acción de las ECV-NPLs en la esteatosis y fibrosis hepáticas. Finalmente, sería útil ampliar el análisis de genes implicados en la enfermedad y realizar pruebas adicionales para evaluar el impacto de las ECV-NPLs.

Abordar estas limitaciones será determinante para consolidar el uso de ECV-NPLs como una intervención terapéutica eficaz contra la MASLD, lo que podría tener importantes implicaciones en el desarrollo de estrategias clínicas para el manejo de esta enfermedad. Por el momento, los resultados obtenidos en este trabajo proporcionan un punto de partida de un potencial tratamiento para MASLD que podría ser evaluado en futuros modelos de estudio.

Literatura citada

- Abdalla, A. O., Kiaii, S., Hansson, L., Rossmann, E. D., Jeddi-Tehrani, M., Shokri, F., Österborg, A., Mellstedt, H., & Rabbani, H. (2003). Kinetics of Cytokine Gene Expression in Human CD4+ and CD8+ T-Lymphocyte Subsets Using Quantitative Real-Time PCR. *Scandinavian Journal of Immunology*, 58(6), 601–606. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2003.01348.x>
- Abdelghany, S., Parumasivam, T., Pang, A., Roediger, B., Tang, P., Jahn, K., Britton, W. J., & Chan, H.-K. (2019). Alginate modified-PLGA nanoparticles entrapping amikacin and moxifloxacin as a novel host-directed therapy for multidrug-resistant tuberculosis. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 52, 642–651. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.05.025>
- Abosabaa, S. A., Arafa, M. G., & ElMeshad, A. N. (2021). Hybrid chitosan-lipid nanoparticles of green tea extract as natural anti-cellulite agent with superior in vivo potency: full synthesis and analysis. *Drug Delivery*, 28(1), 2160–2176. <https://doi.org/10.1080/10717544.2021.1989088>
- Ahmaditabar, P., Momtazi-Borojeni, A. A., Rezayan, A. H., Mahmoodi, M., Sahebkar, A., & Mellat, M. (2017). Enhanced Entrapment and Improved in Vitro Controlled Release of N-Acetyl Cysteine in Hybrid PLGA/Lecithin Nanoparticles Prepared Using a Nanoprecipitation/Self-Assembly Method. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(12), 4203–4209. <https://doi.org/10.1002/jcb.26070>
- Asbaghi, O., Kashkooli, S., Mardani, M., Rezaei kelishadi, M., Fry, H., Kazemi, M., & Kaviani, M. (2021). Effect of green coffee bean extract supplementation on liver function and inflammatory biomarkers: A meta-analysis of randomized clinical trials. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 43. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2021.101349>
- Asy'Ari Hasbullah, U. H., & Rini Umiyati, D. (2021). Antioxidant Activity and Total Phenolic Compounds of Arabica and Robusta Coffee at Different Roasting Levels. *Journal of Physics: Conference Series*, 1764(1). <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1764/1/012033>
- Barani, M., Sangiovanni, E., Angarano, M., Rajizadeh, M. A., Mehrabani, M., Piazza, S., Gangadharappa, H. V., Pardakhty, A., Mehrbani, M., Dell'agli, M., & Nematollahi, M. H. (2021). Phytosomes as innovative delivery systems for phytochemicals: A comprehensive review of literature. *International Journal of Nanomedicine*, 16, 6983–7022. <https://doi.org/10.2147/IJN.S318416>
- Barrea, L., Pugliese, G., Frias-Toral, E., El Ghoch, M., Castellucci, B., Chapela, S. P., Carignano, M. de los A., Laudisio, D., Savastano, S., Colao, A., & Muscogiuri, G. (2023). Coffee consumption, health benefits and side effects: a narrative review and update for dietitians and nutritionists. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(9), 1238–1261. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1963207>
- Bartolome, N., Rodriguez, L., Martinez, M. J., Ochoa, B., & Chico, Y. (2007). Upregulation of Apolipoprotein B Secretion, but Not Lipid, by Tumor Necrosis Factor- α in Rat Hepatocyte Cultures in the Absence of Extracellular Fatty Acids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1096(1), 55–69. <https://doi.org/10.1196/annals.1397.070>
- Bartra, A., Cobo, R., & Paz, L. (2011). *La hora del café: dos siglos a muchas voces*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. https://www.cmss.org.mx/wp-content/uploads/La_hora_del_cafe_Dos_siglos_a_muchas_voces.pdf
- Bernal-Reyes, R., Castro-Narro, G., Malé-Velázquez, R., Carmona-Sánchez, R., González-Huezo, M. S., García-Juárez, I., Chávez-Tapia, N., Aguilar-Salinas, C., Aiza-Haddad, I., Ballesteros-Amozurrutia, M.

- A., Bosques-Padilla, F., Castillo-Barradas, M., Chávez-Barrera, J. A., Cisneros-Garza, L., Flores-Calderón, J., García-Compeán, D., Gutiérrez-Grobe, Y., Higuera de la Tijera, M. F., Keršenobich-Stalnikowitz, D., ... Velarde- Ruíz Valazco, J. A. (2019). The Mexican consensus on nonalcoholic fatty liver disease. *Revista de Gastroenterología de México*, 84(1), 69–99. <https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2018.11.007>
- Biswas, S., Mukherjee, P. K., Kar, A., Bannerjee, S., Charoensub, R., & Duangyod, T. (2021). Optimized piperine–phospholipid complex with enhanced bioavailability and hepatoprotective activity. *Pharmaceutical Development and Technology*, 26(1), 69–80. <https://doi.org/10.1080/10837450.2020.1835956>
- Bobková, A., Hudáček, M., Jakobová, S., Belej, L., Capcarová, M., Čurlej, J., Bobko, M., Árvay, J., Jakab, I., Čapla, J., & Demianová, A. (2020). The effect of roasting on the total polyphenols and antioxidant activity of coffee. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 55(5), 495–500. <https://doi.org/10.1080/03601234.2020.1724660>
- Böttger, R., Pauli, G., Chao, P. H., AL Fayez, N., Hohenwarter, L., & Li, S. D. (2020). Lipid-based nanoparticle technologies for liver targeting. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 154–155, 79–101. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.017>
- Budhia, S., Haring, L. F., McConnell, I., & Blacklaws, B. A. (2006). Quantitation of ovine cytokine mRNA by real-time RT–PCR. *Journal of Immunological Methods*, 309(1–2), 160–172. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2005.12.006>
- Carr, R. M., & Ahima, R. S. (2016). Pathophysiology of lipid droplet proteins in liver diseases. *Experimental Cell Research*, 340(2), 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.10.021>
- Carr, R. M., Dhir, R., Mahadev, K., Comerford, M., Chalasani, N. P., & Ahima, R. S. (2017). Perilipin Staining Distinguishes Between Steatosis and Nonalcoholic Steatohepatitis in Adults and Children. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 15(1), 145–147. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2016.08.023>
- Carvalhais, V., Delgado-Rastrollo, M., Melo, L. D. R., & Cerca, N. (2013). Controlled RNA contamination and degradation and its impact on qPCR gene expression in *S. epidermidis* biofilms. *Journal of Microbiological Methods*, 95(2), 195–200. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.08.010>
- Chan, W. K., Chuah, K. H., Rajaram, R. B., Lim, L. L., Ratnasingam, J., & Vethakkan, S. R. (2023). Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease (MASLD): A State-of-the-Art Review. *Journal of Obesity and Metabolic Syndrome*, 32(3), 197–213. <https://doi.org/10.7570/jomes23052>
- Chen, Z., Lin, Z., Yu, J., Zhong, H., Zhuo, X., Jia, C., & Wan, Y. (2022). Mitofusin-2 Restrains Hepatic Stellate Cells' Proliferation via PI3K/Akt Signaling Pathway and Inhibits Liver Fibrosis in Rats. *Journal of Healthcare Engineering*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/6731335>
- Chomsy, I. N., Rohman, M. S., Khotimah, H., Bramantyo, B. B., Auzan, A., Lukitasari, M., & Nugroho, D. A. (2022). Effect of the ethanolic extract of green tea and green coffee on cardiac fibrosis attenuation by suppressing activin-a and collagen-1 gene expression. *AIP Conference Proceedings*, 2513. <https://doi.org/10.1063/5.0099004>
- Ciardullo, S., Muraca, E., Vergani, M., Invernizzi, P., & Perseghin, G. (2024). Advancements in pharmacological treatment of NAFLD/MASLD: a focus on metabolic and liver-targeted interventions. *Gastroenterology Report*, 12. <https://doi.org/10.1093/gastro/goae029>

- Clogston, J. D., & Patri, A. K. (2011). Zeta Potential Measurement. *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery. Methods in Molecular Biology*, 697, 63–70. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6
- da Silva Lima, N., Fondevila, M. F., Nóvoa, E., Buqué, X., Mercado-Gómez, M., Gallet, S., González-Rellan, M. J., Fernandez, U., Loyens, A., Garcia-Vence, M., Chantada-Vazquez, M. del P., Bravo, S. B., Marañón, P., Senra, A., Escudero, A., Leiva, M., Guallar, D., Fidalgo, M., Gomes, P., ... Nogueiras, R. (2022). Inhibition of ATG3 ameliorates liver steatosis by increasing mitochondrial function. *Journal of Hepatology*, 76(1), 11–24. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.09.008>
- Desai, N. M., Gilbert Stanley, J., & Murthy, P. S. (2020). Green coffee nanoparticles: optimisation, in vitro bioactivity and bio-release property. *Journal of Microencapsulation*, 37(1), 52–64. <https://doi.org/10.1080/02652048.2019.1692946>
- Dewidar, B., Meyer, C., Dooley, S., & Meindl-Beinker, N. (2019). Tgf- β in hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis—updated 2019. *Cells*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/cells8111419>
- Dilliard, S. A., Cheng, Q., Siegwart, D. J., & Desimone, J. (2021). On the mechanism of tissue-specific mRNA delivery by selective organ targeting nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(52). <https://doi.org/10.1073/pnas.2109256118/-/DCSupplemental>
- Egnatchik, R. A., Leamy, A. K., Noguchi, Y., Shiota, M., & Young, J. D. (2014). Palmitate-induced activation of mitochondrial metabolism promotes oxidative stress and apoptosis in H4IIEC3 rat hepatocytes. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 63(2), 283–295. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.10.009>
- Elshaer, A., Chascsa, D. M. H., & Lizaola-Mayo, B. C. (2024). Exploring Varied Treatment Strategies for Metabolic Dysfunction-Associated Steatotic Liver Disease (MASLD). *Life*, 14(7). <https://doi.org/10.3390/life14070844>
- Fang, R. H., Aryal, S., Hu, C. M. J., & Zhang, L. (2010). Quick synthesis of lipid-polymer hybrid nanoparticles with low polydispersity using a single-step sonication method. *Langmuir*, 26(22), 16958–16962. <https://doi.org/10.1021/la103576a>
- Fleige, S., & Pfaffl, M. W. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2–3), 126–139. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.003>
- Friedman, S. L., Neuschwander-Tetri, B. A., Rinella, M., & Sanyal, A. J. (2018). Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nature Medicine*, 24(7), 908–922. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0104-9>
- García-Solis, S. E., Perez-Perez, V., Tapia-Maruri, D., Villalobos-Castillejos, F., Arenas-Ocampo, M. L., Camacho-Díaz, B. H., & Alamilla-Beltrán, L. (2022). Microencapsulation of the green coffee waste extract with high antioxidant activity by spray-drying. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(10). <https://doi.org/10.1111/jfpp.16864>
- García-Topete, D. A., Álvarez-Lee, L. A., Carballo-López, G. I., Uriostegui-Campos, M. A., Guzmán-Uribe, C., & Castro-Ceseña, A. B. (2024). Antifibrotic activity of carbon quantum dots in a human in vitro model of non-alcoholic steatohepatitis using hepatic stellate cells. *Biomaterials Science*, 12(5), 1307–1319. <https://doi.org/10.1039/d3bm01710a>

- Gaspar, L. M. do A. C., Dórea, A. C. S., Droppa-Almeida, D., de Mélo Silva, I. S., Montoro, F. E., Alves, L. L., Macedo, M. L. H., & Padilha, F. F. (2018). Development and characterization of PLGA nanoparticles containing antibiotics. *Journal of Nanoparticle Research*, 20(11). <https://doi.org/10.1007/s11051-018-4387-z>
- Ghitman, J., Biru, E. I., Stan, R., & Iovu, H. (2020). Review of hybrid PLGA nanoparticles: Future of smart drug delivery and theranostics medicine. *Materials and Design*, 193. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2020.108805>
- Giraudi, P. J., Barbero Becerra, V. J., Marin, V., Chavez-Tapia, N. C., Tiribelli, C., & Rosso, N. (2015). The importance of the interaction between hepatocyte and hepatic stellate cells in fibrogenesis induced by fatty accumulation. *Experimental and Molecular Pathology*, 98(1), 85–92. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2014.12.006>
- Gluchowski, N. L., Gabriel, K. R., Chitraju, C., Bronson, R. T., Mejhert, N., Boland, S., Wang, K., Lai, Z. W., Farese, R. V., & Walther, T. C. (2019). Hepatocyte Deletion of Triglyceride-Synthesis Enzyme Acyl CoA: Diacylglycerol Acyltransferase 2 Reduces Steatosis Without Increasing Inflammation or Fibrosis in Mice. *HHS Public Access. Hepatology*, 70(6), 1972–1985. <https://doi.org/10.1002/hep.30765/supinfo>
- Godara, S., Lather, V., Kirthanashri, S. V., Awasthi, R., & Pandita, D. (2020). Lipid-PLGA hybrid nanoparticles of paclitaxel: Preparation, characterization, in vitro and in vivo evaluation. *Materials Science and Engineering C*, 109. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110576>
- Golabi, P., Owrangi, S., & Younossi, Z. M. (2024). Global perspective on nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis - prevalence, clinical impact, economic implications and management strategies. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 59(S1), S1–S9. <https://doi.org/10.1111/apt.17833>
- Greco, D., Kotronen, A., Westerbacka, J., Puig, O., Arkkila, P., Kiviluoto, T., Laitinen, S., Kolak, M., Fisher, R. M., Hamsten, A., Auvinen, P., Yki-Järvinen, H., & Gene, Y.-J. H. (2008). Gene expression in human NAFLD. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 294, 1281–1287. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00074.2008.-Despite>
- Greenberg, A. S., Coleman, R. A., Kraemer, F. B., McManaman, J. L., Obin, M. S., Puri, V., Yan, Q. W., Miyoshi, H., & Mashek, D. G. (2011). The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans. *Journal of Clinical Investigation*, 121(6), 2102–2110. <https://doi.org/10.1172/JCI46069>
- Grossini, E., Garhwal, D. P., Calamita, G., Romito, R., Rigamonti, C., Minisini, R., Smirne, C., Surico, D., Bellan, M., & Pirisi, M. (2021). Exposure to Plasma From Non-alcoholic Fatty Liver Disease Patients Affects Hepatocyte Viability, Generates Mitochondrial Dysfunction, and Modulates Pathways Involved in Fat Accumulation and Inflammation. *Frontiers in Medicine*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.693997>
- Hernández-Conde, M., & Calleja, J. L. (2023). Metabolic liver disease: A new preventable pandemic. *Revista de Gastroenterología de México (English Edition)*, 88(3), 197–198. <https://doi.org/10.1016/j.rgmexn.2022.04.003>
- Hickey, J. W., Santos, J. L., Williford, J. M., & Mao, H. Q. (2015). Control of polymeric nanoparticle size to improve therapeutic delivery. *Journal of Controlled Release*, 219, 536–547. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.10.006>

- Hirn, S., Semmler-Behnke, M., Schleh, C., Wenk, A., Lipka, J., Schäffler, M., Takenaka, S., Möller, W., Schmid, G., Simon, U., & Kreyling, W. G. (2011). Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77(3), 407–416. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.12.029>
- Hosseiniabadi, S., Rafrat, M., Asghari, S., Asghari-Jafarabadi, M., & Vojouhi, S. (2020). Effect of green coffee extract supplementation on serum adiponectin concentration and lipid profile in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A randomized, controlled trial. *Complementary Therapies in Medicine*, 49. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2019.102290>
- Hu, G. L., Wang, X., Zhang, L., & Qiu, M. H. (2019). The sources and mechanisms of bioactive ingredients in coffee. *Food and Function*, 10(6), 3113–3126. <https://doi.org/10.1039/c9fo00288j>
- International Organization for Standardization. (2009). *Biological evaluation of medical devices- Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity (10993-5)*. International Organization for Standardization. <https://www.iso.org/standard/36406.html>
- Ipsen, D. H., Lykkesfeldt, J., & Tveden-Nyborg, P. (2018). Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(18), 3313–3327. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2860-6>
- Ismail, J., Klepsch, L. C., Dahlke, P., Tsarenko, E., Vollrath, A., Pretzel, D., Jordan, P. M., Rezaei, K., Czaplowska, J. A., Stumpf, S., Beringer-Siemers, B., Nischang, I., Hoepfner, S., Werz, O., & Schubert, U. S. (2024). PEG–Lipid–PLGA Hybrid Particles for Targeted Delivery of Anti-Inflammatory Drugs. *Pharmaceutics*, 16(2). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16020187>
- Jeszka-Skowron, M., Stanisz, E., & De Peña, M. P. (2016). Relationship between antioxidant capacity, chlorogenic acids and elemental composition of green coffee. *LWT*, 73, 243–250. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.018>
- Keam, S. J. (2024). Resmetirom: First Approval. *Drugs*, 84(6), 729–735. <https://doi.org/10.1007/s40265-024-02045-0>
- Kesente, M., Kavetsou, E., Roussaki, M., Bliidi, S., Loupassaki, S., Chanioti, S., Siamandoura, P., Stamatogianni, C., Philippou, E., Papaspyrides, C., Vouyiouka, S., & Detsi, A. (2017). Encapsulation of olive leaves extracts in biodegradable PLA nanoparticles for use in cosmetic formulation. *Bioengineering*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/bioengineering4030075>
- Khalifa, O., AL-Akl, N. S., Errafii, K., & Arredouani, A. (2022). Exendin-4 alleviates steatosis in an in vitro cell model by lowering FABP1 and FOXA1 expression via the Wnt/-catenin signaling pathway. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06143-5>
- Knight, W. E., Cao, Y., Dillon, P., & Song, K. (2021). A simple protocol to produce mature human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *STAR Protocols*, 2(4). <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100912>
- Kositamngkol, C., Kanchanasurakit, S., Auttamalang, C., Inchai, N., Kabkaew, T., Kitpark, S., Chaiyakunapruk, N., Duangjai, A., Saokaew, S., & Phisalprapa, P. (2021). Coffee Consumption and Non-alcoholic Fatty Liver Disease: An Umbrella Review and a Systematic Review and Meta-analysis. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.786596>

- Kumar, S., Sangwan, P., Lather, V., & Pandita, D. (2015). Biocompatible PLGA-oil hybrid nanoparticles for high loading and controlled delivery of resveratrol. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 30, 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.09.016>
- Lee, K. C., Wu, P. S., & Lin, H. C. (2023). Pathogenesis and treatment of non-alcoholic steatohepatitis and its fibrosis. *Clinical and Molecular Hepatology*, 29(1), 77–98. <https://doi.org/10.3350/cmh.2022.0237>
- Leimann, F. V., Biz, M. H., Kaufmann, K. C., Maia, W. J., Honçalves, O. H., Filho, L. C., Sayer, C., & de Araújo, P. H. H. (2015). Characterization of progesterone loaded biodegradable blend polymeric nanoparticles. *Ciencia Rural*, 45(11), 2082–2088. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20141288>
- Li, J., Ballim, D., Rodriguez, M., Cui, R., Goding, C. R., Teng, H., & Prince, S. (2014). The anti-proliferative function of the $\text{tgf-}\beta\text{1}$ signaling pathway involves the repression of the oncogenic tbx2 by its homologue tbx3 . *Journal of Biological Chemistry*, 289(51), 35633–35643. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.596411>
- Li, Q., Wang, J., Lv, J., Liu, D., Xiao, S., Mo, J., Lu, Z., Qiu, R., Li, C., Tang, L., He, S., Tang, Z., Cheng, Q., & Zhan, T. (2024). Total flavonoids of litchi Seed alleviates schistosomiasis liver fibrosis in mice by suppressing hepatic stellate cells activation and modulating the gut microbiomes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 178, 117240. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.117240>
- Li, Y., Yang, P., Ye, J., Xu, Q., Wu, J., & Wang, Y. (2024). Updated mechanisms of MASLD pathogenesis. *Lipids in Health and Disease*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12944-024-02108-x>
- Lin, C.-W., Peng, Y.-J., & Ding, S.-T. (2020). Leucine-Rich Repeat Kinase 2 Promotes β -Oxidation via the Regulation of CPT1a in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *The FASEB Journal*, 34(S1), 1–1. <https://doi.org/10.1096/fasebj.2020.34.s1.02834>
- Ling, J. K. U., Hii, Y. S., Jeevanandam, J., Chan, Y. S., & Danquah, M. K. (2019). Nanoencapsulation of Phytochemicals and in-vitro Applications. In *Phytochemistry: An in-silico and in-vitro Update* (pp. 315–330). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6920-9_17
- Liu, D., Mai, K., Zhang, Y., Xu, W., & Ai, Q. (2016). Tumour necrosis factor- α inhibits hepatic lipid deposition through GSK-3 β / β -catenin signaling in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *General and Comparative Endocrinology*, 228, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2015.12.027>
- Lopez, O. N., Bohanon, F. J., Wang, X., Ye, N., Corsello, T., Rojas-Khalil, Y., Chen, H., Chen, H., Zhou, J., & Radhakrishnan, R. S. (2016). STAT3 inhibition suppresses hepatic stellate cell fibrogenesis: HJC0123, a potential therapeutic agent for liver fibrosis. *RSC Advances*, 6(102), 100652–100663. <https://doi.org/10.1039/c6ra17459k>
- Mandal, B., Bhattacharjee, H., Mittal, N., Sah, H., Balabathula, P., Thoma, L. A., & Wood, G. C. (2013). Core-shell-type lipid-polymer hybrid nanoparticles as a drug delivery platform. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 9(4), 474–491. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.11.010>
- Mandal, B., Mittal, N. K., Balabathula, P., Thoma, L. A., & Wood, G. C. (2016). Development and in vitro evaluation of core-shell type lipid-polymer hybrid nanoparticles for the delivery of erlotinib in non-small cell lung cancer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81, 162–171. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.10.021>

- Martin, C., Dolmazon, E., Moylan, K., Fowley, C., McHale, A. P., Callan, J. F., & Callan, B. (2015). A charge neutral, size tuneable polymersome capable of high biological encapsulation efficiency and cell permeation. *International Journal of Pharmaceutics*, 481(1–2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.12.061>
- Masek, A., Latos-Brozio, M., Kałuzna-Czaplińska, J., Rosiak, A., & Chrzescijanska, E. (2020). Antioxidant properties of green coffee extract. *Forests*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/F11050557>
- Meng, X. M., Nikolic-Paterson, D. J., & Lan, H. Y. (2016). TGF- β : The master regulator of fibrosis. *Nature Reviews Nephrology*, 12(6), 325–338. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2016.48>
- Miao, L., Targher, G., Byrne, C. D., Cao, Y.-Y., & Zheng, M.-H. (2024). Current status and future trends of the global burden of MASLD. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 35(8), 697–707. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2024.02.007>
- Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH- assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130(4), 1036–1043. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.127>
- Moctezuma-Velázquez, C. (2018). Current treatment for non-alcoholic fatty liver disease. *Revista de Gastroenterología de Mexico*, 83(2), 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.rgmex.2017.10.003>
- Moghaddam, F. A., Ebrahimian, M., Oroojalian, F., Yazdian-Robati, R., Kalalinia, F., Tayebi, L., & Hashemi, M. (2022). Effect of thymoquinone-loaded lipid–polymer nanoparticles as an oral delivery system on anticancer efficiency of doxorubicin. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 12(1), 33–44. <https://doi.org/10.1007/s40097-021-00398-6>
- Moravcová, A., Červinková, Z., Kučera, O., Mezera, V., Rychtrmoc, D., & Lotková, H. (2015). The effect of oleic and palmitic acid on induction of steatosis and cytotoxicity on rat hepatocytes in primary culture. *Physiological Research*, 64, S627–S636. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933224>
- Moussa, Y. A., Teaima, M. H., Attia, D., Elmazar, M. M., & El-Nabarawi, M. A. (2023). Unroasted Green Coffee Extract-Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Enhancing Intestinal Permeation. *ACS Omega*, 8(23), 20251–20261. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c06629>
- Mukherjee, A., Waters, A. K., Kalyan, P., Achrol, A. S., Kesari, S., & Yenugonda, V. M. (2019). Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a nextgeneration drug delivery platform: State of the art, emerging technologies, and perspectives. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 1937–1952. <https://doi.org/10.2147/IJN.S198353>
- Müller, F. A., & Sturla, S. J. (2019). Human in vitro models of nonalcoholic fatty liver disease. *Current Opinion in Toxicology*, 16, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2019.03.001>
- Nieber, K. (2017). The Impact of Coffee on Health. *Planta Medica*, 83(16), 1256–1263. <https://doi.org/10.1055/s-0043-115007>
- Nikpayam, O., Faghfour, A. H., Tavakoli-Rouzbehani, O. M., Jalali, S.-M., Najafi, M., & Sohrab, G. (2020). The effect of green coffee extract supplementation on lipid profile: A systematic review of clinical trial and in-vivo studies. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 14(5), 1521–1528. <https://doi.org/10.1016/j.dsx.2020.07.043>

- Oseni, B. A., Azubuiké, C. P., Okubanjo, O. O., Igwilo, C. I., & Panyam, J. (2021). Encapsulation of Andrographolide in poly(lactide-co-glycolide) Nanoparticles: Formulation Optimization and in vitro Efficacy Studies. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.639409>
- Pachua, L., Laldinchhana, Roy, P. K., Zothantluanga, J. H., Ray, S., & Das, S. (2021). Encapsulation of Bioactive Compound and Its Therapeutic Potential. In *Advanced Structured Materials* (Vol. 140, pp. 687–714). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. https://doi.org/10.1007/978-3-030-54027-2_20
- Pandita, D., Kumar, S., & Lather, V. (2015). Hybrid poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: Design and delivery perspectives. *Drug Discovery Today*, 20(1), 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.09.018>
- PanNASH. (2019). *NASH Pathophysiology - PanNASH*. <https://pannash.org/pathophysiology/>
- Perdani, C. G., Pranowo, D., & Qonitatilah. (2019). Total phenols content of green coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*) in East Java. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 230(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/230/1/012093>
- Pereira, M. C., Oliveira, D. A., Hill, L. E., Zambiasi, R. C., Borges, C. D., Vizzotto, M., Mertens-Talcott, S., Talcott, S., & Gomes, C. L. (2018). Effect of nanoencapsulation using PLGA on antioxidant and antimicrobial activities of guabiroba fruit phenolic extract. *Food Chemistry*, 240, 396–404. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.144>
- Pergolizzi, S., D'Angelo, V., Aragona, M., Dugo, P., Cacciola, F., Capillo, G., Dugo, G., & Lauriano, E. R. (2018). Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activity of green coffee beans methanolic extract in rat skin. *Natural Product Research*, 34(11), 1535–1541. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1523161>
- Powell, E. E., Wong, V. W. S., & Rinella, M. (2021). Non-alcoholic fatty liver disease. *The Lancet*, 397(10290), 2212–2224. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32511-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32511-3)
- Ricchi, M., Odoardi, M. R., Carulli, L., Anzivino, C., Ballestri, S., Pinetti, A., Fantoni, L. I., Marra, F., Bertolotti, M., Banni, S., Lonardo, A., Carulli, N., & Loria, P. (2009). Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 24(5), 830–840. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2008.05733.x>
- Rinella, M. E., Lazarus, J. V., Ratzliff, V., Francque, S. M., Sanyal, A. J., Kanwal, F., Romero, D., Abdelmalek, M. F., Anstee, Q. M., Arab, J. P., Arrese, M., Bataller, R., Beuers, U., Boursier, J., Bugianesi, E., Byrne, C. D., Castro Narro, G. E., Chowdhury, A., Cortez-Pinto, H., ... Newsome, P. N. (2023). A multisociety Delphi consensus statement on new fatty liver disease nomenclature. *Hepatology*, 78(6), 1966–1986. <https://doi.org/10.1097/HEP.0000000000000520>
- Rockey, D. C., Du, Q., & Shi, Z. (2019). Smooth Muscle α -Actin Deficiency Leads to Decreased Liver Fibrosis via Impaired Cytoskeletal Signaling in Hepatic Stellate Cells. *American Journal of Pathology*, 189(11), 2209–2220. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.07.019>
- Rodríguez-Rodríguez, D. R., Lozano-Sepulveda, S. A., Delgado-Montemayor, C., Waksman, N., Cordero-Perez, P., & Rivas-Estilla, A. M. (2021). Turnera diffusa extract attenuates profibrotic, extracellular

- matrix and mitochondrial markers in activated human hepatic stellate cells (HSC). *Annals of Hepatology*, 22. <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2020.10.009>
- Rosiuk, V., Runser, A., Klymchenko, A., & Reisch, A. (2019). Controlling Size and Fluorescence of Dye-Loaded Polymer Nanoparticles through Polymer Design. *Langmuir*, 35(21), 7009. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b00721i>
- Rubio-Elizalde, I., Bernáldez-Sarabia, J., Moreno-Ulloa, A., Vilanova, C., Juárez, P., Licea-Navarro, A., & Castro-Ceseña, A. B. (2019). Scaffolds based on alginate-PEG methyl ether methacrylate-Moringa oleifera-Aloe vera for wound healing applications. *Carbohydrate Polymers*, 206, 455–467. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.11.027>
- Salomone, F., Galvano, F., & Volti, G. L. (2017). Molecular bases underlying the hepatoprotective effects of coffee. *Nutrients*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/nu9010085>
- Salvoza, N., Bedin, C., Saccani, A., Tiribelli, C., & Rosso, N. (2022). The Beneficial Effects of Triterpenic Acid and Acteoside in an In Vitro Model of Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH). *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7). <https://doi.org/10.3390/ijms23073562>
- Sanlier, N., Atik, A., & Atik, I. (2019). Consumption of green coffee and the risk of chronic diseases. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(16), 2573–2585. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1461061>
- Scherbl, D., Muentnich, S., & Richling, E. (2014). In vitro absorption studies of chlorogenic acids from coffee using the Ussing chamber model. *Food Research International*, 63, 456–463. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.03.031>
- Seguido, M. Á., Tarradas, R. M., González-Rámila, S., García-Cordero, J., Sarriá, B., Bravo-Clemente, L., & Mateos, R. (2022). Sustained Consumption of a Decaffeinated Green Coffee Nutraceutical Has Limited Effects on Phenolic Metabolism and Bioavailability in Overweight/Obese Subjects. *Nutrients*, 14(12), 2445. <https://doi.org/10.3390/nu14122445>
- Sewter, R., Heaney, S., & Patterson, A. (2021). Coffee consumption and the progression of nafld: A systematic review. *Nutrients*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/nu13072381>
- Shah, R., Reyes-Gordillo, K., Arellanes-Robledo, J., Lechuga, C. G., Hernández-Nazara, Z., Cotty, A., Rojkind, M., & Lakshman, M. R. (2013). TGF- β 1 Up-Regulates the Expression of PDGF- β Receptor mRNA and Induces a Delayed PI3K-, AKT-, and p70S6K-Dependent Proliferative Response in Activated Hepatic Stellate Cells. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 37(11), 1838–1848. <https://doi.org/10.1111/acer.12167>
- Shahmohammadi, H. A., Hosseini, S. A., Hajiani, E., Malehi, A. S., & Alipour, M. (2017). Effects of green coffee bean extract supplementation on patients with non-alcoholic fatty liver disease: A randomized clinical trial. *Hepatitis Monthly*, 17(4). <https://doi.org/10.5812/hepatmon.45609>
- Sharaf, N. S., Shetta, A., Elhalawani, J. E., & Mamdouh, W. (2022). Applying Box–Behnken Design for Formulation and Optimization of PLGA-Coffee Nanoparticles and Detecting Enhanced Antioxidant and Anticancer Activities. *Polymers*, 14(1). <https://doi.org/10.3390/polym14010144>

- Sharma, A. (2022). Lipid droplets associated perilipins protein insights into finding a therapeutic target approach to cure non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00395-0>
- Sharma, S., Mellis, J. E., Fu, P. P., Saxena, N. K., & Anania, F. A. (2011). GLP-1 analogs reduce hepatocyte steatosis and improve survival by enhancing the unfolded protein response and promoting macroautophagy. *PLoS ONE*, 6(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025269>
- Shi, J., Xu, Y., Xu, X., Zhu, X., Pridgen, E., Wu, J., Votruba, A. R., Swami, A., Zetter, B. R., & Farokhzad, O. C. (2014). Hybrid lipid-polymer nanoparticles for sustained siRNA delivery and gene silencing. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 10(5), e897–e900. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2014.03.006>
- Silva, C. W., Zanardi, K. R., Grancieri, M., Costa, N. M. B., Trivillin, L. O., Viana, M. L., Silva, P. I., & Costa, A. G. V. (2022). Green coffee extract (*Coffea canephora*) improved the intestinal barrier and slowed colorectal cancer progression and its associated inflammation in rats. *PharmaNutrition*, 22. <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2022.100314>
- Silva Faria, W. C., da Silva, A. A., Veggi, N., Kawashita, N. H., Lemes, S. A. de F., de Barros, W. M., Cardoso, E. da C., Converti, A., Moura, W. de M., & Bragagnolo, N. (2020). Acute and subacute oral toxicity assessment of dry encapsulated and non-encapsulated green coffee fruit extracts. *Journal of Food and Drug Analysis*, 28(2), 337–355. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.1067>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (pp. 152–178). [https://doi.org/DOI:10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/DOI:10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Stefanovic-Racic, M., Perdomo, G., Mantell, B. S., Sipula, I. J., Brown, N. F., & O’Doherty, R. M. (2008). A moderate increase in carnitine palmitoyltransferase 1a activity is sufficient to substantially reduce hepatic triglyceride levels. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 294(5). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00497.2007>
- Sun, W., Nie, T., Li, K., Wu, W., Long, Q., Feng, T., Mao, L., Gao, Y., Liu, Q., Gao, X., Ye, D., Yan, K., Gu, P., Xu, Y., Zhao, X., Chen, K., Loomes, K. M., Lin, S., Wu, D., & Hui, X. (2022). Hepatic CPT1A Facilitates Liver–Adipose Cross Talk via Induction of FGF21 in Mice. *Diabetes*, 71(1), 31–42. <https://doi.org/10.2337/db21-0363>
- Suryanti, E., Retnowati, D., Prastya, M. E., Ariani, N., Yati, I., Permatasari, V., Mozef, T., Dewijanti, I. D., Yuswan, A., Asril, M., Riana, E. N., & Batubara, I. (2023). Chemical Composition, Antioxidant, Antibacterial, Antibiofilm, and Cytotoxic Activities of Robusta Coffee Extract (*Coffea canephora*). *HAYATI Journal of Biosciences*, 30(4), 632–642. <https://doi.org/10.4308/hjb.30.4.632-642>
- Tacke, F., Horn, P., Wai-Sun Wong, V., Ratziu, V., Bugianesi, E., Francque, S., Zelber-Sagi, S., Valenti, L., Roden, M., Schick, F., Yki-Järvinen, H., Gastaldelli, A., Vettor, R., Frühbeck, G., & Dicker, D. (2024). EASL–EASD–EASO Clinical Practice Guidelines on the management of metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease (MASLD). *Journal of Hepatology*, 81(3), 492–542. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2024.04.031>
- Tahir, N., Madni, A., Correia, A., Rehman, M., Balasubramanian, V., Khan, M. M., & Santos, H. A. (2019). Lipid-polymer hybrid nanoparticles for controlled delivery of hydrophilic and lipophilic doxorubicin

- for breast cancer therapy. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 4961–4974. <https://doi.org/10.2147/IJN.S209325>
- Tahir, N., Tahir Haseeb, M., Madni, A., Parveen, F., Muzamil Khan, M., Khan, S., Jan, N., & Khan, A. (2020). Lipid Polymer Hybrid Nanoparticles: A Novel Approach for Drug Delivery. In *Role of Novel Drug Delivery Vehicles in Nanobiomedicine*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88269>
- Tarantino, G., Balsano, C., Santini, S. J., Brienza, G., Clemente, I., Cosimini, B., & Sinatti, G. (2021). It is high time physicians thought of natural products for alleviating nafld. Is there sufficient evidence to use them? *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24). <https://doi.org/10.3390/ijms222413424>
- Taylor, S. C., Nadeau, K., Abbasi, M., Lachance, C., Nguyen, M., & Fenrich, J. (2019). The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. *Trends in Biotechnology*, 37(7), 761–774. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.12.002>
- Teng, Z., Luo, Y., & Wang, Q. (2013). Carboxymethyl chitosan-soy protein complex nanoparticles for the encapsulation and controlled release of vitamin D3. *Food Chemistry*, 141(1), 524–532. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.043>
- Topala, C. M., & Tataru, L. D. (2015). Infrared Spectra of Green Arabica Coffee Extraction using Supercritical Carbon Dioxide and Soxhlet Technique. *Revista de Chimie*, 66(8), 1128–1131. <http://www.revistadechimie.ro>
- Tsuchida, T., & Friedman, S. L. (2017). Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14(7), 397–411. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.38>
- Tsuchiya, Y., Seki, T., Kobayashi, K., Komazawa-Sakon, S., Shichino, S., Nishina, T., Fukuhara, K., Ikejima, K., Nagai, H., Igarashi, Y., Ueha, S., Oikawa, A., Tsurusaki, S., Yamazaki, S., Nishiyama, C., Mikami, T., Yagita, H., Okumura, K., Kido, T., ... Nakano, H. (2023). Fibroblast growth factor 18 stimulates the proliferation of hepatic stellate cells, thereby inducing liver fibrosis. *Nature Communications*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42058-z>
- Vachliotis, I. D., & Polyzos, S. A. (2023). The Role of Tumor Necrosis Factor-Alpha in the Pathogenesis and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. In *Current Obesity Reports* (Vol. 12, Issue 3, pp. 191–206). Springer. <https://doi.org/10.1007/s13679-023-00519-y>
- van Meerloo, J., Kaspers, G. J. L., & Cloos, J. (2011). Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. *Cancer Cell Culture*, 731, 237–245. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20
- Varghese, S. E., Fariya, M. K., Rajawat, G. S., Steiniger, F., Fahr, A., & Nagarsenker, M. S. (2016). Lecithin and PLGA-based self-assembled nanocomposite, Lecithmer: preparation, characterization, and pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation. *Drug Delivery and Translational Research*, 6(4), 342–353. <https://doi.org/10.1007/s13346-016-0314-y>
- Wan, S., Zhang, L., Quan, Y., & Wei, K. (2018). Resveratrol-loaded PLGA nanoparticles: Enhanced stability, solubility and bioactivity of resveratrol for non-alcoholic fatty liver disease therapy. *Royal Society Open Science*, 5(11). <https://doi.org/10.1098/rsos.181457>

- Wiering, L., Subramanian, P., & Hammerich, L. (2023). Hepatic Stellate Cells: Dictating Outcome in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *CMGH*, 15(6), 1277–1292. <https://doi.org/10.1016/j.icmgh.2023.02.010>
- Wu, B., Yu, P., Cui, C., Wu, M., Zhang, Y., Liu, L., Wang, C.-X., Zhuo, R.-X., & Huang, S.-W. (2015). Folate-containing reduction-sensitive lipid–polymer hybrid nanoparticles for targeted delivery of doxorubicin. *Biomaterials Science*, 3(4), 655–664. <https://doi.org/10.1039/C4BM00462K>
- Xie, M., Xu, Y., Shen, H., Shen, S., Ge, Y., & Xie, J. (2014). Negative-charge-functionalized mesoporous silica nanoparticles as drug vehicles targeting hepatocellular carcinoma. *International Journal of Pharmaceutics*, 474(1–2), 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.08.027>
- Xu, L., Wang, X., Liu, Y., Yang, G., Falconer, R. J., & Zhao, C. X. (2022). Lipid Nanoparticles for Drug Delivery. *Advanced NanoBiomed Research*, 2(2). <https://doi.org/10.1002/anbr.202100109>
- Yang, Y., Meng, Y., Zhang, E., & Ding, J. (2017). A Facile Way to Increase the Cellular Uptake Efficiency of Hybrid Nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 18(7), 4559–4564. <https://doi.org/10.1166/jnn.2018.15359>
- Zeng, J., Fan, J. G., & Francque, S. M. (2024). Therapeutic management of metabolic dysfunction associated steatotic liver disease. In *United European Gastroenterology Journal* (Vol. 12, Issue 2, pp. 177–186). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/ueg2.12525>
- Zeng, X., Zhu, M., Liu, X., Chen, X., Yuan, Y., Li, L., Liu, J., Lu, Y., Cheng, J., & Chen, Y. (2020). Oleic acid ameliorates palmitic acid induced hepatocellular lipotoxicity by inhibition of ER stress and pyroptosis. *Nutrition and Metabolism*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12986-020-0434-8>
- Zhang, C. Y., Yuan, W. G., He, P., Lei, J. H., & Wang, C. X. (2016). Liver fibrosis and hepatic stellate cells: Etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets. *World Journal of Gastroenterology*, 22(48), 10512–10522. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i48.10512>
- Zhang, M., Bai, X., Du, Q., Xu, J., Wang, D., Chen, L., Dong, K., Chen, Z., & Yang, J. (2023). The Different Mechanisms of Lipid Accumulation in Hepatocytes Induced by Oleic Acid/Palmitic Acid and High-Fat Diet. *Molecules*, 28(18). <https://doi.org/10.3390/molecules28186714>
- Zhong, L., Zhao, J., Huang, L., Liu, Y., Pang, X., Zhan, K., Li, S., Xue, Q., Pan, X., & Deng, L. (2023). Runx2 activates hepatic stellate cells to promote liver fibrosis via transcriptionally regulating Itgav expression. *Clinical and Translational Medicine*, 13(7). <https://doi.org/10.1002/ctm2.1316>
- Zhou, T., Chang, L., Luo, Y., Zhou, Y., & Zhang, J. (2019). Mst1 inhibition attenuates non-alcoholic fatty liver disease via reversing Parkin-related mitophagy. *Redox Biology*, 21, 101120. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101120>
- Zhu, Z., Zhang, X., Pan, Q., Zhang, L., & Chai, J. (2023). In-depth analysis of de novo lipogenesis in non-alcoholic fatty liver disease: Mechanism and pharmacological interventions. *Liver Research*, 7(4), 285–295. <https://doi.org/10.1016/j.livres.2023.11.003>
- Zisser, A., Ipsen, D. H., & Tveden-Nyborg, P. (2021). Hepatic stellate cell activation and inactivation in nash-fibrosis—roles as putative treatment targets? *Biomedicines*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/biomedicines9040365>

Anexos

Anexo A

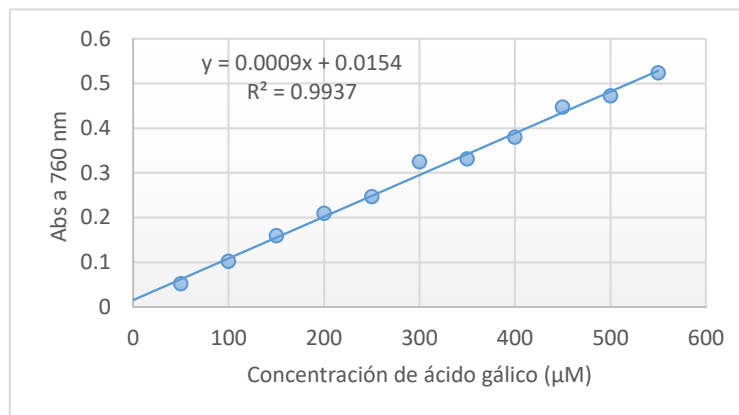


Figura 26. Curva de calibración de ácido gálico. En la gráfica se muestra la ecuación de la recta, utilizada para calcular el valor de x, que es igual a la concentración equivalente de ácido gálico en μM .

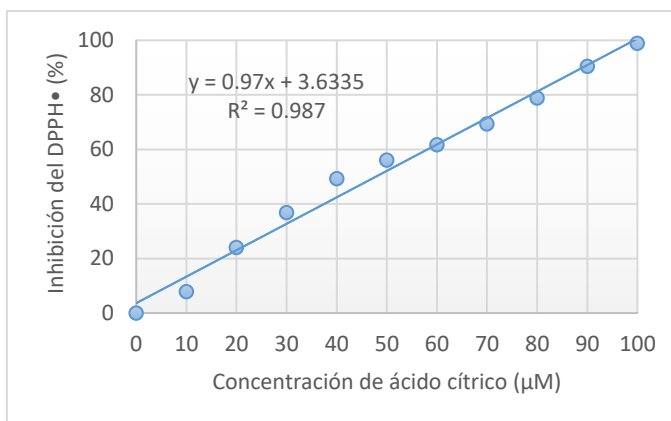


Figura 27. Curva de calibración de ácido cítrico. En la gráfica se muestra la ecuación de la recta, utilizada para calcular el valor de x a partir de la inhibición del radical $\text{DPPH}\cdot$, que es igual a la concentración equivalente de ácido cítrico en μM .

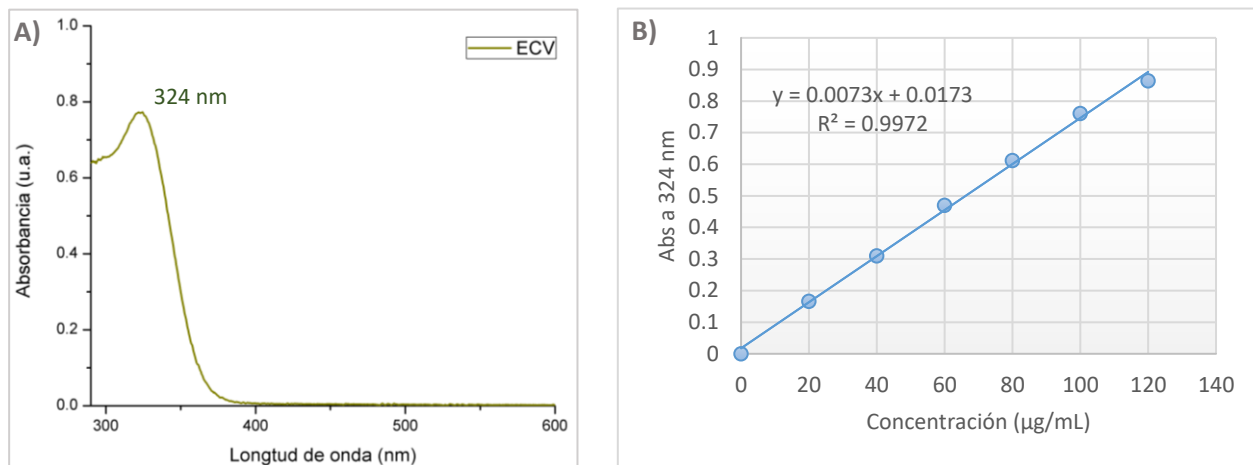


Figura 28. A) Espectro UV-vis del ECV. B) Curva de calibración de ECV en disuelto en PBS 1X (pH 7.4).