



Universidad Autónoma de Querétaro
 Facultad de Ciencias Naturales
 Doctorado en Ciencias Biológicas

“Efecto del tratamiento con atorvastatina y licopeno en un modelo de hígado graso no alcohólico inducido con una dieta alta en grasa y colesterol en ratas Sprague Dawley”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Doctorado en Ciencias Biológicas

Presenta:

M. en C. Rosa María Piña Zentella

Dirigido por:

Dr. Jorge Luis Rosado Loria
 Dra. Minerva Ramos Gómez

Dr. Jorge Luis Rosado Loria
 Presidente

Firma

Dra. Minerva Ramos Gómez
 Secretario

Firma

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
 Vocal

Firma

Dra. Olga Patricia García Obregón
 Suplente

Firma

Dr. Miguel Ángel Duarte Vázquez
 Suplente

Firma

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
 Director de la Facultad

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
 Director de Investigación y Posgrado

**Este trabajo se lo dedico a Mariana, Martha y
Andrea, ustedes han sido y serán mi mayor
motivación para realizar todos mis proyectos.**

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico para la realización de este proyecto de investigación.

A la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro, de manera particular a la Dra. Teresa García Gasca, por su interés y ayuda en la solución de situaciones imprevistas para continuar la realización del presente trabajo.

A la Facultad de Química (Posgrado de Alimentos) de la Universidad Autónoma de Querétaro, por haberme permitido realizar parte de los experimentos del proyecto en sus instalaciones, así como al personal administrativo, sobre todo a Carmelita, por su generoso respaldo y su ejemplo de dedicación al trabajo.

A los miembros del Comité Revisor de Tesis: Dr. Jorge Luis Rosado Loria, Dra. Minerva Ramos Gómez, Dra. Teresa García Gasca, Dra. Olga P. García Obregón y Dr. Miguel A. Duarte Vázquez, gracias por sus valiosos y oportunos comentarios.

A la Dra. Minerva Ramos Gómez por el tiempo dedicado en la revisión del manuscrito; por compartir sus conocimientos y por haberme apoyado en todo momento siempre con la mejor actitud.

A mis compañeros de laboratorio: Ana María, Angélica y Mariela, por su valiosa ayuda para llevar a cabo este proyecto; y a Beto quien además hizo muy agradables las horas de trabajo en el laboratorio.

A mis amigos: Amalia, Juan Antonio, Ana Carolina, Constanza, Gaby, Marce, Lore, Beto, Olivia, Aarón, Sara y Marco; gracias por su compañía.

A mi suegra, Sra. Tere, la quiero y admiro mucho.

A mis hermanos, Marta, Antonio y Guadalupe por su apoyo incondicional.

A mis padres, Martha[†] y Enrique por su ejemplo de vida y ser los principales promotores del ingreso, permanencia y conclusión del Doctorado.

A Paco por su ayuda para poder hacer todo lo que he querido, por su comprensión, cariño e infinita paciencia.

RESUMEN

El hígado graso no alcohólico (HGNA) es la causa más común de disfunción hepática, caracterizada por la infiltración de grasa. Actualmente, no hay un tratamiento efectivo para el HGNA; modificaciones en el estilo de vida son el principal tratamiento; sin embargo, la pérdida de peso a largo plazo tiene poco éxito así como la adherencia a la restricción dietaria. Esta situación ha llevado a la búsqueda de nuevos compuestos para el tratamiento del HGNA. Por lo tanto, el objetivo del presente proyecto fue evaluar el efecto sinérgico del tratamiento de la atorvastatina (AT) y/o el licopeno (LYC) aunado a un cambio de dieta en un modelo de HGNA en ratas Sprague Dawley inducido con una dieta alta en grasa (HFD). Las ratas fueron alimentadas durante 4 semanas con una dieta normal (ND-4s) o con una HFD (HFD-4s) para causar HGNA. Posteriormente, las ratas del grupo ND-4s continuaron durante otras 4 semanas con la misma dieta (ND-8s), y las ratas del grupo HFD-4s fueron alimentadas durante otras 4 semanas con dieta normal (HFD-4s+ND-4s) o ND y AT (HFD-4s+ND+AT-4s) o ND y LYC (HFD-4s+ND+LYC-4s) o con ND, AT y LYC (HFD-4s+ND+AT+LYC-4s). La AT (50 mg/kg) y el LYC (20 mg/kg) fueron administrados diariamente vía intragástrica. En los grupos HFD-4s+ND-4s, HFD-4s+ND+AT-4s, HFD-4s+ND+LYC-4s y HFD-4s+ND+AT+LYC-4s se observó una recuperación en los siguientes parámetros: peso corporal, consumo de alimento, resistencia de insulina (RI), triglicéridos (TG), colesterol total (CT), lipoproteínas de alta densidad (HDL) y alanino aminotransferasa (ALT) en suero; TG en hígado; así como la actividad enzimática de catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx). Sin embargo el tratamiento con LYC aunado al cambio a ND mostró una mayor recuperación en los indicadores peso del hígado, lipoproteínas de baja densidad (LDL) en suero, CT en hígado, la actividad enzimática de CAT y GPx en el hígado, y en las anomalías macroscópicas y microscópicas hepáticas. El tratamiento con AT aunado al cambio de dieta no mostró ninguna recuperación adicional. En los parámetros de la enzima aspartato aminotransferasa (AST) en suero y el malondialdehído (MDA) en hígado no se observó ninguna mejoría con el cambio a ND con o sin AT y/o LYC. Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que la incorporación de LYC a una dieta adecuada puede tener un mayor beneficio en la recuperación de pacientes con HGNA.

Palabras clave: carotenoide, hepatoprotección, estrés oxidativo

SUMMARY

Nonalcoholic fatty liver disease (HGNA) is the most common cause of liver dysfunction, characterized by fatty infiltration. Currently, there is no effective drug therapy for HGNA; interventions in lifestyles remain the first line of treatment; however, the weight loss long term has a low success rate as well as dietary restriction adherence. This situation has prompted the exploration of new therapeutic agents for HGNA. Therefore, the aim of this study was to evaluate the synergistic effect of atorvastatin (AT) and/or lycopene (LYC) treatment with a dietary control in HGNA model induced with a high-fat diet (HFD). Sprague Dawley rats were fed during 4 weeks with a normal diet (ND·4s) or a HFD (HFD·4s) to produce HGNA model. Then, rats from ND·4s continued during 4 weeks with the same diet (ND·8s), and rats of group HFD·4s were fed during 4 weeks with ND (HFD·4s+ND·4s) or ND plus AT (HFD·4s+ND+AT·4s) or ND plus LYC (HFD·4s+ND+LYC·4s) or ND, AT plus LYC (HFD·4s+ND+AT+LYC·4s). AT (50 mg/kg) and LYC (20 mg/kg) were administered daily by gavage. HFD·4s+ND·4s, HFD·4s+ND+AT·4s, HFD·4s+ND+LYC·4s and HFD·4s+ND+AT+LYC·4s groups partially reverted the following alterations due to HFD: body weight, food intake, insulin resistance (RI), serum triglycerides (TG), total cholesterol (CT), high density lipoprotein (HDL) and alanine aminotransferase (ALT), hepatic TG, and enzymatic activity of hepatic catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). A higher recuperation to reach normality was obtained with ND+LYC in: liver weight, serum low density lipoprotein (LDL), hepatic CT, and hepatic activity of CAT and GPx, and in some instances macroscopic and microscopic images of livers. Failures to recovery with ND plus AT and/or LYC were observed for malondialdehyde (MDA) level and serum aspartate aminotransferase (AST) activity. Taken together, our results highly suggest the incorporation of LYC to balanced diets in order to have a more advantageous recuperation of patients with HGNA.

Key words: carotenoid, hepatoprotection, oxidative stress

ÍNDICE

	No. de página
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	3
2.1 Hígado	3
2.1.1 Aspectos generales	3
2.1.2 Bases morfológicas y funcionales	3
2.1.3 Funciones del hígado	4
2.1.4 Homeostasis metabólica	6
2.2 HGNA	7
2.2.1 Desarrollo de HGNA a EHNA según la teoría de dos ataques	8
2.2.2 Acumulación de grasa en el hígado	8
2.2.3 Relevancia de la dieta	10
2.2.4 Síntesis <i>de novo</i> de ácidos grasos	10
2.2.5 Aporte del tejido adiposo	11
2.2.6 Estrés oxidativo hepático	11
2.3 Enzimas antioxidantes y MDA	13
2.3.1 SOD	13
2.3.2 CAT	14
2.3.3 GPx	14
2.3.4 MDA	15
2.4 Enzimas de daño hepático (ALT y AST)	15
2.5 Modelos animales de HGNA: genéticos o dietarios	16
2.5.1 <i>Ob/ob, db/db y ratas Zucker obesas (fa/fa)</i>	16
2.5.2 <i>Gen Agouti KK-Ay/a</i>	17
2.5.3 <i>Receptor 4 Melanocortin (MC4R)</i>	17
2.5.4 Proteína de unión al elemento regulador de esteroides 1c (SREBP)	17
2.5.5 Dieta deficiente en metionina y colina (MCD)	17
2.5.6 Dieta HFD	18
2.5.7 Dietas ricas en fructosa	18
2.5.8 Combinación de grasa y azúcar: estilo occidental o dieta de comida rápida	19
2.6 Tratamientos HGNA	19
2.6.1 AT para el tratamiento de HGNA	20
2.6.2 LYC para el tratamiento de HGNA	22
3 JUSTIFICACIÓN	28
4 HIPÓTESIS	30
5 OBJETIVO GENERAL	31
6 OBJETIVOS PARTICULARES	31
7 MATERIAL Y MÉTODOS	32
7.1 Compuestos para el tratamiento de HGNA	32
7.2 Material biológico	32
7.3 Evaluación de efecto de los compuestos en ratas	32
7.4 Metabolismo de carbohidratos	34

7.5 Perfil de lípidos (TG, CT, LDL y HDL) y determinación de TG y CT en hígado	35
7.6 Sistemas de defensa antioxidantes: SOD, CAT, GPx y MDA	35
7.7 Enzimas de daño hepático: AST y ALT	36
7.8 Estudio macroscópico y microscópico	36
7.9 Análisis estadístico	36
8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
8.1 Estudio piloto	38
8.2 Enzimas antioxidantes en suero (SOD y CAT)	38
8.3 Peso corporal y ganancia de peso	40
8.4 Conclusiones del estudio piloto	42
8.5 Implementación y caracterización del modelo de HGNA con HFD durante 4 semanas. Primera etapa	43
8.6 Ingesta calórica, peso corporal y peso del hígado	43
8.7 Perfil de lípidos en suero y en tejido hepático	45
8.8 Indicadores de daño hepático (ALT y AST)	45
8.9 Marcadores de estrés oxidativo	46
8.10 Metabolismo de carbohidratos	47
8.11 Vitamina A y E en suero	49
8.12 Evaluación macroscópica y microscópica del hígado	50
8.13 Evaluación microscópica de aorta y riñón	52
8.14 Efecto del cambio de dieta y la adición de AT y/o LYC para evaluar la recuperación del HGNA. Segunda etapa	54
8.15 Consumo de alimento, peso corporal y peso del hígado	54
8.16 Efecto del tratamiento con AT y LYC sobre los cambios en el metabolismo de carbohidratos en ratas alimentadas con HFD-4s	55
8.17 Efecto del tratamiento con AT y/o LYC sobre el perfil de lípidos en suero de ratas alimentadas con una dieta HFD-4s	56
8.18 Efecto del tratamiento con AT y/o LYC sobre el perfil de lípidos en hígado de ratas alimentadas con una dieta HFD-4s	58
8.19 Efecto del tratamiento con AT y/o LYC en las enzimas de daño hepático (AST y ALT) en suero	60
8.20 Efecto del tratamiento con AT y/o LYC en los marcadores de estrés oxidativo hepático	61
8.21 Efecto del tratamiento con AT y/o LYC en la morfología hepática	63
9 CONCLUSIONES	68
10 REFERENCIAS	69
11 APÉNDICE	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		No. de página
1	Funciones del hígado	5
2	Efecto hipolipemiente de la AT	21
3	Efecto antioxidante de la AT	22
4	Efecto hipolipemiente del LYC en modelos animales	23
5	Efecto hipolipemiente del LYC en sujetos	25
6	Cambios en diferentes parámetros después de 4 semanas de alimentación con ND o HFD	44
7	Grado de esteatosis y colesteroles de las ratas en los grupos ND·4s y HFD·4s	52
8	Consumo de alimento, peso corporal y peso del hígado	55
9	Perfil de lípidos en suero	58
10	Triglicéridos y colesterol total en hígado	60
11	Enzimas AST y ALT en suero	61
12	Marcadores de estrés oxidativo (SOD, CAT, GPx y MDA)	63
13	Grado de esteatosis y colesteroles de las ratas en cada grupo experimental de 8 semanas	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras		No. de página
1	Cortes histológicos del hígado normal, con esteatosis, con EHNA y cirrosis	8
2	Fuentes y destinos de los ácidos grasos libres en el hígado	9
3	Actividad enzimática de SOD en suero	39
4	Actividad enzimática de CAT en suero	40
5	Peso corporal de las ratas sanas con los tratamientos de AT y/o LYC	41
6	Ganancia de peso de las ratas sanas con los tratamientos de AT y/o LYC	42
7	Prueba de tolerancia a la glucosa en ratas alimentadas con DN-4s o HFD-4s	49
8	Valores de vitamina A y E en suero	50
9	Aspecto macroscópico de los hígados de ratas de los grupos ND-4s y HFD-4s	51
10	Corte histológico de la aorta	53
11	Curva de tolerancia a la glucosa en ratas alimentadas con ND-8s, HFD-4s+ND-4s, HFD-4s+ND+AT-4s, HFD-4s+ND+LYC-4s, HFD-4s+ND+AT+LYC-4s	56
12	Aspecto macroscópico de hígados de ratas de los siguientes grupos: ND-8s, HFD-4s+ND-4s, HFD-4s+ND+AT-4s, HFD-4s+ND+LYC-4s, HFD-4s+ND+AT+LYC-4s	65

1. INTRODUCCIÓN

El HGNA se ha convertido en el desorden hepático más común a nivel mundial (Bellentani et al., 2010; Browning et al., 2010). A pesar de que el HGNA no se asocia con la mortalidad a corto plazo, se puede agravar de una esteatosis simple a una esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), la cual de manera frecuente deriva en cirrosis e incluso cáncer hepatocelular (Masuoka y Chalasani, 2013; Berlanga et al., 2014). La mayor parte de los pacientes con una esteatosis simple no desarrollan EHNA o fibrosis avanzada; sin embargo, aproximadamente el 23 % de los pacientes con HGNA progresan y desarrollan EHNA (Wong et al., 2010). El HGNA se asocia con obesidad, diabetes mellitus tipo 2 (DMT2), hiperlipidemia, resistencia a la insulina y cáncer (Berlanga et al., 2014; Blanche y Xiang, 2014; Leite et al., 2014), y ha sido reconocida como parte del síndrome metabólico (Postic y Girard, 2008).

En México en las últimas décadas, la obesidad se ha convertido en un problema epidemiológico de salud y como consecuencia, se ha observado un incremento en la prevalencia de HGNA en todos los grupos de edad. En el año 2000, las enfermedades del hígado fueron la quinta causa de mortalidad, y la segunda en la población entre los 35 y 55 años. En el 2010, las enfermedades crónicas del hígado fueron la primera y la tercera causa de muerte entre hombres y mujeres entre los 30 y 59 años, respectivamente; además se estima que para el 2020 habrán más de 1 millón de personas afectadas con enfermedades crónicas del hígado (INEGI, 2008; INEGI, 2011).

La causa del desarrollo del HGNA se desconoce; sin embargo, de acuerdo a la teoría de “dos ataques”, en el “primer ataque”, los triglicéridos (TG) se acumulan en el citoplasma de los hepatocitos, llevando a un cuadro de esteatosis (Postic y Girard, 2008). La esteatosis se caracteriza por alteraciones en el metabolismo de lípidos debido al incremento en la lipogénesis, fallas en el peroxisoma y en la β -oxidación mitocondrial y/o la baja actividad del hígado

para exportar lípidos (Lee et al., 2011). El “segundo ataque” incluye el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria, los cuales producen daño hepatocelular y fibrosis, debido al desbalance entre la tasa de producción de las especies reactivas oxidativas y nitrosativas y su neutralización por mecanismos antioxidantes, por lo tanto favoreciendo la generación de prooxidantes (Rolo et al., 2012). También se ha demostrado que existe un desbalance en las enzimas antioxidantes en pacientes con EHNA (Belia et al., 2014). El control dietario y las modificaciones en el estilo de vida son al parecer una estrategia terapéutica efectiva para el tratamiento del HGNA (Ryan y Itsiopoulos, 2013; Dyson et al., 2014; Ferramosca y Zara, 2014). Además, la prevención del estrés oxidativo puede ser efectiva al evitar el HGNA en humanos (Sorrentino et al., 2015).

Aunado a la disminución de peso corporal y los cambios en el estilo de vida, es importante realizar numerosos estudios dirigidos a explorar nuevos tratamientos que pudieran traer beneficios a la salud de estos pacientes; por lo cual, en el presente proyecto se propuso el uso de AT y LYC para el tratamiento del HGNA. La AT es un fármaco empleado para el control de las dislipidemias; se ha reportado que aumenta el colesterol de alta densidad (HDL) y disminuye los TG, el CT y el LDL (Li et al., 2010; Tremblay et al., 2011). El LYC es otro compuesto reportado en la literatura con efectos hipolipemiantes, ya que disminuye el CT y los LDL (Hu et al., 2008; Verghese et al., 2008; Palozza et al., 2011; Ried, 2011). Aunado a estos beneficios, tanto la AT como el LYC han mostrado tener propiedades antioxidantes tanto *in vitro* como *in vivo* (Neyestani et al., 2007; Li et al., 2010; Kim et al., 2011; Sezer et al., 2011).

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del cambio de dieta con o sin un tratamiento de AT y/o LYC en un modelo de hígado graso no alcohólico inducido con una dieta alta en grasa y colesterol en ratas Sprague Dawley.

2. ANTECEDENTES

2.1 Hígado

2.1.1 Aspectos generales

El hígado es el órgano más grande del cuerpo humano y uno de los más importantes en cuanto a la actividad metabólica que se desarrolla en el organismo. Este órgano está situado en la parte superior derecha de la cavidad abdominal, debajo del diafragma y por encima del estómago, el riñón derecho y los intestinos. Es un órgano de color marrón rojizo oscuro con forma de cono y pesa alrededor de 1.5 a 2 Kg, se divide en lóbulo derecho e izquierdo y están limitados por la bifurcación de la arteria hepática y la vena porta; el flujo sanguíneo hepático es de aproximadamente 1500 mL/min. El hígado recibe, capta, metaboliza, transforma, almacena y libera de nuevo una gran cantidad de nutrimentos (macronutrimentos y micronutrimentos) procedentes de la absorción intestinal a través de la circulación portal y otros sustratos endógenos a través de la circulación sistémica. Asimismo, el hígado realiza esas mismas funciones (captación, transformación, almacenamiento y excreción) con otras sustancias no nutricionales como son los xenobióticos, endotoxinas, entre otros, que pueden ser potencialmente peligrosas para el organismo y que están presentes en la dieta o que son generados por el organismo (Mataix et al., 2002).

2.1.2 Bases morfológicas y funcionales

A nivel macroscópico, la masa hepática está compuesta por lóbulos atravesados por la vena central; estos lóbulos están formados por hepatocitos, los cuales están organizados en láminas delgadas. Estas láminas están atravesadas por espacios vasculares que se denominan sinusoides. En ellos, la sangre procedente de la arteria hepática y de la vena porta se mezcla y es drenada, tras su paso por el sinusoides a la vena central.

El sinusoides está a su vez delimitado por células reticuloendoteliales. Existen tres tipos de células de esta red: las endoteliales que son las que forman la pared de los sinusoides; las células de Kupffer, con función fagocitaria que se localizan en los sinusoides y, los lipocitos, situadas en el espacio de Disse entre el endotelio sinusoidal y el hepatocito, que almacenan grasas y vitaminas liposolubles (Mataix et al., 2002).

2.1.3 Funciones del hígado

Además, el hígado está encargado de sintetizar una gran cantidad de proteínas con muy diferentes funciones, entre las que destacan las de almacén, transporte y solubilización, coagulación y mantenimiento de la presión coloidosmótica del medio interno circulante. También se encarga de extraer del torrente sanguíneo y posteriormente excretar distintos tipos de moléculas libres (liposolubles, de gran tamaño), o bien unidas a proteínas, previa transformación en pequeñas moléculas hidrosolubles; como las hormonas, la bilirrubina o la urea y otros que proceden de las necrosis tisulares. Por último, el hígado también tiene un papel relevante en eliminar del torrente circulatorio: bacterias, restos celulares y endotoxinas bacterianas, participando, por tanto, en los mecanismos de defensa del organismo. Dado la importancia del hígado por las diversas funciones en las que participa (**Tabla 1**), cuando este órgano sufre alguna alteración patológica, sus funciones se alteran o anulan, por lo que los pacientes con hepatopatías presentan comúnmente deficiencias nutricionales, las cuales pueden a su vez afectar la propia función hepática y perpetuar el daño del órgano, y afectar el pronóstico (Mataix et al., 2002).

Tabla 1. Funciones del hígado

Metabolismo de los hidratos de carbono <ul style="list-style-type: none">• Síntesis y almacenamiento de glucógeno (glucogenogénesis)• Síntesis de glucosa a partir de glucógeno (glucogenólisis)• Síntesis de glucosa <i>de novo</i> a partir de piruvato, lactato y aminoácidos (gluconeogénesis)
Metabolismo de las proteínas y aminoácidos <ul style="list-style-type: none">• Pool de aminoácidos libres• Síntesis proteica
Metabolismo de los lípidos <ul style="list-style-type: none">• Síntesis hepática de ácidos grasos• Metabolismo hepático del colesterol• Síntesis de apoproteínas
Síntesis de sales biliares
Destoxificación de sustancias endógenas (bilirrubina, colesterol) o exógenas (xenobióticos)
Función fagocítica (a cargo de los macrófagos hepáticos o células de Kupffer) (Kumar et al., 2010).

La función más importante del hígado es proporcionar una fuente continua de energía para el organismo. La capacidad del hígado para almacenar y modular la disponibilidad de nutrientes está regulada por diversos factores y por las necesidades energéticas de los órganos periféricos. Las funciones metabólicas del hígado están moduladas por glándulas endócrinas como el páncreas, las suprarrenales y el tiroides, y también sujetas a regulación neural. El hígado regula el flujo de nutrientes durante la fase de absorción (posprandial), en la cual los nutrientes procedentes del intestino son metabolizados, y modificados para su almacenamiento en el propio hígado o en el tejido adiposo, o distribuidos al resto de los órganos como fuente de energía para su utilización. Durante la fase postabsortiva (ayuno), el hígado contribuye a satisfacer las necesidades metabólicas del organismo mediante la liberación o la síntesis *de novo* de sustratos energéticos. La regulación de estas vías metabólicas implica complejas interacciones entre los niveles sanguíneos de nutrientes, los productos finales de su metabolismo (precursores de la síntesis hepática) y la acción hormonal (Mataix et al., 2002).

2.1.4 Homeostasis metabólica

En condiciones fisiológicas normales, el hígado es esencial para mantener la homeostasis energética en el cuerpo. Por ejemplo, durante el estado de alimentación, la glucosa dietaria estimula la secreción de insulina del páncreas, la cual llega directamente al hígado a través de la vena porta incrementando los niveles de lipogénesis en el hígado y la secreción de lipoproteínas. De manera controversial, durante el ayuno, la oxidación de ácidos grasos mejora en respuesta a la liberación de glucagón pancreático y cortisol adrenal. La regulación deficiente de las vías metabólicas de los lípidos da como resultado el desarrollo de esteatosis hepática y contribuye al desarrollo de la inflamación crónica hepática, resistencia a la insulina, y daño hepático (Browning et al., 2004).

Del 65 y el 85 % de toda la sangre que irriga el hígado, el mayor porcentaje proviene del vaso y del tubo digestivo; por lo que tiene una gran cantidad de azúcares, aminoácidos y moléculas sencillas producidas por la digestión en el intestino y son llevados al hígado por la vena porta. La arteria hepática aporta menor cantidad de sangre, pero ésta va altamente oxigenada. La sangre de ambos se mezcla y recorre el hígado y se vacía en las sinusoides que forman una variedad de vasos más anchos con numerosas uniones entre vasos y algunas de sus células están directamente adosadas a los hepatocitos. Los hepatocitos son las principales células de hígado (90% del total) y en ellos residen las funciones metabólicas. Los hepatocitos se organizan en láminas cribiformes anastomosadas entre sí, o “placas”, que se extienden desde los espacios porta a las venas hepáticas terminales. Entre las placas de hepatocitos se encuentran los sinusoides vasculares. La sangre atraviesa los sinusoides y sale hacia las venas hepáticas terminales a través de numerosos orificios de la pared de la vena. De esta forma, los hepatocitos reciben por ambos lados sangre, venosa portal y de la arteria hepática bien mezclada, lo que convierte a los hepatocitos en las células más ricamente perfundidas del cuerpo (Kumar et al., 2010).

2.2 HGNA

El término de HGNA se ha considerado como un desorden común que se caracteriza por una acumulación anormal de TG en el hígado en ausencia del consumo excesivo de alcohol. Esta enfermedad representa un espectro histológico que va de una esteatosis simple (definida como TG hepáticos > 5% del peso del hígado) que puede progresar a EHNA, fibrosis, cirrosis, falla hepática en etapa final o carcinoma hepatocelular (Pan, 2014). La esteatosis hepática es generalmente benigna y sin proceso inflamatorio, mientras que la inflamación lobular y el daño hepatocelular seguido de fibrosis son comunes en la EHNA y al parecer conllevan al desarrollo de cirrosis (Pan, 2014).

Por lo general, la esteatosis con o sin inflamación inespecífica es una afección estable que no plantea problemas clínicos significativos y los sujetos que la presentan están asintomáticos. Sin embargo, su relevancia clínica se debe a que del 20-30% de los sujetos con HGNA desarrolla EHNA y esta condición aumenta considerablemente el riesgo de cirrosis, falla hepática y carcinoma hepatocelular (**Figura 1**) (Cohen et al., 2011).

La EHNA se diferencia de la HGNA por la presencia del daño a los hepatocitos como hinchamiento de los hepatocitos y muerte celular, infiltración inflamatoria y/o deposición de colágeno (fibrosis) y posteriormente cirrosis (**Figura 1**). En un cuadro de cirrosis los hepatocitos son reemplazados por tejido de cicatrización compuesto principalmente por colágeno tipo I (**Figura 2**). El colágeno se produce por células especializadas llamadas estrelladas, las cuales se activan al presentarse una lesión hepática y tienen un papel importante en la regeneración del hígado. Finalmente, la cirrosis puede progresar y causar cáncer de hígado; del 4 al 27 % de individuos con cirrosis desarrolla hepatocarcinoma (Petta, 2009).

Se ha establecido que existe una relación entre la obesidad, la DMT2, la resistencia a la insulina, la hiperlipidemia, la hipertensión y el desarrollo del HGNA (Bujanda et al., 2008; Hernández-Rodas et al., 2015). Más aún, se ha considerado el HGNA como la manifestación hepática del síndrome metabólico

(Angulo, 2002). Por lo anterior, se ha propuesto la “teoría de dos ataques” para explicar el desarrollo y progresión de HGNA a EHNA.

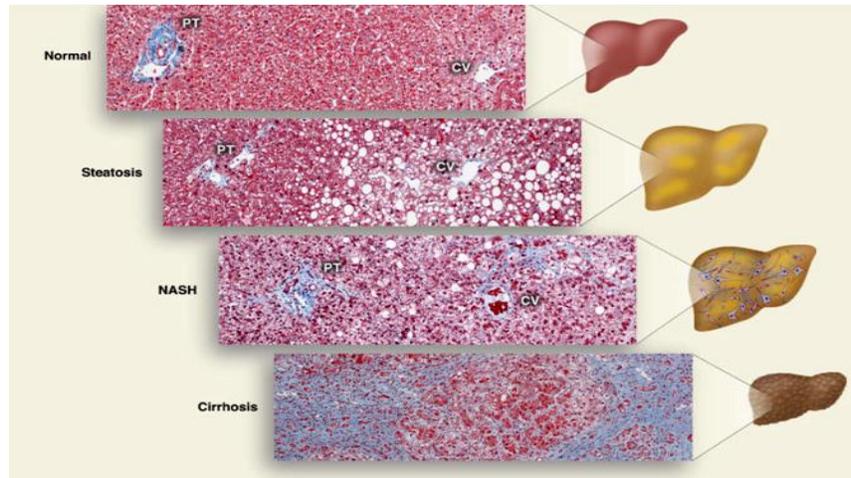


Figura 1. Cortes histológicos del hígado normal, con esteatosis, con EHNA y cirrosis. Las fibras de colágeno se tiñeron con azul de Masson tricromo. La triada portal (PT), formada por una arteria hepática, vena portal y un ducto biliar; y la vena central (CV) (Cohen et al., 2011).

2.2.1 Desarrollo de HGNA a EHNA según la “teoría de dos ataques”

Los factores que promueven los depósitos de TG en el hígado y la transición esteatosis a EHNA y cirrosis en humanos, no han sido completamente definidos, aunque se sabe que participan factores genéticos y ambientales. Se ha propuesto un modelo de patogenia en “dos ataques”, los cuales son: 1) acumulación de grasa en el hígado, y 2) estrés oxidativo hepático (Day y James, 1998).

2.2.2 Acumulación de grasa en el hígado

La acumulación anormal de lípidos en el hígado puede tener su origen en la entrada excesiva de lípidos o a un metabolismo y exportación defectuosos,

(Musso et al., 2008). Los ácidos grasos libres (FFA, por sus siglas en inglés) usados para la formación de TG en el hígado pueden provenir de tres fuentes: (i) la dieta, (ii) la síntesis de *novo* y (iii) del tejido adiposo. En el hígado, los FFA pueden tener 4 destinos: se esterifican y almacenan en forma de vacuolas de grasa, son usados para formar colesterol o fosfolípidos, se oxidan a cuerpos cetónicos por la β oxidación en la mitocondria o para la formación de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y ser transportadas por la sangre hacia los tejidos (Kumar et al., 2010) (**Figura 2**). Debe existir una homeostasis de lípidos en el hígado, la cual es regulada por varios receptores nucleares y factores de transcripción citoplásmicos (Petta, 2009). A continuación se explican de manera más específica.

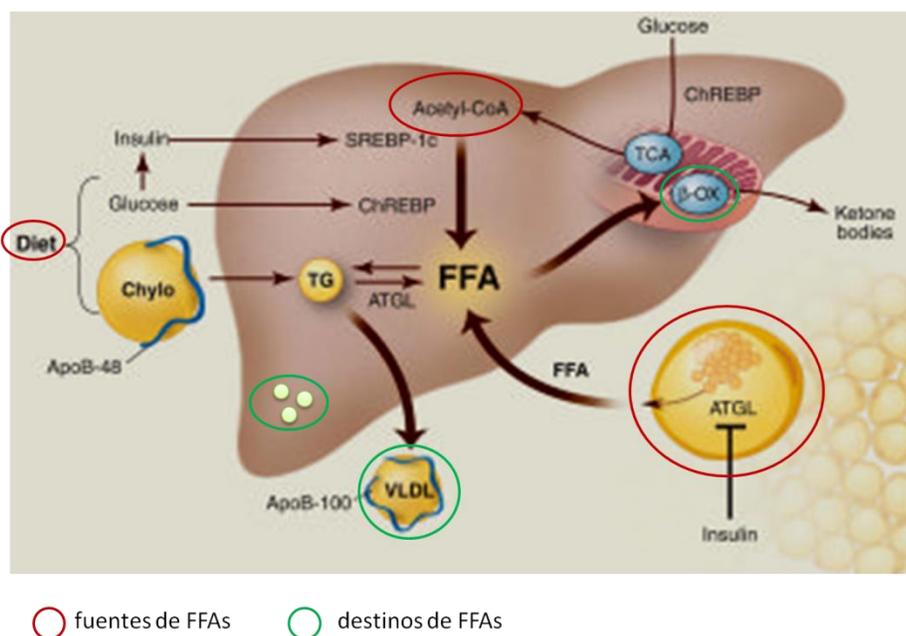


Figura 2. Fuentes y destinos de los ácidos grasos libres en el hígado. Adaptada de Cohen et al., 2011.

2.2.3 Relevancia de la dieta

La dieta aporta parte de los lípidos que llegan al hígado. En este sentido, se sabe que pacientes con EHNA consumen dietas ricas en grasa saturada y colesterol, y pobres en grasa poli-insaturada, fibra y vitaminas antioxidantes como C y E (Musso et al., 2009). Recientemente se ha reportado en modelos de ratón que dietas altas en carbohidratos refinados, en especial la fructosa, promueven la esteatosis y su progresión a EHNA (Bergheim et al, 2008). La relevancia de la dieta en la patogénesis del HGNA fue evaluada recientemente en un estudio de corte longitudinal en 348 sujetos, el cual demuestra que el ejercicio regular, así como la pérdida de peso corporal con una dieta adecuada, se asocia a una mejora en la alanino-amino transferasa (ALT) en suero (Dixon et al., 2004). Por su parte, Hernández-Rodas (2015) demostró que sujetos sanos que consumieron una dieta con un alto contenido calórico, incrementaron sus niveles de ALT en suero y el grado de esteatosis en el hígado.

2.2.4 Síntesis *de novo* de ácidos grasos

La síntesis *de novo* es promovida por el consumo de carbohidratos en la dieta y se realiza a partir de la acetil-coenzima A (CoA). Hay un aumento en el nivel de insulina y a la disponibilidad del sustrato. La insulina estimula a la proteína de unión al elemento regulador de esteroides 1c (SREBP1c) vía la cascada de señalización proteína cinasa B/receptor X del hígado *mechanistic target of rapamycin* (AKT, LXR y mTOR) (Li et al., 2010). SREBP1c es un factor de transcripción que regula enzimas lipogénicas como la acetil-CoA carboxilasa 1 y 2 (ACC) y la sintasa de ácidos grasos (FAS) (Higuchi et al., 2008). La glucosa promueve la lipogénesis activando la proteína de unión al elemento regulador de carbohidratos (ChREBP) (Uyeda y Repa, 2006). Así como SREBP-1c, ChREBP estimula la expresión de múltiples genes involucrados en la vía biosintética de los ácidos grasos. En hígado, ChREBP en hígado regula la conversión de glucosa a piruvato incrementando la expresión la cinasa de

piruvato (PK), y provee más sustrato para la síntesis de FFA y TG (Uyeda y Repa, 2006).

2.2.5 Aporte del tejido adiposo

El tejido adiposo también puede aportar los FFA que llegan al hígado, de manera particular el tejido adiposo visceral (VAT). El incremento en la masa de VAT se asocia con la obesidad, la resistencia a la insulina (RI) y el HGA. Los FFA, las hormonas (leptina, adiponectina y la resistina) y la adipocitocinas como el factor de necrosis tumoral- α y la interleucina 6 (TNF- α e IL-6), son liberadas del VAT a la vena porta y transportadas al hígado. Los FFA y TNF- α tienen un papel clave en el desarrollo de esteatosis y de RI durante el síndrome metabólico (Varela-Rey et al., 2008). La expresión de mRNA de TNF- α en el tejido adiposo y los niveles de TNF- α en plasma se encuentran elevados en sujetos obesos con RI y en ratones *ob/ob*. Los FFA y TNF- α bloquean la actividad del receptor de insulina, previniendo la activación de la cinasa de 3-fosfatoinositina (PI3K) y otros eventos de señalización río abajo. La fosforilación de tirosina en el sustrato del receptor de insulina (IRS) es el mecanismo general de acción de la insulina. La regulación río abajo de la señalización de IRS causada por la fosforilación de serina, parece ser el mecanismo por el cual actúan los ácidos grasos libres y TNF- α (Varela-Rey et al., 2008).

2.2.6 Estrés oxidativo hepático

En la previamente mencionada teoría de “dos ataques”, el segundo ataque es dado por el estrés oxidativo hepático. En términos generales, el estrés oxidativo se refiere a los procesos de deterioro como resultado del desequilibrio entre la formación excesiva de pro-oxidantes (EROS) y/o especies reactivas nitrosativas (ERNS) y la limitación de los antioxidantes. Es el mecanismo más aceptado de daño y muerte hepatocelular (Robertson et al., 2001). Estudios previos han reportado niveles elevados de marcadores de

estrés oxidativo y productos de la lipoperoxidación, en plasma, así como bajos niveles de sistemas antioxidantes en el hígado y suero de pacientes con EHNA (Rolo et al., 2012; Belia et al., 2014).

El desequilibrio entre el incremento de EROS y la disminución de antioxidantes, conduce a la peroxidación lipídica de los ácidos grasos poliinsaturados, membranas celulares, membranas mitocondriales y ADN. La lipoperoxidación produce aldehídos citotóxicos como malondialdehídos (MDA) y 4-hidroxinonenal. Las EROS y estos aldehídos contribuyen al estrés oxidativo, disminuyendo la producción de ATP e incrementando la liberación de citocinas inflamatorias. Estos cambios promueven el daño a los hepatocitos, la necroinflamación y la apoptosis de los hepatocitos. Se ha observado que el producto de la lipoperoxidación 4-hidroxinonenal se encuentra en mayor proporción en la zona periventricular (zona 3), correlacionando esto con las lesiones histológicas de la EHNA que son predominantes en la zona 3 (Brunt et al., 1999; Takahashi et al., 2012).

La enzima NADPH oxidasa cataliza la transferencia de un electrón suelto al oxígeno molecular para producir superóxido. La regulación de NADPH oxidasa puede elevar la producción de EROS, y por lo tanto, contribuir a la patogénesis del estrés oxidativo en ratones alimentados con dietas alta en grasa y en sacarosa. La formación de EROS puede aumentar por diversos mecanismos como la activación de la xantino oxidasa, la autooxidación de NADH y la inactivación de la superóxido dismutasa (SOD). Diversas fuentes pueden incrementar la producción de EROS en la EHNA como son: TNF- α , la sobrecarga de hierro, la sobrecarga y el mal funcionamiento mitocondrial, CYPs y los peroxisomas. La mitocondria tiene un papel central en la patogénesis de la EHNA, cuando se sobrepasa su capacidad oxidativa debido al aumento en el flujo de ácidos grasos que se observa tanto en la obesidad como en la RI (Petta, 2009).

2.3 Enzimas antioxidantes y MDA

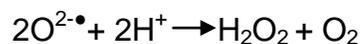
El concepto de estrés oxidativo como desequilibrio implica que en condiciones fisiológicas normales debería de existir un equilibrio, entre los oxidantes y los antioxidantes. Sin embargo, la situación real es altamente dinámica, y está muy lejos de un equilibrio estático: los oxidantes son producidos de manera continua como productos secundarios de la respiración y del metabolismo oxidativo; los antioxidantes se encuentran en constante relación con ellos; mientras que, en la condición de estrés oxidativo, los oxidantes aumentan o los antioxidantes disminuyen en forma progresiva y continua, incluyendo respuestas adaptativas de los antioxidantes, lo que le confiere elasticidad y reversibilidad a la situación biológica (Koningsberg, 2008).

Los sistemas de defensa antioxidantes se agrupan en enzimáticos y no enzimáticos. Dentro de los enzimáticos se encuentran: la superóxido dismutasa (Mn-SOD y Cu, Zn-SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), entre otras (Koningsberg, 2008).

2.3.1 SOD

El radical anión superóxido ($O^{2\bullet}$) es una de las primeras especies generadas por diversos sistemas celulares. Este radical es altamente tóxico por sí mismo y puede ser el generador de otras especies reactivas aún más tóxicas. La SOD es la enzima encargada de transformar esta especie reactiva en una de menor toxicidad, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual es posteriormente transformado en agua por otras enzimas (CAT y GPx) (Koningsberg, 2008).

Las SOD son una familia de enzimas que catalizan eficazmente la dismutación de $O^{2\bullet}$, como se observa en la siguiente reacción:



En mamíferos, hay tres isoformas de SOD: CuZn-SOD (Sod1), la cual se encuentra en el citoplasma; Mn-SOD (Sod2), la cual se encuentra en la matriz mitocondrial; y SOD extracelular (Sod3), la cual se localiza en los fluidos extracelulares, como la linfa, el fluido sinovial y el plasma.

Existe suficiente evidencia, la cual demuestra que en el HGNA los mecanismos de defensa antioxidante se encuentran alterados en el HGNA. El contenido de glutatión, así como la actividad de SOD, disminuyeron en pacientes que presentan esteatosis hepática y se exacerban en los casos de EHNA (Koningsberg, 2008).

2.3.2 CAT

Las CAT son las enzimas responsables de descomponer el H_2O_2 en O_2 y agua. Se conocen tres tipos de enzimas que llevan a cabo esta reacción de manera eficaz, catalasas típicas, catalasa-peroxidasa y manganeso catalasas, y se sabe que surgieron de manera independiente durante la evolución. Estas enzimas forman parte de la respuesta antioxidantes de la mayoría de los seres vivos, ya que evitan la formación de las EROS más oxidantes que se pueden generar a partir de H_2O_2 . Las CAT, además de mantener el H_2O_2 en niveles no tóxicos, pueden participar en la regulación de los diferentes procesos del desarrollo en los que está involucrada esta ERO (Koningsberg, 2008).

2.3.3 GPx

La enzima glutatión peroxidasa (GPx) es el nombre genérico para una familia de múltiples isoenzimas que se caracterizan por su tríada catalítica compuesta de seleniocisteína, glutamina y triptófano. La actividad de algunas isoenzimas de GPx depende de Se. Existen cuatro isoenzimas mayoritarias en tejidos de mamíferos, todas dependientes de Se: GPx clásica o citosólica, GPx gastrointestinal, GPx plasmática y GPx de fosfolípidos. Estas cuatro isoformas de

GPx pueden actuar como una peroxinitrito reductasa, previniendo tanto la reacción de oxidación como la de nitración causada por el peroxinitrito (ONOO). El sistema GPx y glutatión reducido (GSH) trabajan catalíticamente de una manera parecida a la detoxificación de hidroperóxidos por GPx a expensas de GSH (Koningsberg, 2008).

2.3.4 MDA

Los niveles plasmáticos de productos de oxidación, derivados de reacciones mediadas por radicales libres, y de antioxidantes se utilizan como indicadores de estrés oxidativo sistémico en seres humanos y en animales experimentales. El producto de oxidación más utilizado es el MDA, determinado en forma inespecífica, como TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, por sus siglas en inglés) mediante espectrofotometría o espectrofluorometría (Koningsberg, 2008).

2.4 Enzimas de daño hepático (ALT y AST)

Los ensayos para gamma glutamiltransferasa (GGT), alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y fosfatasa alcalina (ALP) son los exámenes de laboratorio más usados para la detección de enfermedades hepáticas. De manera particular las aminotransferasas (ALT y AST) se encuentran abundantemente dentro de los hepatocitos y se encargan de catalizar la transferencia de los grupos amino para generar los productos en la gluconeogénesis y el metabolismo de los aminoácidos (Gianini y col., 2005). En el hígado se producen múltiples reacciones de transaminación, pero las únicas transaminasas con valor clínico son: 1) ALT y 2) AST. La ALT se relaciona de manera más específica con el daño hepático, debido a que se localiza exclusivamente en el citosol de los hepatocitos, mientras que la AST, se localiza además en otros órganos como el corazón, músculo esquelético, riñones, cerebro, páncreas, pulmón, eritrocitos y leucocitos (Alvarez, 2005).

Se puede considerar la enfermedad hepática como la causa más importante del aumento de la actividad de la ALT y de la AST. Ambas enzimas están normalmente presentes en bajas concentraciones en el suero, con valores inferiores a 40 U/L. Sin embargo, si el hígado está dañado, la membrana celular de los hepatocitos se hace más permeable, y algunas enzimas se filtran a la corriente sanguínea, por lo que se elevan sus concentraciones en suero (Martínez, 2005).

2.5 Modelos animales de HGNA: genéticos o dietarios

Se han implementado diversos modelos animales para entender mejor los mecanismos en el desarrollo de la esteatosis; estos incluyen modelos genéticamente modificados hasta modelos inducidos con dietas y la combinación de ambos modelos (Kanuri y Bergheim, 2013).

2.5.1 *Ob/ob*, *db/db* y ratas Zucker obesas (*fa/fa*)

Los ratones *ob/ob* tienen una mutación espontánea en el gen de leptina, esto causa una deficiencia de leptina, que puede llevar a hiperfagia, inactividad, obesidad y diabetes acompañada del desarrollo de HGNA (Mayer et al., 1951).

A diferencia de los ratones *ob/ob*, los *db/db*, tienen una mutación natural en el gen del receptor de leptina. Estos animales desarrollan obesidad, resistencia a la insulina, esteatosis macrovesicular y requieren de un “segundo ataque” para progresar de esteatosis a esteatohepatitis (Wortham y Gyamfi, 2008). De manera similar, las ratas Zucker (*fa/fa*) también presentan hiperfagia, la cual resulta en hiperinsulinemia, hiperlipidemia y desarrollan esteatosis en el hígado, además de la pérdida del receptor de leptina (Godbole y York, 1978; Oana et al., 2005).

2.5.2 *Gen Agouti KK-Ay/a*

La mutación heterocigota del gen KK-Ay/a ha mostrado que trae como consecuencia la pérdida de la melanocortina, y un fenotipo obeso debido a la hiperfagia causada en el hipotálamo y ocasionando una alteración en la supresión del apetito, además de cambios de color. Esta cepa de ratón desarrolla obesidad, resistencia a la insulina y esteatosis en el hígado (Hernández-Rodas et al., 2015).

2.5.3 *Receptor 4 Melanocortin (MC4R)*

Ratones con una alteración dirigida MC4R han mostrado el desarrollo tardío de obesidad con hiperfagia, hipersulinemia, e hiperglicemia (Huszar et al., 1997; Marsh et al., 1999). Además, los ratones MC4R-KO alimentados con HFD han mostrado esteatosis masiva en el hígado y alteraciones en genes relacionados con el metabolismo de lípidos (Albarado et al., 2004).

2.5.4 *Proteína de unión al elemento regulador de esteroides 1c (SREBP)*

La sobreexpresión dirigida del factor de transcripción regulador de insulina SREBP en el tejido adiposo ha mostrado como resultado el desarrollo de HGNA en ratones (Nakayama et al., 2007). En este modelo, el desarrollo de hígado graso se asoció con alteraciones en la diferenciación de tejido adiposo blanco e hipersulinemia, pero también con inflamación hepática leve y fibrosis; sin embargo, el peso corporal no fue diferente del tipo silvestre y el desarrollo del tejido adiposo fue marcadamente alterado (Shimonura et al., 1998).

2.5.5 *Dieta deficiente en metionina y colina (MCD)*

La dieta MCD es un modelo de deficiencia nutricional, normalmente contiene grandes cantidades de sacarosa (40 %) y poco contenido de lípidos

(10%), pero es deficiente en metionina y colina; ambos son factores esenciales en la nutrición humana y animal. Los roedores alimentados con dieta MCD rápidamente desarrollan esteatosis hepática, debido a una mayor absorción de los ácidos grasos y disminución de la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad desde hígado (Anstee y Goldin, 2006). Con este modelo, el desarrollo de esteatosis es significativamente más rápido y produce un daño hepático, por lo que este modelo presenta algunas limitaciones. Por ejemplo, este modelo carece de los principales factores de riesgo en el desarrollo de HGNA en humanos, como son sobrepeso y resistencia a la insulina, también se reportó una pérdida del 35 % del peso en un periodo de 4 semanas (Rinella et al., 2008).

2.5.6 Dieta HFD

Estas dietas tienen un alto contenido de grasa (HFD), del total de calorías que aportan, entre un 30 a 75% provienen de ácidos grasos saturados, se han utilizado para inducir alteraciones metabólicas e HGNA. Dependiendo del tiempo de alimentación y de la combinación de ácidos grasos, los roedores alimentados con HFD presentan obesidad, fallas en la tolerancia a la glucosa, dislipidemia, aumento en la expresión de reguladores lipogénicos y de citocinas proinflamatorias (Buettner et al., 2007; Takahashi et al., 2012). Este modelo se asemeja a las alteraciones patológicas y moleculares propias del HGNA en humanos.

2.5.7 Dietas ricas en fructosa

Estas dietas presentan un elevado contenido de carbohidratos (sacarosa o fructosa) han sido usadas para inducir el desarrollo de HGNA en modelos de ratones. Existen estudios en donde a ratones C57BL/6 que tuvieron acceso *ad libitum* al agua de beber con mono o disacáridos presentaron HGNA. Estos estudios demostraron que la fructosa tuvo en efecto más nocivo en el hígado,

causando además resistencia a la insulina, estrés oxidativo, expresión de citocinas proinflamatorias y SREBP1c en hígado y niveles elevados de endotoxinas en flujo de sangre portal, así como alteraciones en la expresión de citocinas de tejido adiposo visceral, de manera dependiente de la dosis y el tiempo (Ackerman et al., 2005; Bergheim et al., 2008; Spruss et al., 2009; Kanuri et al., 2011).

2.5.8 Combinación de grasa y azúcar: estilo occidental o dieta de comida rápida

En analogía a lo que sucede en países occidentales, con respecto a comer fuera de casa o en lugares de comida rápida, lo cual representa un factor de riesgo para el desarrollo de obesidad (Anderson et al., 2011; Beserra et al., 2012). Se ha observado que la combinación de grasa y fructosa, aunado con un contenido elevado de colesterol, también se ha sido usado como un modelo dietario para inducir HGNA en roedores. En un en ratones C57BL/6 alimentados con una dieta similar a comida rápida en cuanto al aporte de lípidos y carbohidratos (peletes con alto contenido de grasa: 40% de la energía proveniente de grasa con 2% de colesterol) y agua de beber adicionada con jarabe de maíz alto en fructosa (HFCS, 42 g/L concentración final), estos animales desarrollaron sobrepeso, resistencia a la insulina y EHNA, así como un aumento en la expresión de genes relacionados con el desarrollo de fibrosis (Charlton et al., 2011).

2.6 Tratamientos HGNA

Actualmente no existe una terapia farmacológica efectiva para el tratamiento del HGNA. Los cambios en el estilo de vida, los cuales involucran la dieta y el ejercicio, son la primera línea de tratamiento; sin embargo, la pérdida de peso a largo plazo tiene poco éxito, así como la adherencia a las restricciones dietarias. Esta situación ha ocasionado la exploración de nuevos

agentes terapéuticos para la prevención de la esteatosis hepática y la progresión de la enfermedad. Hay una escasez en evidencia científica de agentes con potencial terapéutico, en parte debido a la escasez de estudios clínicos basados en la evidencia de datos histopatológicos del hígado, pero también debido al hecho de que el HGNA es una patología multifactorial que involucra cambios metabólicos profundos y complejos en el hígado, los cuales se relacionan con otros tejidos como el adiposo, el músculo esquelético, haciendo compleja la respuesta a una monoterapia (Hernández-Rodas et al., 2015).

Actualmente, la industria farmacéutica tiene el gran reto de desarrollar una terapia combinada que resulte efectiva para pacientes con HGNA que, además, presenten obesidad, resistencia a la insulina, dislipidemia y estrés oxidativo. Es por esto que se están haciendo esfuerzos importantes dirigidos a explorar terapias novedosas dirigidas a blancos múltiples (Sasidharan et al., 2014). Los productos naturales extraídos de plantas medicinales pueden ser fuentes ricas en sustancias con actividad biológica, y se ha observado que tienen efectos benéficos para la salud y además pueden prevenir ciertas enfermedades en humanos (Balunas y Kinghor, 2005).

2.6.1 AT para el tratamiento de HGNA

La AT es una estatina de segunda generación que disminuye los niveles de colesterol LDL por la inhibición competitiva de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMGCoA) reductasa (HMGCoAR), la cual es responsable de catalizar la conversión de HMGCoA a mevalonato, un paso clave en la síntesis *de novo* de colesterol. Las estatinas tienen una mayor afinidad por la enzima HMGCoA que el sustrato natural. Como resultado de la inhibición de esta enzima, la síntesis de colesterol se reduce del 10 al 60% dependiendo de la dosis empleada y del tipo de estatina (Williams y Feely, 2002). Se ha observado que una dosis diaria de 40 mg de AT en sujetos con hipercolesterolemia puede llegar a reducir hasta un 50 % el LDL, 29% los

triglicéridos e incrementar un 6% las concentraciones de HDL (Schachter, 2004). De todas las estatinas, la AT es la única que reduce significativamente las LDL remanentes (25.9%) (Naoumova, 1997). Es altamente soluble y permeable y es completamente absorbida después de su administración oral. En otro estudio también se observó un incremento en la concentración de HDL y la disminución en la concentración de TG (Li et al., 2010). A continuación se muestran diversos estudios realizados en pacientes y en modelos animales mostrando los efectos para mejorar el perfil de lípidos séricos (**Tabla 2**).

Tabla 2. Efecto hipolipemiante de la AT

AT 40 mg/día durante 12 semanas	22 hombres con hiperlipidemia	↓CT en suero (-37%) ↓LDL en suero (-50%) ↓TG (-29%) ↓apolB-48 (-24%)	Tremblay et al., 2011
AT 10 mg/día durante 12 semanas	164 pacientes con enfermedad coronaria	↓LDL en suero ↓TG en suero ↓CT en suero ↑HDL-C	Li et al., 2010
AT 10 mg/kg/día durante 3 meses	72 ratas SD	↓LDL en suero ↓TG en suero ↓CT en suero	Yasim et al., 2010
AT (20 mg/ día) durante 12 semanas	210 pacientes	↓LDL en suero (-45%) ↓TG en suero (-29%) ↑HDL-C (4%)	Crouse et al., 1999
AT (10 mg/día) durante 16 semanas	109 pacientes	↓LDL en suero (-51%) ↓TG en suero (-29%) ↑HDL-C (3%)	Farnier et al., 2000
AT (10 mg/día) durante 12 semanas	127 pacientes	↓LDL en suero (-35%) ↓TG en suero (-19%) ↓TC (-25%) ↑HDL-C (8%)	Davidson et al., 2001

También se han reportado otros efectos pleitrópicos de las estatinas incluyen acciones antiinflamatorias y antioxidantes en los vasos sanguíneos. De manera particular, la AT puede disminuir el estrés oxidativo de manera rápida y eficaz, lo cual se atribuye principalmente a los efectos antiinflamatorios y antioxidantes (Li et al., 2010). Se han realizado estudios tanto en sujetos como

en animales, los cuales reportan un efecto en la disminución de marcadores de estrés oxidativo atribuido al consumo de AT (**Tabla 3**).

Tabla 3. Efecto antioxidante de la AT

AT 10 mg/día durante 12 semanas	164 pacientes con enfermedad coronaria	↓niveles de MDA en plasma ↑ actividad de SOD, GPx y concentración de ON	Li et al., 2010
AT 5 mg/kg/día durante 15 semanas	40 conejos New Zealand	Inhibe la oxidación de LDL (LDL TBARS y dienos de LDL conjugados)	Sezer et al., 2011

Debido al evidente efecto hipolipemiante y a su actividad antioxidante, la AT puede tener un efecto benéfico en un modelo de HGNA en ratas.

2.6.2 LYC para el tratamiento de HGNA

El LYC es un carotenoide de color rojo presente en forma natural en los jitomates, toronja, sandía, papaya y otras frutas y verduras. Su estructura química de una cadena hidrocarbonada abierta con 11 dobles enlaces conjugados y 2 dobles enlaces no conjugados le confiere una alta actividad antioxidante (Britton, 1995). Es un antioxidante muy potente, ya que cuenta con un oxígeno singulete, tiene el doble de capacidad antioxidante que el β -caroteno y 10 veces más elevado que el α -tocoferol (DiMascio et al., 1989). El LYC se ha estudiado ampliamente en relación con sus efectos potenciales en la salud, por lo que existe basta literatura de sus efectos benéficos. Se han realizado estudios tanto en roedores como en humanos; en los cuales se ha reportado un efecto benéfico en el perfil de lípidos (**Tabla 4**).

Tabla 4. Efecto hipolipemiante del LYC en modelos animales

Tratamiento	Modelo animal	Efecto	Referencia
LYC (4-12 mg/kg durante 4 y 8 semanas)	Conejos	↓CT en suero ↓TG total en suero ↓LDL en suero	Hu et al., 2008
LYC (42.6-127.8 ppm)	Conejos	↓CT en suero ↓LDL en suero ↓ApoB ↓Actividad ACAT ↑HDL en suero ↑ApoA1	Verghese et al., 2008
LYC (5 mg/kg por 4 semanas)	Conejos NZW	↓CT en suero ↓LDL en suero ↑HDL en suero	Lorenz et al., 2012
LYC (10 mg/kg por 6 semanas)	Conejos NZW	Conejos NZW ↑HDL en suero	Mulkalwar et al., 2012
LYC de jitomate (100-800 ppm durante 10 semanas) o LYC puro (200 ppm durante 10 semanas)	Ratas	↓CT en suero ↓LDL en suero	Basuny et al., 2009
LYC (1-4 mg/kg durante 4-8 semanas)	Ratones diabéticos	↓CT en suero ↓LDL en suero ↑HDL en suero	Kuhad et al., 2008
Jugo de jitomate (contiene 1 mg/kg de LYC durante 4 semanas)	30 Ratas	↓Lípidos totales ↓CT en suero ↓LDL en suero ↑HDL en suero	Hassan y Edress, 2004
Jugo de jitomate <i>ad libitum</i> en vez de agua	16 Ratas	↓CT en suero ↓LDL en suero ↓HDL en suero ↓Actividad de HMGC _o A	Navarro-González et al., 2014

Un posible mecanismo sugiere, que el LYC disminuye los niveles de CT en suero al incrementar el colesterol excretado en las heces (Verghese et al., 2008). El LYC tiene un papel importante al mejorar el perfil de lípidos en suero y probablemente mejora la degradación de LDL (Arab y Steck, 2000). Las

apolipoproteínas ApoA1 y ApoB son marcadores de riesgo de enfermedades cardiovasculares, el ratio de ApoB/ApoA1 corresponde al balance proaterogénico y antiaterogénico de las lipoproteínas. El ratio de ApoA1/ApoB incrementa cuando el colesterol de la dieta aumenta y disminuye cuando incrementa el consumo de LYC en la dieta (Walldius et al., 2001, Verghese et al., 2008). También se observó una menor síntesis de colesterol, debido a una disminución en la actividad de la HMGCoAR en hígado y aciltransferasa (ACAT), dando como resultado una menor concentración en el colesterol hepático contribuyendo simultáneamente con un incremento en la excreción de colesterol fecal en los conejos alimentados con LYC (Verghese et al., 2008). En un estudio realizado en ratas, evaluaron el consumo de jugo de jitomate, y observaron que después de su absorción, el LYC se almacena principalmente en el hígado. Considerando que en el hígado se lleva a cabo el metabolismo de lípidos, la presencia de LYC se correlaciona con el efecto de disminución de colesterol observado en ratas que tomaron jugo de jitomate al compararlo con las que no tomaron jugo (Navarro-González et al., 2014). La síntesis de colesterol es catalizada por la enzima HMGCoAR. El LYC puede disminuir la síntesis de colesterol en cultivos celulares inhibiendo la enzima HMGCoAR (Fuhrman et al., 1997) o disminuyendo la expresión (Palozza et al., 2011). Navarro-González y colaboradores (2014) hipotetizan dos posibles mecanismos *in vivo*: 1) una disminución en la actividad de la HMGCoAR y 2) una reducción en la síntesis de la HMGCoAR en el hígado. El efecto hipocolesterolémico se debió a la disminución en la actividad de la enzima HMGCoAR en el hígado de las ratas, pero no en la expresión genética. La inhibición a nivel post-transcripcional es por inhibición competitiva de esta enzima, ya que el LYC, así como otros carotenoides son poliisoprenoides sintetizados en plantas por la ruta del mevalonato. El LYC interactúa en el sitio activo de la HMGCoAR y forma un complejo similar al formado entre el sustrato de la HMGCoA y la cerivastatina con la enzima. Tomando en cuanto esto, los autores proponen que el LYC compite con HMGCoA, impidiendo la formación de mevalonato y por consiguiente reduciendo la síntesis de colesterol. Las HDL tienen propiedades

antiaterogénicas, incluyendo la inhibición de la oxidación de LDL, pero la propiedad mejor caracterizada es la eliminación del colesterol de las células, especialmente de los macrófagos. Las HDL recuperan el colesterol de otros tejidos en el cuerpo para devolverlo al hígado para su excreción en la bilis o en las heces. Este transporte es llamado transporte inverso del colesterol y cuanto más HDL, más fácilmente tiene lugar el transporte y es menos probable que los macrófagos se desarrollen como células espumosas (Stryer et al., 2013).

Este efecto antilipemiante del LYC también ha sido ampliamente reportado en sujetos. A continuación se resumen algunos estudios realizados con LYC o jitomate (**Tabla 5**).

Tabla 5. Efecto hipolipemiante del LYC en sujetos

Tratamiento	No. de sujetos	Efecto	Referencia
LYC (60 mg/día durante 3 meses)	6 hombres	↓del 14 % LDL en suero	Fuhrman et al., 1997
Cápsulas de jitomate (4 mg/día de LYC durante 6 meses)	41 mujeres postmenopáusicas	↓CT en suero ↓LDL en suero	Misra et al., 2006
400 ml de jugo de jitomate y 30 mg de cátsup diariamente durante 3 semanas	21 sujetos sanos	↓6 % CT en suero ↓13 % LDL en suero	Silaste et al., 2007
≥ 25 mg de LYC diarios	12 estudios en sujetos (meta-análisis)	↓CT en suero ↓LDL en suero	Ried, 2011
20.6 mg de LYC diarios	24 voluntarios sanos	↓CT en suero	Jacob et al., 2008
200 g jitomate crudo durante 8 semanas	32 pacientes diabéticos	↑apoA-I	Shidfar et al., 2011

El LYC ha sido considerado como un poderoso antioxidante en un estudio en pacientes diabéticos los cuales fueron suplementados con 10 mg/día de LYC durante 2 meses. Los niveles de MDA en suero disminuyeron en comparación con el grupo placebo (Neyertani, 2007). En otro estudio se suplementó a voluntarios sanos con 15 mg/día de LYC durante una semana y en sus linfocitos se observó una prevención significativa del daño inducido al DNA por H₂O₂ (Torbergesen y Collins, 2000). Se detectó un incremento en los niveles de LYC en suero después de suplementar con 15 mg/día de LYC durante 8 semanas. Este incremento se asoció con la disminución en la longitud de la cola en ADN de linfocitos en un ensayo cometa realizado a sujetos sanos, así como un incremento en la actividad de SOD en plasma (Kim et al., 2011). El consumo de 500 ml/día de jugo de jitomate comercial durante 4 semanas incrementó los niveles de LYC en plasma y la resistencia de las LDL a la oxidación en pacientes con diabetes (Upritchard et al., 2000). En otro estudio realizado por Hadley et al. (2003), en el cual se suplementaron con productos de jitomate a sujetos sanos durante 15 días, se aislaron sus lipoproteínas y se evaluó su resistencia al daño oxidativo. Además, la fase lag, usada como una medida para evaluar la capacidad antioxidante, incrementó significativamente después del consumo de productos con jitomate durante 15 días.

En un estudio realizado en conejos alimentados con una dieta alta en grasa a los cuales les suplementaron vía intragástrica LYC 4-12 mg/kg durante 4 y 8 semanas, se obtuvo una disminución en los niveles de MDA y un incremento en la capacidad antioxidante total (Hu et al., 2008). También se reportó que el consumo elevado de jugo de jitomate y catsup (27 mg de LYC/día) durante 3 semanas incrementó la resistencia a la oxidación de las LDL en adultos sanos normocolesterolémicos (Silaste et al., 2007). Por su parte en otro estudio en donde se evaluó el efecto de un suplemento con jitomate cocido durante 30 días a un grupo de 40 sujetos con DMT2 de 35-55 años, de ambos sexos, no fumadores y sin complicaciones diabéticas, se evaluaron los marcadores de estrés oxidativo: SOD, GPx, GR y GSH, así como la lipoperoxidación. Esto se midió antes del suplemento, a los 15 y a los 30 días

de estar tomando el suplemento. Se observó que hay una mejora en los niveles de enzimas antioxidantes y disminuyó la tasa de lipoperoxidación sugiriendo que el suplemento con LYC a partir del jitomate puede ser una estrategia adecuada para prevenir estrés oxidativo en pacientes diabéticos (Subhash y Agrawal 2007). También se realizó otro estudio para evaluar las propiedades antioxidantes de productos derivados del jitomate como el jugo de jitomate o la salsa de spaghetti, en 19 voluntarios sanos a los cuales se les dio durante 1 semana cada una de estas fuentes de LYC. Se obtuvieron muestras de sangre y se midió por HPLC el LYC en suero, el cual aumentó significativamente y los niveles de TBARS disminuyeron (Rao y Agarwal, 1998).

Los mecanismo por los cuales el LYC se considera un antioxidante son dos principalmente, uno es que el mismo compuesto atrape directamente las ERO, debido a su estructura química, al ser uno de los antioxidantes más potentes, tiene el doble de capacidad para atrapar un oxígeno siguelete que el β -caroteno y 10 veces mayor que le α -tocoferol; otro mecanismo es su capacidad de regular la transcripción de enzimas antioxidantes y el GSH (DiMascio et al., 1989).

3. JUSTIFICACIÓN

México está experimentando una transición nutricional y, como consecuencia de ello, la prevalencia combinada de sobrepeso u obesidad ha aumentado, alcanzando el 73% para las mujeres y de 69.4% para los hombres (ENSANUT 2012). Este incremento ha derivado en el aumento de enfermedades crónico degenerativas, entre ellas el HGNA (Clark, 2006). Aunado a lo anterior, existe además una relación entre el sobrepeso y la obesidad con el aumento de citocinas circulantes y las EROS en el torrente sanguíneo (Eckel, 2005), los cuales también se ha comprobado que contribuyen con diversos trastornos hepáticos, entre ellos el desarrollo del HGNA.

De acuerdo a lo anterior, la teoría de “dos ataques” es la más aceptada para entender el desarrollo y la progresión del HGNA a la EHNA, en la cual en el “primer ataque” hay una acumulación de TG en los hepatocitos y posteriormente en el “segundo ataque” causado por el estrés oxidativo, es determinante para la peroxidación de lípidos, disfunción mitocondrial, aumento en la producción de citocinas e inflamación, lo cual resulta en la EHNA (Bernal, 2013).

Actualmente no existen tratamientos para el HGNA, por lo que los cambios en el estilo de vida, como el ejercicio y una dieta adecuada, son las estrategias más usadas para su tratamiento.

Existen numerosos estudios los cuales sugieren el uso de algunos compuestos nutracéuticos para prevenir el desarrollo del HGNA; sin embargo, para la gran mayoría de estos compuestos no se ha evaluado su contribución como parte del tratamiento. Por lo anterior, en este estudio se propone el uso de la AT y el LYC, cuyas propiedades antilipemiantes y antioxidantes han sido reportados ampliamente, lo cual puede ser determinante para evitar el desarrollo y la progresión de EHNA. El uso de una dieta adecuada debe ser

complementario en el manejo integral para evitar el deterioro progresivo en estos trastornos hepáticos.

4. HIPÓTESIS

La inclusión de una dieta adecuada, así como el consumo de AT y/o LYC, que debido a sus efectos hipolipemiente y antioxidante pueden coadyuvar en el tratamiento integral para disminuir la esteatosis hepática en ratas.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del tratamiento con atorvastatina y/o licopeno, aunado a un cambio de dieta, en un modelo de hígado graso no alcohólico inducido con una dieta alta en grasa en ratas.

6. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la respuesta en la inducción de dos enzimas antioxidantes (SOD y CAT) en suero de rata tratadas con las dosis de AT (20 mg/kg/d y 50 mg/kg/d) y LYC (20 mg/kg/d).
2. Implementar un modelo de HGNA inducido con una dieta alta en grasa en ratas.
3. Evaluar la recuperación del HGNA en ratas con el cambio de dieta, junto con el tratamiento de AT y/o LYC, en los siguientes indicadores: el perfil de lípidos, metabolismo de carbohidratos, enzimas de daño hepático, marcadores de estrés oxidativo y morfología hepática.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Compuestos para el tratamiento de HGNA

La AT se obtuvo de la Farmacia Guadalajara, Querétaro de la marca Pharma Check, en presentación de tabletas de 30 mg, usando el mismo lote comercial para todos los experimentos.

El LYC fue de la marca LycoVit® 10% DC, BASF The Chemical Company, Denmark, adquirido a través de la empresa Cindetec, Parque Industrial Querétaro, Querétaro.

7.2 Material biológico

Para el estudio piloto se emplearon ratas macho de la cepa Sprague Dawley de 180 ± 10 g, adquiridas en el bioterio de la UNAM campus Juriquilla. Para la segunda etapa, las ratas de las mismas características fueron compradas a Harlan Laboratories, Mexico S.A.(CDMX, México).

7.3 Evaluación del efecto de los compuestos en ratas

La primera fase de este proyecto consistió en llevar a cabo un estudio piloto con la finalidad de evaluar la inducción de las enzimas antioxidantes (SOD y CAT) en el suero de las ratas, a los cuales se les administró AT y/o LYC durante 2 semanas, y con base en los resultados usar posteriormente estos compuestos en un modelo de HGNA. Para esta fase se utilizaron 24 ratas, las cuales se aclimataron durante una semana en condiciones de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad a una temperatura de 25 ± 3 °C con ciclos de humedad controlados, con agua y alimento ad libitum. Se utilizaron jaulas de policarbonato con capacidad para 6 ratas. Los animales se dividieron en 4 grupos: dieta normal durante 2 semanas (ND-2s), AT 50 mg/kg/d durante 2 semanas (AT50-2s); LYC 20 mg/kg/d durante 2 semanas (LYC20-2s); AT 50

mg/kg/d + LYC 20 mg/kg/d durante 2 semanas (AT50+LYC20-2s). Ambos compuestos se administraron diariamente vía intragástrica a través de una sonda. Una vez transcurridas las dos semanas, los animales fueron sacrificados para determinar la actividad de las enzimas antioxidantes en el suero. Los animales se pesaron al inicio del experimento, al final de cada semana y al término del experimento antes de ser sacrificados.

Después de la obtención y el análisis de los resultados del estudio piloto, se llevó a cabo la segunda fase del proyecto el cual se dividió en dos etapas. En la primera etapa el objetivo fue establecer un modelo de esteatosis en ratas Sprague Dawley a través de una HFD (dieta alta en grasa, siglas en inglés) durante 4 semanas, y en la segunda etapa el objetivo fue evaluar la recuperación del HGNA generado, mediante cambio en la dieta de HFD a ND, suplementado o no con AT y/o LYC. Para esta segunda etapa, se utilizaron un total de 82 ratas SD machos de 180 ± 10 g, la cuales se adquirieron en Harlan Laboratories, Mexico S.A. Las ratas se aclimataron durante una semana en condiciones de 12 horas de luz, 12 horas de oscuridad a una temperatura de 25 ± 3 °C con ciclos de humedad controlados, con agua y alimento estándar *ad libitum*. Se utilizaron jaulas individuales de acero inoxidable. Los animales se dividieron de manera aleatoria en 8 grupos: dieta normal durante cuatro semanas (ND-4s); dieta alta en grasa durante cuatro semanas (HFD-4s); dieta normal durante 8 semanas (ND-8s); dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal durante 4 semanas (HFD-4s+ND-4s); dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal y AT durante 4 semanas (HFD-4s+ND+AT-4s); dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal y LYC durante 4 semanas (HFD-4s+ND+LYC-4s); dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal, AT y LYC durante 4 semanas (HFD-4s+ND+AT+LYC-4s). La AT (50 mg/kg) y el LYC (20 mg/kg) fueron administrados diariamente vía intragástrica. Los grupos ND-4s y ND-8s recibieron vía intragástrica agua que fue el vehículo para disolver la AT y una emulsión de agua y aceite que fueron el vehículo del LYC. La dieta HFD se preparó con los siguientes ingredientes: 2.5% colesterol, 10% sacarosa, 10%

manteca vegetal hidrogenado, 1% colato de sodio, 10% lactosa, 0.2% cloruro de colina, 0.15% tiouracilo y 66.225% alimento estándar de Harlan México S.A. de C.V. (Ramesh et al., 2008). Esta dieta se les proporcionó a los animales durante 4 semanas y, una vez transcurrido este tiempo, las ratas de los grupos ND-4s y HFD-4s fueron sacrificadas para determinar la obtención del modelo de HGNA y su caracterización. Las ratas de los grupos no sacrificados en la etapa inicial, recibieron ND y los tratamientos correspondientes de acuerdo a su grupo experimental durante 4 semanas. Las ratas del grupo ND-8s recibieron ND durante las ocho semanas.

Para poder evaluar el metabolismo de carbohidratos, tres días antes del sacrificio se realizó una curva de tolerancia a la glucosa. Al término del período correspondiente los animales se sacrificaron para la obtención de plasma, suero, eritrocitos, aorta, hígado, tejido adiposo y riñón. La mitad de las muestras de los hígados fueron guardadas en paraformaldehído al 4 % para posteriormente ser procesadas para el estudio histológico de acuerdo a la metodología del laboratorio de histopatología de la Facultad de Medicina de la UAQ. Mientras que la otra mitad de los hígado y el resto de los órganos, se ultracongelaron con nitrógeno líquido y posteriormente fueron almacenadas a -70°C hasta su posterior análisis. El peso de las ratas se evaluó semanalmente y el consumo del alimento 3 veces a la semana durante el período experimental. El agua y alimento se proporcionaron diariamente. Para medir el consumo de alimento, se utilizaron comederos especiales para evitar la dispersión y pérdida del alimento. Diariamente se les proporcionó a cada animal 30 g de alimento y 24 horas después se pesó el alimento sobrante en el recipiente para cuantificar por diferencia el consumido.

7.4 Metabolismo de carbohidratos

La curva de tolerancia a la glucosa mide la capacidad que tiene el organismo para metabolizar la glucosa. Esta prueba se realizó después de un

ayuno de 12 horas, y se midió la glucosa basal en sangre periférica, inmediatamente se administró vía intragástrica una carga de glucosa de 2 g/kg de peso corporal. A los 30, 60, 90 y 120 minutos después de la administración de la glucosa, se tomó una gota de sangre cortando la cola de la rata, en la que se midió la concentración de glucosa en sangre utilizando un glucómetro de Accu-Check® system (Roche, Germany) y sus tiras respectivas.

7.5 Perfil de lípidos (TG, CT, LDL y HDL) y determinación de TG y CT en hígado

Veinticuatro horas después del último tratamiento, los animales se anestesiaron por inhalación de éter, para la obtención de muestras de sangre a través de punción cardíaca, la sangre se centrifugó a 3000 g a 4°C por 10 min, el suero y plasma se almacenaron a -70°C para posteriormente ser usado en los análisis correspondientes. Para las determinaciones de CT, TG, LDL y HDL en suero se utilizaron kits comerciales de (ELI Tech, France). Las determinaciones de TG y CT en hígado se realizaron de acuerdo al método de Folch et al. (1957), en donde los tejidos se homogenizan en un politrón con una mezcla de (v/v) de cloroformo-metanol 2:1, se agita durante 15 a 20 minutos en un agitador orbital y se filtra. La fase solvente se enjuaga con una solución de 4 ml de NaCl, se agita en un vortex, posteriormente la mezcla se centrifuga a 2000 rpm. La fase del cloroformo contiene los lípidos, de los cuales se evapora el solvente mediante vacío, y los TG y CT se determinan de acuerdo con enzimas empleando un kit comercial (ELI Tech, Francia).

7.6 Sistemas de defensa antioxidantes: SOD, CAT, GPx y MDA

La actividad de la SOD se evaluó por el método de McCord y Fridovich (1969), usando el kit de la marca Fluka. Mientras que la actividad de la CAT se midió por el método de Aebi (1983). Para la determinación de la CAT, la reacción comienza al agregarse el H₂O₂ y se monitorea el decremento en la absorbancia

a 240 nm por un periodo de 30 segundos basados en la velocidad de descomposición del H₂O₂. La actividad de GPx se evaluó por el método de Plagia y Valentine (1976), el cual se basa en la oxidación de GSH a glutatión oxidado (GSSG) catalizada por GPx. La lipoperoxidación se determinó por la reacción del ácido tiobarbitúrico con el malondialdehído (MDA), un producto derivado de la peroxidación tisular de los lípidos (Wright et al., 1981). El nivel de peróxidos de lípidos se expresó como nmoles de MDA formados/mg de proteína.

7.7 Enzimas de daño hepático: AST y ALT

Para evaluar las enzimas de daño hepático AST (aspartato amino transferasa) y ALT (alanino amino trasferasa) se utilizaron los kits de la marca Spinreact (España).

7.8 Estudio macroscópico y microscópico

Una vez extraídos los órganos fueron pesados, y sumergidos en una solución de formol amortiguado para después incluir un pedazo del órgano en parafina, obtener cortes y teñirlos con hematoxilina eosina. Para evaluar el daños se utilizó la clasificación de Brunt et al. (1999), en donde en una escala del 0 al IV determinan el grado de afectación, en donde 0 es que no se presenta daño, I son pocas vacuolas y dispersas, II vacuolas de grasa dispersas en zona 3, III vacuolas de grasa en zonas 2 y 3 y IV numerosas vacuolas de grasa en zonas 2 y 3. La evaluación fue realizada por el Dr. Marco Gallegos, patólogo de la Facultad de Medicina de Universidad Autónoma de Querétaro, Qro, México.

7.9 Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como el promedio \pm error estándar (SE), o la desviación estándar (SD). Las diferencias entre los grupos ND-4s and HFD-4s fueron determinadas por *t* test o por rank sum test. Las diferencias entre los grupos tratados fueron evaluadas por ANOVA seguida por una comparación de medias de Tukey test. Se realizó un test de χ^2 para el análisis de la esteatosis, en el cual el nivel de significancia estadística fue $P < 0.1$.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Estudio piloto

La primera fase de este proyecto consistió en llevar a cabo un estudio piloto con la finalidad de evaluar la inducción de las enzimas antioxidantes (SOD y CAT) en ratas al administrar AT y/o LYC.

8.2 Enzimas antioxidantes en suero (SOD y CAT)

En los mamíferos, las EROS son secuestradas por las enzimas antioxidantes, como SOD, CAT, GPx y GR, así como por sustancias antioxidantes como vitaminas y GSH (Konigsberg, 2008).

En este trabajo se evaluó la inducción de las enzimas antioxidantes (SOD y CAT) en suero de ratas SD, a las cuales se les administró AT 50 mg/kg/d (AT50) (Wassmann et al., 2002) y LYC 20 mg/kg/d (LYC20) (Liu et al., 2008; Bignotto et al., 2009) durante 2 semanas.

Se observó una inducción significativa en la actividad sérica de SOD en las ratas a las que se administró LYC durante 2 semanas (LYC20-2s) con respecto al grupo normal (ND-2s) (**Figura 3**). Estudios previos reportaron un aumento en los niveles de SOD, GPx y GR en suero de pacientes diabéticos que consumieron 200 g de jitomate como fuente de LYC durante 30 días (Subhash et al., 2007). Por su parte, Kim y colaboradores (2011) reportaron un aumento en la actividad de SOD en plasma de sujetos suplementados con 15 mg de LYC durante 8 semanas. De manera similar, en otro estudio realizado por Breinholt y colaboradores (2000) reportaron un aumento significativo en la inducción GR y GPx en eritrocitos de ratas tratadas con LYC a la dosis de 0.005 g/kg peso corporal por día, y de SOD a las dosis de 0.005 y 0.05 g/kg peso corporal por día.

Es de interés mencionar que la administración de atorvastatina disminuye la actividad de la SOD en el suero de las ratas (**Figura 3**). Dicha disminución no es estadísticamente significativa en el grupo de ratas que solo recibió la atorvastatina; sin embargo, en el grupo que recibió el licopeno y la atorvastatina, el aumento en la actividad de SOD promovido por el licopeno no se observa debido a la presencia de la atorvastatina.

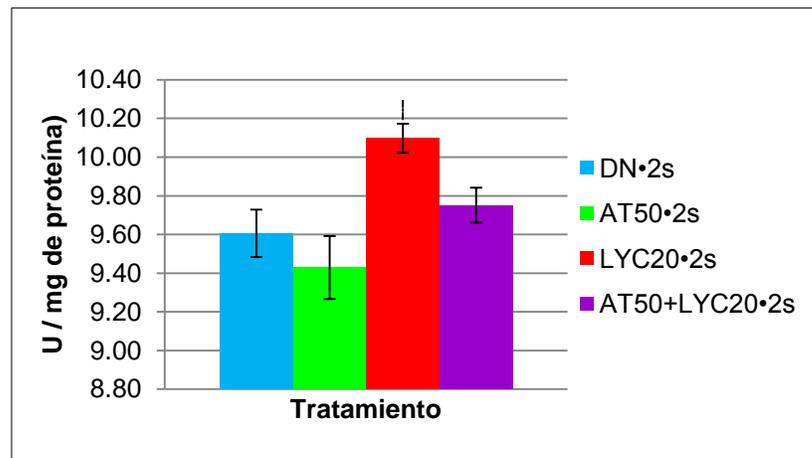


Figura 3. Actividad enzimática de SOD en suero. DN·2s = dieta normal 2 semanas; AT50·2s = AT 50 mg/kg/d 2 semanas; LYC20·2s = LYC 20 mg/kg/d 2 semanas; AT50+LYC20·2s = AT 50 mg/kg/d + LYC 20 mg/kg/d 2 semanas. *Diferencia significativa vs grupo ND·2s con la prueba t-test $P < 0.05$.

En los grupos AT50·2s, LYC20·2s y AT50+LYC20·2s se observó una inducción significativa en la actividad de CAT en el suero de las ratas (**Figura 4**). Estudios previos realizados por Broncel y colaboradores (2006) observaron un aumento significativo en las enzimas antioxidantes (CAT, GPx y SOD) en eritrocitos de pacientes tratados con AT (10 mg/d) durante 4 semanas.

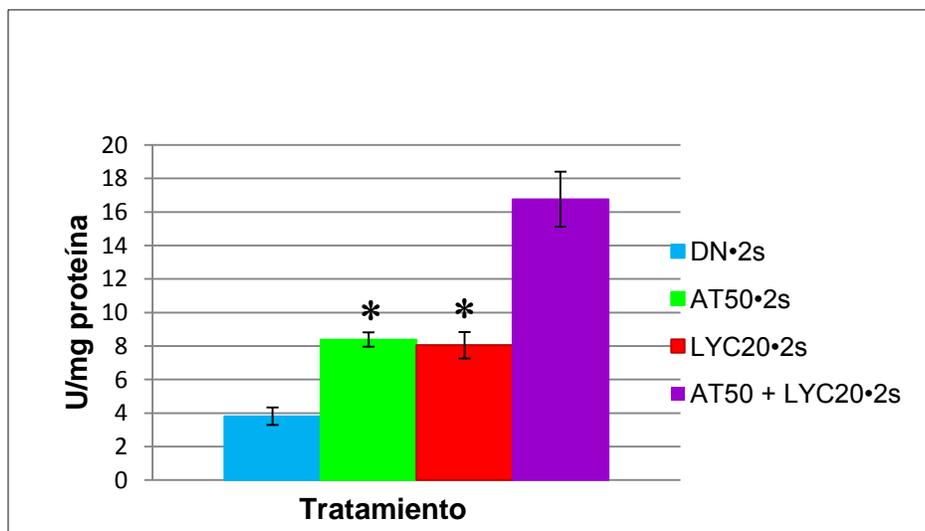


Figura 4. Actividad enzimática de CAT en suero. DN-2s = dieta normal 2 semanas; AT50-2s = AT 50 mg/kg/d 2 semanas; LYC20-2s = LYC 20 mg/kg/d 2 semanas; AT50+LYC20-2s = AT 50 mg/kg/d + LYC 20 mg/kg/d durante 2 semanas. *Diferencia significativa vs grupo ND-2s con la prueba t-test $P < 0.05$.

8.3 Peso corporal y ganancia de peso

En las **figuras 5 y 6** se presentan los resultados del peso corporal y de la ganancia de peso de las ratas durante las 2 semanas del período experimental, respectivamente. Se puede observar que los compuestos empleados no afectaron ni el peso corporal, ni la ganancia de peso de los animales usados.

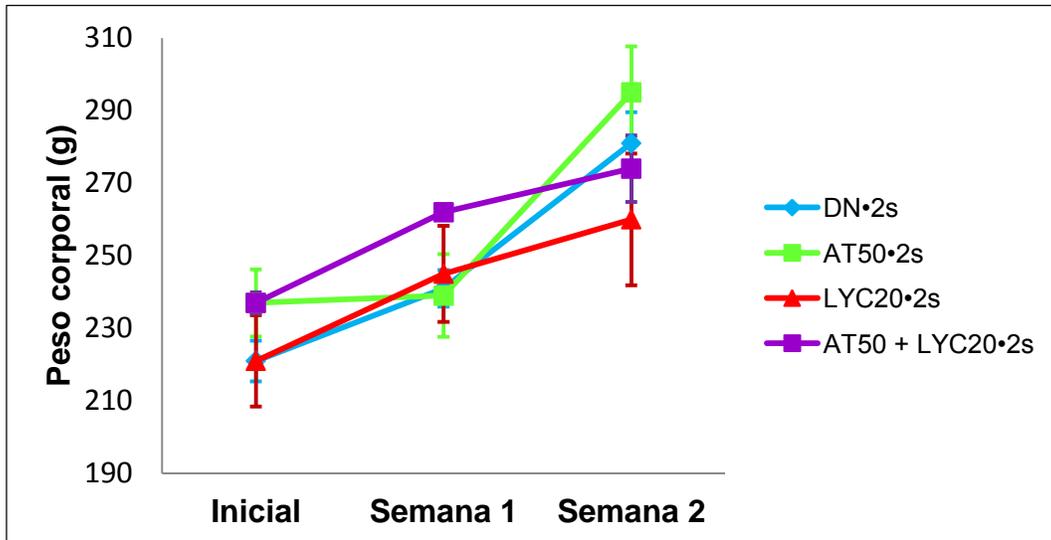


Figura 5. Peso corporal de las ratas control con los tratamientos de AT y/o LYC. Los datos se presentan como la media \pm EE. DN•2s = dieta normal 2 semanas; AT50•2s = AT 50 mg/kg/d 2 semanas; LYC20•2s = LYC 20 mg/kg/d 2 semanas; AT50+LYC20•2s = AT 50 mg/kg/d + LYC 20 mg/kg/d 2 semanas.

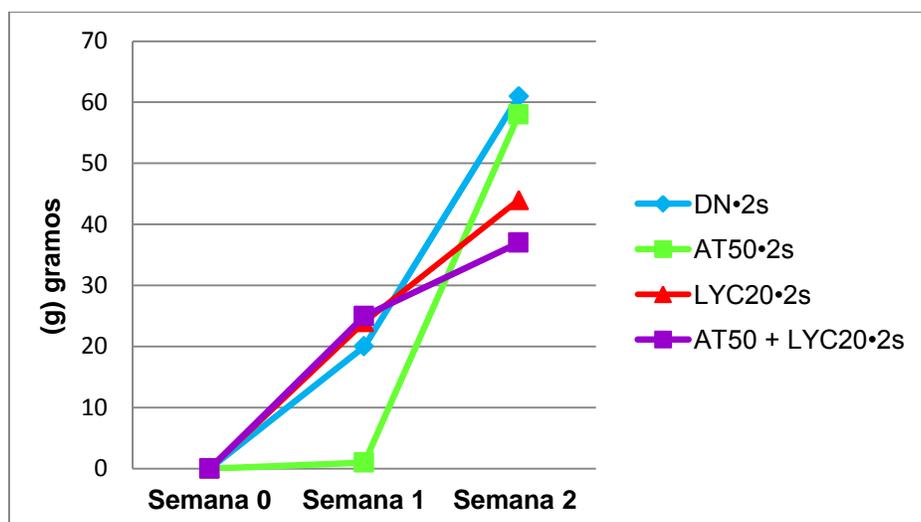


Figura 6. Ganancia de peso de las ratas control con los tratamientos de AT y/o LYC. Los datos se presentan como la media \pm EE. DN·2s = dieta normal 2 semanas; AT50·2s = AT 50mg/kg/d 2 semanas; LYC20·2s = LYC 20 mg/kg/d 2 semanas; AT50+LYC20·2s = AT 50 mg/kg/d + LYC 20 mg/kg/d 2 semanas.

8.4 Conclusiones del estudio piloto

A partir de los resultados del estudio piloto se concluyó que los animales tratados con LYC por sí sólo, así como los tratados con la combinación de AT y LYC, presentaron una mejora en el promedio de la inducción de las enzimas SOD y CAT en suero. El efecto sinérgico observado en la inducción de CAT, sugiere que cada una de los compuestos esté actuando a través de mecanismos diferentes, por lo que la respuesta observada en la inducción de CAT es sinérgica.

Se ha propuesto que el estrés oxidativo actúa como “segundo ataque” en la patogénesis del esteatosis a EHNA y fibrosis (Day y James, 1998). Por lo cual, se justifica el uso de compuestos antioxidantes que recuperen el desequilibrio en el manejo de las ERO y contrarresten el estado de estrés oxidativo presente en el HGNA, evitando así el desarrollo y progresión de

HGNA a EHNA (Yalniz, 2007). El aumento de radicales libres, así como la disminución de las enzimas antioxidantes, han sido reportados en suero de pacientes con HGNA (Pan, 2014).

En conclusión, el estudio piloto permitió seleccionar las dosis de AT (50 mg/kg) y LYC (20 mg/kg) a las cuales se obtuvo alguna respuesta favorable, para su uso durante la segunda fase de este proyecto.

8.5 Implementación y caracterización del modelo de HGNA con HFD durante 4 semanas. Primera etapa.

8.6 Ingesta calórica, peso corporal y peso del hígado

En esta etapa del proyecto el objetivo fue establecer y caracterizar el modelo de hígado graso en ratas SD alimentadas con HFD durante 4 semanas.

Los resultados obtenidos al finalizar las 4 semanas de dieta demuestran que no se presentaron diferencias significativas en el consumo diario del alimento entre los grupos ND-4s y HFD-4s (**Tabla 6**).

Los resultados del peso corporal de los animales indican que las ratas del grupo ND-4s tuvieron un peso significativamente mayor (13%) con respecto al grupo HFD-4s (**Tabla 6**). En concordancia con los datos previos, el consumo de alimento mostró una tendencia no significativa en el grupo de ratas con HFD (**Tabla 6**). En un estudio previo realizado por Ji y colaboradores (2011) se observó que las ratas que recibieron HFD para inducir HGNA, presentaron un menor incremento en su peso corporal al compararlas con las ratas que consumieron la dieta normal. Existen estudios los cuales demuestran que ratas que recibieron dietas con un alto contenido de grasa presentaron anorexia, afectando el consumo de alimento y disminuyendo con ello su ganancia de peso (Tuomisto et al., 1999).

En cuanto a los resultados del peso del hígado, se puede observar que éste fue significativamente mayor en las ratas del grupo HFD-4s, en comparación con del grupo DN-4s (**Tabla 6**). Estos resultados concuerdan con Ji y colaboradores (2011), quienes obtuvieron un aumento significativo en el peso de los hígados de ratas SD macho alimentadas con una HFD durante 12 semanas.

Tabla 6. Cambios en diferentes parámetros después de 4 semanas de alimentación con ND o HFD

Parámetros	ND-4s	HFD-4s	Valor <i>P</i>
Peso corporal (g)	308.0 ± 11.1	272.0 ± 12.0	0.001
Consumo de alimento (Kcal/d)	70.8 ± 1.6	63.0 ± 5.3	0.486
	11.3 ± 0.4	17.3 ± 0.6	0.001
Peso de hígado (g)			
TG suero (mg/dL)	59.2 ± 6.2	201.7 ± 11.8	0.001
TC suero (mg/dL)	130.2 ± 2.2	436.5 ± 19.6	0.001
HDL suero (mg/dL)	40.2 ± 2.4	82.3 ± 7.6	0.002
LDL suero (mg/dL)	11.2 ± 1.2	346.3 ± 6.0	0.029
TG hígado (mg/100 mg)	24.6 ± 1.9	83.7 ± 1.4	0.001
TC hígado (mg/100 mg)	19.6 ± 0.3	52.3 ± 0.4	0.001
AST suero (U/L)	114.0 ± 10.5	136.0 ± 8.9	0.115
ALT suero (U/L)	57.0 ± 4.6	125.0 ± 11.4	0.001
SOD hígado (U/mg prot)	16.6 ± 1.2	11.4 ± 1.6	0.015
CAT hígado (U/mg prot)	254.9 ± 11.5	240.2 ± 6.7	0.295
GPx hígado (U/mg prot)	4.67 ± 0.1	3.01 ± 0.2	0.001
MDA hígado (nM/mg prot)	0.51 ± 0.02	0.85 ± 0.03	0.001

Los valores son los promedios ± EE de seis ratas en cada grupo. Las diferencias estadísticas entre los grupos de ratas se calcularon por la prueba t-test. ND-4s, dieta normal durante cuatro semanas; HFD-4s, dieta alta en grasa durante cuatro semanas; TG, triglicéridos; TC, colesterol total; HDL, lipoproteínas de alta densidad; LDL, lipoproteínas de baja densidad; AST, aspartato aminotransferasa; ALT, alanino aminotransferasa; SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa.

8.7 Perfil de lípidos en suero y en tejido hepático

En los resultados obtenidos en el perfil de lípidos se pueden observar concentraciones significativamente más elevadas de TG, CT, HDL y LDL en suero de las ratas del grupo HFD-4s al compararlas con el grupo ND-4s (**Tabla 6**). Estos resultados son similares a los reportados por Hatzis y colaboradores (2013), en donde se presentaron concentraciones significativamente más elevadas de TG, CT, HDL y LDL en suero de ratas Wistar alimentadas durante 4 semanas con HFD en comparación con el grupo control. Por su parte, Xia y colaboradores (2013) reportaron resultados similares en ratas SD alimentadas con HFD durante 18 semanas provocando un aumento significativo en TC, TG y LDL en suero.

En cuanto a las concentraciones de TG y CT en hígado (**Tabla 6**), se observó que en el grupo HFD-4s aumentó 3.38 veces el contenido de TG y de 3.35 veces el contenido de CT al compararlo con el grupo ND-4s. Por su parte, Ji y colaboradores (2011) realizaron un estudio en ratas SD alimentadas con una DHF durante 20 semanas, obteniendo niveles significativamente más elevados de TG y CT en hígado con respecto al grupo de ratas sanas.

8.8 Indicadores de daño hepático (ALT y AST)

Las enzimas ALT Y AST son comúnmente utilizadas como marcadores de daño hepático (Goorden et al., 2013), por lo cual se evaluaron en el suero de las ratas de los diferentes grupos experimentales. El promedio en la actividad de ALT fue significativamente mayor en el suero del grupo de ratas HFD-4s que en el grupo ND-4s (**Tabla 6**). Estos datos concuerdan con los reportados por Ji y colaboradores (2011), quienes obtuvieron niveles significativamente más elevados de ALT y AST en suero de las ratas alimentadas con una HFD durante 20 semanas en comparación del grupo normal. De manera similar, Yalniz y colaboradores (2006) observaron que ratas SD alimentadas con HFD durante 6 semanas mostraron valores significativamente más elevados de AST y ALT en

suero al compararlas con el grupo control. Por su parte, Ramesh y colaboradores (2009) reportaron que en ratas Wistar alimentadas con HFD durante 30 días, el promedio de la actividad de AST y ALT en suero fue significativamente más elevado que en ratas normales. Las dietas denominadas HFD en ratas, son aquellas en las cuales el 60 % de la energía proviene de grasa, las cuales pueden ser de origen animal o vegetal (Buettner et al., 2006; Sutherland et al., 2008).

8.9 Marcadores de estrés oxidativo

Con el fin de proteger a los tejidos de posibles daños causados por las EROS, el organismo tiene sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Parthasarathy et al., 2009). La protección contra las EROS y sus productos derivados de la lipoperoxidación y la oxidación de proteínas, está dado por enzimas como CAT, SOD, GPx y GST. Una disminución en la actividad de estas enzimas se ha asociado con la acumulación de radicales altamente reactivos, llevando a fallas y pérdida en la integridad y funciones de las membranas celulares (Sheela y Augusti, 1995). Otros estudios han reportado que HFD causan una disminución en la actividad de CAT, SOD, GPx y GST en muestras de hígado (Ramesh et al., 2008). También se ha reportado que el estrés oxidativo ejerce un papel determinante en la progresión de HGNA a EHNA (Day y James, 1998).

En el presente estudio se evaluó la actividad de tres enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx) en el hígado. La actividad de SOD y GPx fue significativamente menor en el grupo HFD-4s que en el grupo ND-4s; sin embargo, la actividad de CAT no presentó diferencias significativas (**Tabla 6**). En un estudio realizado en ratas Wistar alimentadas con HFD durante 30 días, se obtuvieron niveles significativamente menores en la actividad de las enzimas CAT, SOD y GPx en hígado al compararlas con el grupo normal (Ramesh et al., 2009). Por su parte, Xia y colaboradores (2013) obtuvieron una menor actividad

de SOD en el hígado de ratas alimentadas con HFD durante 18 semanas al comprarlas con el grupo control.

El MDA es un marcador de la peroxidación de lípidos (Wright et al., 1981). Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que se obtuvieron niveles significativamente elevados de MDA (1.6 veces) en el hígado de las ratas del grupo HFD-4s en comparación con el hígado del grupo ND-4s (**Tabla 6**). En un estudio realizado por Yalniz y colaboradores (2006), también se alcanzaron niveles significativamente más elevados de MDA en hígado de las ratas alimentadas con una HFD durante 6 semanas en comparación con el grupo control. Este resultado concuerda con el reportado por Xia y colaboradores (2013), en donde ratas SD alimentadas con HFD durante 18 semanas aumentan significativamente los niveles de MDA en hígado en comparación con el grupo control sano.

8.10 Metabolismo de carbohidratos

La prueba de tolerancia a la glucosa se considera un indicador de riesgo para el desarrollo de HGNA (Muniyappa et al., 2008; Hsiao et al., 2013), por tal motivo se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa en una muestra de sangre de las ratas. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 7**, en donde se puede observar que se detectó un aumento significativo de la glucosa al inicio, y al minuto 30, 60, 90, 120, 150 y 180 después de haber administrado la carga de sacarosa en el grupo HFD-4s en comparación con el grupo ND-4s. Estudios previos realizados por Bahcecioglu y colaboradores (2010) reportaron un aumento de glucosa en sangre en ratas SD alimentadas con HFD. En otro estudio realizado por Martín-Pozuelo y colaboradores (2014), ratas SD alimentadas con HFD durante 5 semanas tuvieron concentraciones más elevadas de glucosa en plasma en comparación con el grupo control.

En el presente proyecto, al realizar la curva de tolerancia a la glucosa, las ratas alimentadas con HFD tuvieron una mayor concentración de glucosa en

sangre y estos animales tardaron más tiempo en regresar a sus niveles basales de glucosa en sangre, lo cual se asocia con resistencia a la insulina. Además este grupo de ratas presentó un esteatosis grado II y III, apoyando la relación entre la resistencia a la insulina y el desarrollo de HGNA. La resistencia a la insulina que se presenta en los pacientes con HGNA sugiere la participación de la vía de señalización IRS1/PI3K/AKT (sustrato 1 del receptor de insulina/fosfatidilinositol 3 cinasa/proteína cinasa B), que es activada por medio de insulina o de IGF-1 (factor de crecimiento insulínico tipo 1) (Brown y Goldstein, 2008). La vía IRS1/PI3K/AKT se ha vinculado como promotora del HGNA por su participación en el metabolismo de los lípidos, debido a que S6K1 (p70-S6 cinasa 1) también puede regular positivamente por fosforilaciones al factor transcripcional LXR (receptor X del hígado), miembro de la familia de receptores nucleares. Cuando LXR se encuentra activo promueve la transcripción del gen que codifica para la proteína SREBP-1c (proteína de unión al elemento regulador de esteroides 1c), el cual es un factor transcripcional que regula enzimas lipogénicas como la acetil-CoA carboxilasa 1 y 2 (ACC) y la sintasa de ácidos grasos (FAS). Se ha reportado que pacientes con HGNA muestran un aumento en la expresión de ACC y FAS (Higuchi et al., 2008), lo que sugiere que la acumulación de TG se potencia por la activación de la lipogénesis mediada por la vía IRS1/PI3K/AKT.

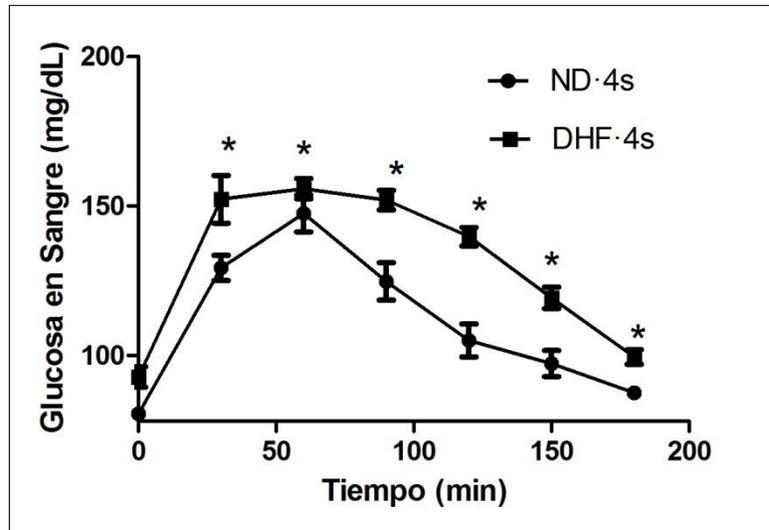


Figura. 7 Prueba de tolerancia a la glucosa en ratas alimentadas con DN-4s (●) o HFD-4s (■), dando 2 mg/kg de sacarosa vía intragástrica al tiempo 0, como se indica en la metodología. Todos los datos son el promedio \pm SE de seis ratas por cada grupo. (*) Diferencia significativa entre los grupos ND-4s y HFD-4s por prueba *t*-test ($P < 0.05$). ND-4s, dieta normal durante cuatro semanas; HFD-4s, dieta alta en grasa durante cuatro semanas.

8.11 Vitamina A y E en suero

A pesar de que no ocurrieron defunciones durante el experimento, algunas ratas del grupo HFD-4s presentaron un deterioro evidente; estos animales se veían enfermos (presentaron pérdida de pelo alrededor del cuello, y en la parte del lomo el pelo estaba erizado). Para descartar alguna deficiencia originada por la HFD o por la anorexia presentada en las ratas que consumieron HFD, se evaluaron las vitaminas A y E en suero de las ratas (**Figura 8**). Las ratas del grupo HFD-4s tuvieron menores niveles de vitamina A en suero en comparación con el grupo ND-4s, mientras que la vitamina E fue significativamente más elevada en el suero de las ratas del grupo HFD-4s con respecto al grupo ND-4s. Los valores de vitaminas A y E obtenidos en este estudio, a pesar de presentar diferencias significativas con respecto al grupo

control, se consideran dentro del estándar, ya que el rango de normalidad es de 20-85 ug/dL en suero (Shils, 1999).

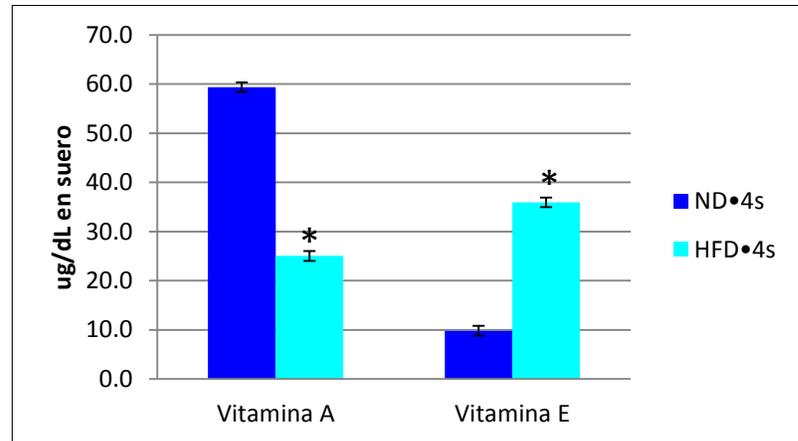


Figura 8. Valores de vitamina A y E en suero ($\mu\text{g/dL}$). * t-test, diferencia estadística significativa ($P \leq 0.001$). ND-4s = dieta normal durante cuatro semanas; HFD-4s = dieta alta en grasa durante cuatro semanas.

8.12 Evaluación macroscópica y microscópica del hígado

Los resultados de la evaluación macroscópica e histopatológica de los hígados de ratas sanas y ratas con HGNA inducido con la HFD se muestran en la **figura 6**. Una vez sacrificados los animales se extrajo el hígado, se pesó y se realizó la evaluación macroscópica. Se observó que los hígados del grupo HFD-4s (**Figura 9d**) fueron más grandes, estaban decolorados y eran muy frágiles en comparación con los del grupo ND-4s (**Figura 9a**).

En las **figuras 9b y 9c** se presentan imágenes microscópicas de secciones de hígados normales. En el grupo HFD-4s se observaron hepatocitos hinchados con esteatosis macrovesicular y numerosas vacuolas citoplásmicas en más del 90 % de los hepatocitos ($n=4$) (**Figuras 9e,f**). Estos resultados concuerdan con los reportados por Yalniz y colaboradores (2006), en donde ratas SD que recibieron una dieta HFD durante 4 semanas desarrollaron

esteatosis con numerosas vacuolas en el citoplasma. Estos autores también reportaron esteatosis grado I y II en todos los animales alimentados con HFD.

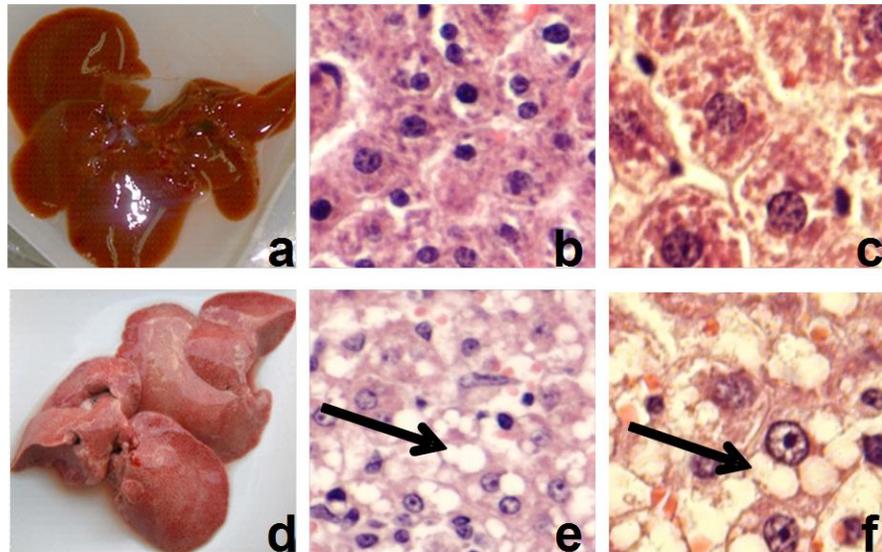


Figura 9. Aspecto macroscópico de los hígados de ratas de los siguientes grupos: ND-4s (a), HFD-4s (d). Histoarquitectura del tejido hepático por tinción con H&E a x 200 del grupo ND-4s (b) y HFD-4s (e), y a x 600 del grupo ND-4s (e), y del grupo HFD-4s (f). Las flechas indican las gotas de grasa dentro de los hepatocitos. ND-4s, dieta normal durante cuatro semanas; HFD-4s, dieta alta en grasa durante cuatro semanas.

En la **tabla 7** se muestran el grado de esteatosis y colesterosis obtenido en los diferentes grupos experimentales. Para ello, se empleó la escala propuesta por Brunt (1999), en donde el grado I = leve, grado II = moderado y grado III = severo. En base a lo anterior, se puede observar que ninguna de las ratas del grupo ND-4s presentó esteatosis; sin embargo, el 25 % de las ratas en el grupo HFD-4s presentaron esteatosis grado II y el 75 % grado III. El promedio en el grado de esteatosis fue significativamente diferente (prueba de X^2) entre el grupo HFD-4s y el grupo ND-4s (**Tabla 7**).

El término colesterosis fue empleado por el histopatólogo, al referirse a la acumulación de macrófagos cargados de colesterol, formado una especie

aglutinamiento en el hígado, el cual se puede observar al microscopio. En la **tabla 7** se muestra que el 100 % de las ratas del grupo ND-4s no presentaron colesterosis, mientras que el grupo HFE-4s presentó grado II en el 25 % de las ratas. El promedio en el grado de esteatosis fue significativamente diferente en el grupo HFD-4s en comparación con el grupo ND-4s; esto se evaluó a través de la prueba de X^2 (**Tabla 7**). El promedio en el grado de colesterosis entre los grupos ND-4s y HFD-4s no mostró diferencias significativas (prueba de X^2) (**Tabla 7**).

Tabla 7. Grado de esteatosis y colesterosis de las ratas en los grupos ND-4s y HFD-4s

Grupos	Esteatosis				Colesterosis				Total	
	Grado	0	I	II	III	0	I	II		III
ND-4s		4*				4				4
HFD-4s				1	3	3		1		4

* Diferencia estadística entre los grupos ND-4s y HFD-4s por la prueba de X^2 ($P<0.1$). †Diferencia estadística entre los grupos ND-8s y HFD-4s+ND-4s, HFD-4s+ND-4s+AT-4s, HFD-4s+ND+LYC-4s o HFD-4s+ND+AT+LYC-4s por la prueba de X^2 ($P<0.025$). ND-4s, dieta normal durante cuatro semanas; HFD-4s, dieta alta en grasa durante cuatro semanas. N = número de animales. La esteatosis se determinó de acuerdo a la escala de Brunt (1999).

8.13 Evaluación microscópica de aorta y riñón

Además de los hallazgos reportados en el hígado, también se realizó un estudio microscópico en las aortas y los riñones de los animales. En la **figura 10b** se puede observar que el grupo HFD-4s presentó un mayor grosor en la pared de la aorta, además las células musculares lisas son más grandes y

presentan cierto grado de inflamación, en comparación con las ratas del grupo ND-4s (**Figura 10a**). Estos resultados concuerdan con los reportados por Ramesh y colaboradores (2008), en donde ratas Wistar que recibieron una dieta aterogénica durante 30 días presentaron un engrosamiento de la aorta debido a la inflamación de las células musculares lisas. Por otro lado, en el riñón no se presentaron cambios por la ingesta de la dieta HFD-4s.

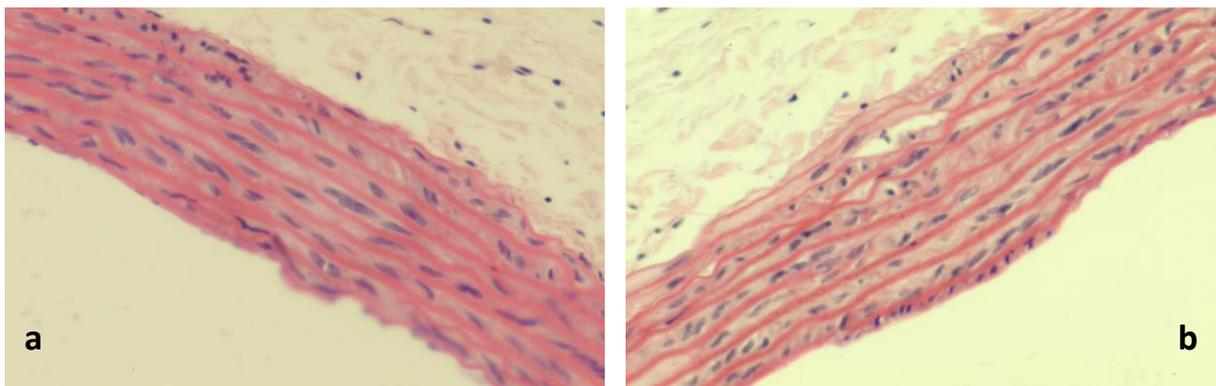


Figura 10. Corte histológico de la aorta. a) ND-4s, células musculares lisas y b) HFD-4s, células musculares lisas con inflamación. Tinción H&E (40x). ND-4s, dieta normal durante cuatro semanas; HFD-4s, dieta alta en grasa durante cuatro semanas.

Los datos incluidos en la **tabla 6** y en la **figura 9** indican que las ratas del grupo HFD-4s semejan al HGNA en humanos. Los resultados obtenidos en el hígado en las ratas después de haberlas alimentado con HFD durante 4 semanas, ya han sido reportados previamente en diversos estudios (Bahcecioglu et al., 2010; Wang et al., 2010; Chung et al., 2012), por lo que este modelo de HGNA fue adecuado para evaluar el posible efecto del cambio de dieta únicamente o del cambio de dieta y un suplemento de AT y/o LYC.

8.14 Efecto del cambio de dieta y la adición de AT y/o LYC para evaluar la recuperación del HGNA. Segunda etapa.

8.15 Consumo de alimento, peso corporal y peso del hígado

En la segunda etapa de este proyecto, el objetivo fue evaluar la recuperación del HGNA con cambio de dieta únicamente o con cambio de dieta y un suplemento de AT y/o LYC. Como se puede observar en la **tabla 3**, no hay diferencias significativas en el consumo de alimento entre los grupos y, por lo tanto, tampoco se observaron diferencias en el peso corporal de las ratas en los diferentes grupos experimentales. En un estudio previo realizado por Ji y colaboradores (2011), en ratas SD alimentadas durante 20 semanas con diversos tipos de dietas, de manera similar no se observaron diferencias significativas en el peso corporal de los animales según el grupo experimental (grupo control, grupo HFD durante 20 semanas, grupo HFD durante 12 semanas y 8 semanas de ND, grupo HFD durante 12 semanas, 8 semanas de ND y AT).

En cuanto al peso del hígado, se observó que la adición de AT y/o LYC a la ND permitió un restablecimiento total del peso del hígado, lo cual no se observó con únicamente el cambio de dieta (**Tabla 8**). Estos resultados concuerdan con los reportados por Kim y colaboradores (2008), en donde ratas SD alimentadas con una dieta aterogénica durante 6 semanas y 5 % de polvo de arándano usado como antioxidante, tuvieron una mejora significativa en el peso del hígado al compararlo con los animales que únicamente recibieron la dieta aterogénica. En otro estudio realizado por Ji y colaboradores (2011) mencionado anteriormente, las ratas con cambio a ND y suplementadas con AT, también mostraron una mejora significativa en el peso del hígado con respecto al grupo no suplementado.

Tabla 8. Consumo de alimento, peso corporal y peso del hígado

Grupos (n=6)	Consumo de alimento Kcal/d	Peso corporal (g)	Peso del hígado (g)
ND·8s	67 ± 2.30 ^a	370 ± 6.15 ^a	11.1 ± 0.29 ^a
HFD·4s+ND·4s	61 ± 3.20 ^a	360 ± 8.09 ^a	13.8 ± 0.35 ^b
HFD·4s+ND+AT·4s	65 ± 3.30 ^a	349 ± 7.15 ^a	12.4 ± 0.24 ^a
HFD·4s+ND+LYC·4s	58 ± 4.00 ^a	342 ± 4.03 ^a	11.7 ± 0.30 ^a
HFD·4s+ND+AT+LYC·4s	63 ± 5.50 ^a	337 ± 1.80 ^a	12.0 ± 0.39 ^a

Los valores son la media ± SEM. Letras distintas indican diferencia estadística significativa ($P < 0.001$). ND·8s, dieta normal durante 8 semanas; HFD·4s+ND·4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal durante 4 semanas; HFD·4s+ND·4s+AT·4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal y AT durante 4 semanas; HFD·4s+ND+LYC·4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal y LYC durante 4 semanas; HFD·4s+ND+AT+LYC·4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal, AT y LYC durante 4 semanas

8.16 Efecto del tratamiento con AT y LYC sobre los cambios en el metabolismo de carbohidratos en ratas alimentadas con HFD·4s

Los grupos ND·8s y HFD·4s+ND+LYC20·4s mostraron un pico más elevado a los 60 min, mientras que el grupo HFD·4s+ND+AT+LYC·4s presentó la concentración más baja de glucosa en sangre. A los 120 min todos los grupos de ratas presentaron concentraciones de glucosa similares a las basales (**Figura 11**). Estos resultados concuerdan con los reportados por Bahcecioglu y colaboradores (2010), en donde las ratas SD alimentadas con HFD durante 6 semanas y tratadas con LYC, tuvieron niveles significativamente menores de glucosa en sangre, en comparación con los animales del grupo HFD sin tratamiento.

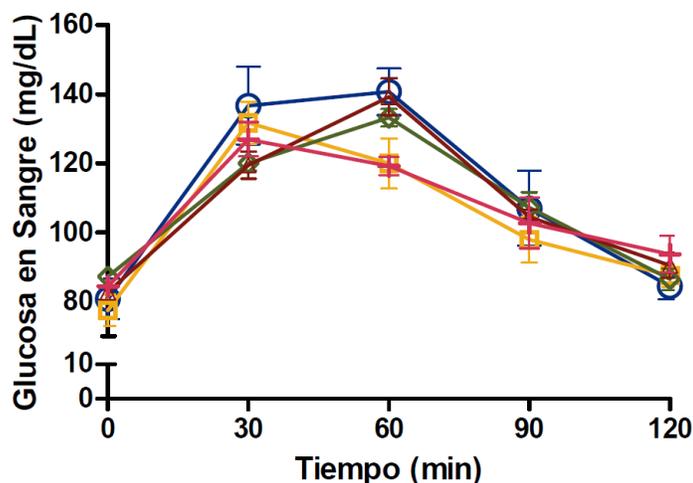


Figura 11. Curva de tolerancia a la glucosa en ratas alimentadas con ND-8s (○ raya continua azul), HFD-4s+ND-4s (□ amarillo), HFD-4s+ND+AT-4s (◇ verde), HFD-4s+ND+LYC-4s (△ rojo), HFD-4s+ND+AT+LYC-4s (+ rosa), después de 2 mg/kg de sacarosa vía intragástrica, como se indica en la metodología. Todos los datos son el promedio \pm SE de 6 ratas en cada grupo. DN-8s, dieta normal durante 8 semanas; HFD-4s+ND-4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal durante 4 semanas; HFD-4s+ND-4s+AT-4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal y AT durante 4 semanas; HFD-4s+ND+LYC-4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal y LYC durante 4 semanas; HFD-4s+ND+AT+LYC-4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal, AT y LYC durante 4 semanas.

8.17 Efecto del tratamiento con AT y/o LYC sobre el perfil de lípidos en suero de ratas alimentadas con una dieta HFD-4s

Los resultados del efecto de la AT y/o el LYC en el perfil de lípidos en suero se muestran en la **tabla 4**. Las concentraciones de CT y HDL se normalizaron con el cambio a dieta normal, así como con el cambio de dieta con AT y/o LYC. Los valores de TG fueron incluso significativamente menores en los grupos que recibieron HFD-4s+ND-4s con o sin suplemento de AT y/o LYC que en el grupo ND-8s. Estos resultados son similares a los reportados por Kim

y colaboradores (2008), en donde ratas SD alimentadas con una dieta aterogénica durante 6 semanas presentaron valores de TG menores que el grupo control. Por su parte, Basuny y colaboradores (2009) reportaron un experimento en el cual, las ratas alimentadas con HFD y suplementadas con licopeno durante 10 semanas, presentaron niveles significativamente menores de colesterol total en suero.

En cuanto a las concentraciones de LDL, es de llamar la atención que con la HFD se presentaron niveles muy elevados de LDL (346.3 mg/dL) (**Tabla 6**), y mostraron una recuperación total al regresar a valores normales (cerca de 13.7 mg/dL) en los grupos alimentados con ND y suplementados con AT y/o LYC (HFD-4s+ND+AT-4s, HFD-4s+ND+LYC-4s y HFD-4s+ND+AT+LYC-4s). Mientras que, el grupo no suplementado con AT y/o LYC (HFD-4s+ND-4s) sólo logró una recuperación parcial, ya que no se obtuvieron los niveles basales de LDL en el suero de estos animales (**Tabla 9**). Estos resultados concuerdan con diversos autores al reportar que tanto la AT como el LYC tienen efectos antilipemiantes en suero de sujetos, al igual que en diversos modelos de roedores (Silaste et al., 2007; Verghese et al., 2008; Ried, 2011; Lorenz et al., 2012).

Tabla 9. Perfil de lípidos en suero

Grupos (n=6)	TG (mg/dL)	CT (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL(mg/dL)
ND·8s	78.8 ± 4.2 ^a	89.5 ± 4.4 ^a	51.0 ± 2.4 ^a	13.7 ± 0.8 ^a
HFD·4s+ND·4s	51.0 ± 4.4 ^b	99.7 ± 4.9 ^a	46.4 ± 1.9 ^a	19.0 ± 1.4 ^b
HFD·4s+ND+AT·4s	62.1 ± 3.0 ^b	89.4 ± 2.8 ^a	43.7 ± 1.3 ^a	12.4 ± 1.2 ^a
HFD·4s+ND+LYC·4s	60.4 ± 1.8 ^b	111.9 ± 4.7 ^a	48.1 ± 0.9 ^a	12.1 ± 0.9 ^a
HFD·4s+ND+AT+LYC·4s	57.3 ± 5.2 ^b	102.6 ± 6.0 ^a	46.1 ± 1.8 ^a	11.0 ± 1.7 ^a

Los valores son la media ± SEM. Letras distintas indican diferencia estadística significativa ($P < 0.001$). ND·8s, dieta normal durante 8 semanas; HFD·4s+ND·4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal durante 4 semanas; HFD·4s+ND·4s+AT·4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal y AT durante 4 semanas; HFD·4s+ND+LYC·4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal y LYC durante 4 semanas; HFD·4s+ND+AT+LYC·4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal, AT y LYC durante 4 semanas.

8.18 Efecto del tratamiento con AT y/o LYC sobre el contenido de lípidos en hígado de ratas alimentadas con una dieta HFD·4s

Las células adiposas se alimentan de ácidos grasos libres provenientes del torrente sanguíneo (principalmente de TG circulantes). Esta capacidad de absorber el flujo de ácidos grasos libres de la circulación, le da al tejido adiposo un papel especial para proteger a otros tejidos del flujo excesivo de ácidos grasos libres, pero cuando hay un exceso estos lípidos se transportan a otros órganos, principalmente al hígado (McCullough, 2004). Al hígado pueden llegar ácidos grasos provenientes del tejido adiposo, transportándose en complejos con albúmina o pueden provenir directamente de la dieta en forma de quilomicrones.

Los hepatocitos tienen los mecanismos para unir, transformar, catabolizar y exportar el exceso de flujo de ácidos grasos libres a través de

proteínas de unión de ácidos grasos, síntesis de triglicéridos y secreción como VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad), β -oxidación por el sistema de citocromo P450 y ω -oxidación microsomal. Cuando se satura la combinación con albúmina, las células hepáticas captan más ácidos grasos libres. Este exceso de ácidos grasos libres en el hígado tiene un papel primordial en el aumento en la secreción de VLDL que lleva a hipertrigliceridemia y dislipidemias asociadas (Luyckx et al., 2000).

Se evaluó el contenido de lípidos en el hígado con el fin de medir el efecto de la AT y el LYC sobre el almacenamiento de éstos en el hígado.

Los resultados del contenido de CT y TG en el tejido hepático de las ratas se muestran en la **tabla 10**. Se puede observar que los valores de TG muestran una recuperación similar en todos los grupos después de alimentar a las ratas con la ND-4s, independientemente de la presencia de AT y/o LYC. Sin embargo, los valores de CT muestran una recuperación a valores normales en el hígado de las ratas que recibieron AT y LYC, en comparación con la recuperación parcial de las ratas que recibieron únicamente ND. Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados por Ji y colaboradores (2011) quienes reportan una disminución significativa de CT en el hígado de las ratas tratadas con AT; y también con los resultados obtenidos por Hassan y colaboradores (2004), en donde muestran una disminución significativa de CT en el hígado de los animales suplementados con LYC.

Tabla 10. Triglicéridos y colesterol total en hígado

Grupos (n=6)	TG (100 mg)	CT (100 mg)
ND·8s	29.6 ± 1.3 ^a	17.5 ± 0.4 ^a
HFD·4s+ND·4s	28.8 ± 1.4 ^a	23.6 ± 0.5 ^b
HFD·4s+ND+AT·4s	25.5 ± 1.0 ^a	16.1 ± 0.8 ^a
HFD·4s+ND+LYC·4s	27.6 ± 1.8 ^a	18.4 ± 0.3 ^a
HFD·4s+ND+AT+LYC·4s	20.4 ± 1.2 ^a	19.5 ± 0.4 ^a

Los valores son la media ± SEM. Letras distintas indican diferencia estadística significativa ($P < 0.001$). ND·8s, dieta normal durante 8 semanas; HFD·4s+ND·4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal durante 4 semanas; HFD·4s+ND·4s+AT·4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal y AT durante 4 semanas; HFD·4s+ND+LYC·4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal y LYC durante 4 semanas; HFD·4s+ND+AT+LYC·4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal, AT y LYC durante 4 semanas.

8.19 Efecto del tratamiento con AT y/o LYC en las enzimas de daño hepático (AST y ALT) en suero

Los niveles elevados de ALT y AST en suero se interpretan como el resultado del daño hepatocelular (Miranda-Nantes et al., 2011). En la **tabla 11** se muestran los resultados obtenidos en el suero de las ratas de los diferentes grupos experimentales. Se puede observar que en presencia de esteatosis en el hígado de las ratas, hay un aumento en la actividad de AST; sin embargo, este valor no se normaliza con el cambio a ND con o sin suplemento de AT y/o LYC. En cuanto a los valores de la enzima ALT se observa que aumentó con el consumo de HFD durante 4 semanas, y una vez que las ratas consumen nuevamente la dieta normal, esta enzima regresa a sus valores basales independientemente del consumo de AT y/o LYC (**Tabla 11**). Estos resultados concuerdan con los reportados por Bahcecioglu y colaboradores (2010), en donde ratas SD alimentadas con HFD presentaron un aumento de AST y ALT.

Sin embargo, los valores de ALT disminuyeron con el suplemento de LYC en ambas dosis administradas, mientras que los valores de AST permanecieron elevados a pesar del suplemento de LYC. Por su parte, Ji y colaboradores (2011) reportaron resultados similares en cuanto a los valores de ALT, en un estudio realizado en ratas SD alimentadas 12 semanas con HFD para inducir HGNA, las ratas tratadas con AT recuperaron sus niveles basales de ALT, mientras que los valores de AST no se recuperan.

Tabla 11. Enzimas AST y ALT en suero

Grupos (n=6)	AST (U/L)	ALT (U/L)
ND·8s	123.8 ± 12.9 ^a	71.5 ± 7.9 ^a
HFD·4s+ND·4s	169.3 ± 17.3 ^b	89.0 ± 8.4 ^a
HFD·4s+ND+AT·4s	157.8 ± 13.4 ^b	98.5 ± 10.5 ^a
HFD·4s+ND+LYC·4s	155.3 ± 16.2 ^b	90.5 ± 10.1 ^a
HFD·4s+ND+AT+LYC·4s	152.8 ± 15.8 ^b	68.3 ± 7.8 ^a

Los valores son la media ± SEM. Letras distintas indican diferencia estadística significativa ($P < 0.01$). ND·8s, dieta normal durante 8 semanas; HFD·4s+ND·4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal durante 4 semanas; HFD·4s+ND·4s+AT·4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal y AT durante 4 semanas; HFD·4s+ND+LYC·4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal y LYC durante 4 semanas; HFD·4s+ND+AT+LYC·4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal, AT y LYC durante 4 semanas.

8.20 Efecto del tratamiento con AT y/o LYC en los marcadores de estrés oxidativo hepático

Los resultados de los marcadores de estrés oxidativo se muestran en la **tabla 12** y se pueden observar los siguientes cambios: la actividad de SOD

disminuyó en los grupos de cambio de dieta (HFD-4s+ND-4s), cambio de dieta con AT o LYC (HFD-4s+ND+AT-4s y HFD-4s+ND+LYC-4s); mientras que, el grupo tratado con AT y LYC (HFD-4s+ND+AT+LYC-4s) no presentó cambios con respecto al grupo ND-8s.

En cuanto a la actividad de CAT, no se reportaron cambios en la actividad de los grupos con cambio de dieta y cambio de dieta con AT o LYC (HFD-4s+ND-4s, HFD-4s+ND+AT-4s y HFD-4s+ND+LYC-4s); sin embargo, el grupo tratado con AT y LYC (HFD-4s+ND+AT+LYC-4s), tuvo menor actividad de CAT con respecto al grupo ND-8s (**Tabla 12**). Estos resultados concuerdan con los reportados por Hsu y colaboradores (2008), en donde se observó que la administración de 3 y 9 % de pasta de jitomate como fuente de LYC durante 8 semanas aumentó la actividad de CAT en el hígado de los hamsters suplementados.

En cuanto a la actividad de GPx, los grupos con cambio de dieta y tratados con AT así como con AT y LYC (HFD-4s+ND+AT-4s y HFD-4s+ND+AT+LYC-4s) no presentaron cambios con respecto al grupo ND-8s; mientras que los grupos con cambio de dieta y suplementado con LYC tuvieron una mayor actividad de GPx con respecto al grupo ND-8s (**Tabla 12**).

El incremento general observado en la actividad catalítica de SOD, CAT y GPx después del cambio de dieta o del cambio de dieta con AT y/o LYC, es positivo.

Los valores de MDA aumentaron con el desarrollo de la esteatosis, y en el grupo ND-8s permanecen bajos, no se modificaron después de cambiar a ND-4s, con o sin el suplemento de AT y/o LYC (**Tabla 12**), a pesar de que la esteatosis disminuyó en el hígado como se describe a continuación. El efecto limitante del LYC para normalizar el MDA hepático coincide con el reportado por Bernal y colaboradores (2013).

De todos los indicadores de daño hepático evaluados en el hígado, sólo AST y MDA no mostraron mejoría con la DN·4s, sola o combinada con AT y/o LYC.

Tabla 12. Marcadores de estrés oxidativo (SOD, CAT, GPx y MDA)

Grupos (n=6)	SOD (U/mg prot)	CAT (U/mg prot)	GPx (U/mg prot)	MDA (nM/mg prot)
ND·8s	30.4 ± 3.0 ^a	175.2 ± 14.5 ^a	2.9 ± 0.1 ^a	0.563 ± 0.03 ^a
HFD·4s+ND·4s	18.9 ± 1.1 ^b	208.5 ± 7.6 ^a	5.0 ± 0.1 ^b	1.005 ± 0.05 ^b
HFD·4s+ND+AT·4s	8.6 ± 0.9 ^b	237.7 ± 11.0 ^a	4.2 ± 0.2 ^a	0.785 ± 0.04 ^b
HFD·4s+ND+LYC·4s	20.0 ± 1.3 ^b	245.7 ± 9.3 ^a	4.5 ± 0.4 ^b	1.020 ± 0.04 ^b
HFD·4s+ND+AT+LYC·4s	25.3 ± 1.6 ^a	144.1 ± 14.1 ^b	4.3 ± 0.1 ^a	1.139 ± 0.08 ^b

Los valores son la media ± SEM. *Diferencia significativa por la prueba T-test ($P < 0.001$). Letras distintas indica diferencia estadística significativa ($P < 0.001$). ND·8s, dieta normal durante 8 semanas; HFD·4s+ND·4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal durante 4 semanas; HFD·4s+ND·4s+AT·4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal y AT durante 4 semanas; HFD·4s+ND+LYC·4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal y LYC durante 4 semanas; HFD·4s+ND+AT+LYC·4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal, AT y LYC durante 4 semanas.

8.21 Efecto del tratamiento con AT y/o LYC en la morfología hepática

Los resultados de la evaluación macroscópica, así como del estudio histopatológico de los hígados de ratas de los diferentes grupos, se muestran en la **figura 12**. Una vez sacrificados los animales, se extrajo el hígado, se pesó y se realizó la evaluación macroscópica. Se observó que los hígados del grupo HFD·4s+ND·4s (**Figura 12b**) eran más grandes y presentaron cierta decoloración debido a la esteatosis observada a simple vista, también eran frágiles en comparación con los del grupo ND·8s (**Figura 12a**). Los hígados del

grupo HFD·4s+ND+AT·4s presentaron decoloración en algunas zonas (**Figura 12c**, flecha blanca). Mientras que, los hígados de los grupos HFD·4s+ND+LYC·4s (**Figura 12d**) y HFD·4s+ND+AT+LYC·4s (**Figura 12e**) presentaron una apariencia y color igual a los del grupo ND·8s (**Figura 12a**). Estos resultados concuerdan con los reportados con Ji y colaboradores (2011), en donde ratas SD alimentadas durante 20 semanas con HFD y tratadas durante 8 semanas con AT, tuvieron un menor grado de esteatosis en comparación con el grupo no tratado con AT. Por su parte, Bahcecioglu y colaboradores (2010) realizaron un estudio en donde ratas alimentadas con HFD durante y suplementadas con LYC durante 6 semanas, mostraron una disminución en la esteatosis y la inflamación al compararlas con las ratas alimentadas con HFD.

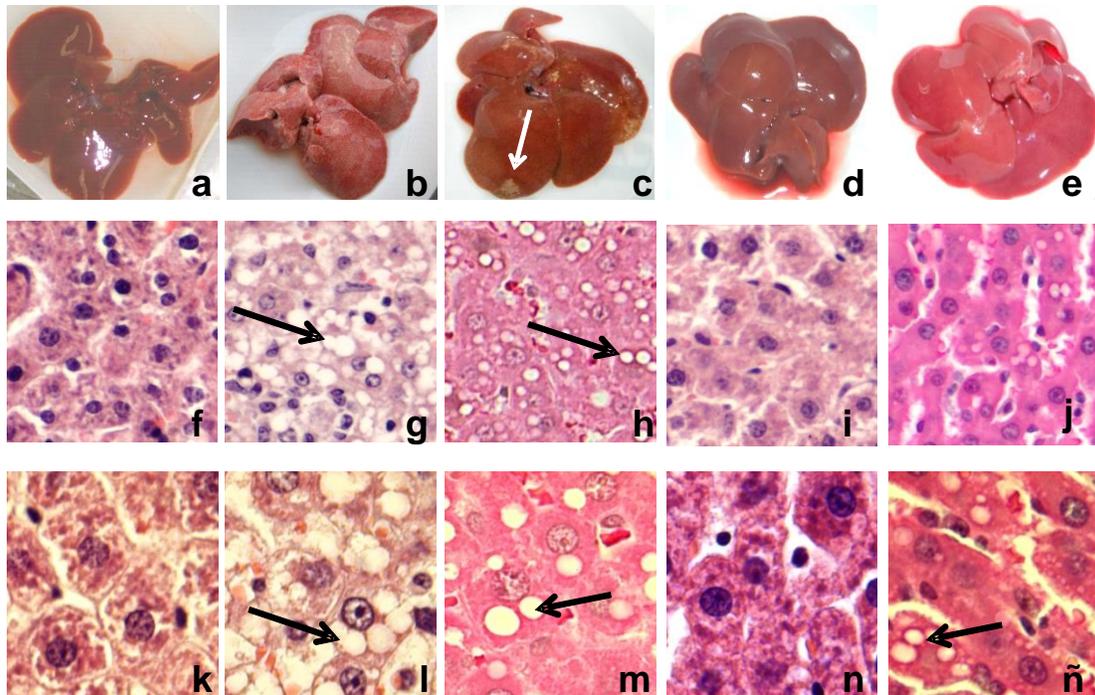


Figura 12. Aspecto macroscópico de hígados de ratas de los siguientes grupos: ND·8s (a), HFD·4s+ND·4s (b), HFD·4s+ND+AT·4s (c), HFD·4s+ND+LYC·4s (d), HFD·4s+ND+AT+LYC·4s (e). Histoarquitectura del tejido hepático por tinción con H&E a x 200 de los siguientes grupos: ND·8s (f), HFD·4s+ND·4s (g), HFD·4s+ND+AT·4s (h), HFD·4s+ND+LYC·4s (i) y HFD·4s+ND+AT+LYC·4s (j). A x 600 de los siguientes grupos: ND·8s (k), HFD·4s+ND·4s (l), HFD·4s+ND+AT·4s (m), HFD·4s+ND+LYC·4s (n) y HFD·4s+ND+AT+LYC·4s (ñ). Las flechas negras indican las gotas de grasa dentro de los hepatocitos. La flecha blanca indica coloración clara en zonas específicas del hígado. ND·8s, dieta normal durante 8 semanas; HFD·4s+ND·4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal durante 4 semanas; HFD·4s+ND·4s+AT·4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal y AT durante 4 semanas; HFD·4s+ND+LYC·4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal y LYC durante 4 semanas; HFD·4s+ND+AT+LYC·4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal, AT y LYC durante 4 semanas.

El exceso de TG en el hígado se almacena en forma de vacuolas de grasa y se conoce como esteatosis. El grado de esteatosis fue realizado por el patólogo y se muestra en la tabla 8. En la figura 9f-ñ se muestra la histoarquitectura de los diferentes grupos experimentales a x 200 y x 600. Se observa que en el grupo HFD-4s+ND-4s, el cambio de HFD a ND disminuyó de un 90 % de las células afectadas, a un promedio mayor de 50 % en los hepatocitos (**Figuras 12g,I**). Mientras que, con el cambio de dieta y los tratamientos de AT y/o LYC, menos del 50 % de los hepatocitos presentaron daños (**Figuras 12h,i,j,m,n,ñ**).

De acuerdo a la clasificación de Brunt (1999), se obtuvieron los siguientes resultados: en el grupo HFD-4s+ND-4s se observó esteatosis grado II en tres ratas, grado III de esteatosis en 3 ratas (**Tabla 13**). En el grupo HFD-4s+ND+AT-4s, se observó esteatosis grado I en 3 ratas, grado II en 2 ratas y grado III en una rata; y en el grupo HFD-4s+ND+LYC-4s, la esteatosis hepática disminuyó dado que una rata no mostró esteatosis, una rata presentó esteatosis grado I, 2 ratas esteatosis grado II y 2 ratas esteatosis grado III. En el grupo HFD-4s+ND+AT+LYC-4s, 3 ratas presentaron esteatosis grado I y 3 ratas presentaron esteatosis grado II. El promedio del grado de esteatosis fue estadísticamente diferente entre los grupos ND-8s y los grupos HFD-4s+ND-4s, HFD-4s+ND+AT-4s, HFD-4s+ND+LYC-4s o HFD-4s+ND+AT+LYC-4s ($P<0.025$). No se encontró diferencia estadística entre HFD-4s+ND-4s y HFD-4s+ND+AT-4s, HFD-4s+ND+LYC-4s o HFD-4s+ND+AT+LYC-4s. Estudios previos realizados por Bahcecioglu y colaboradores (2010) reportaron un menor grado de estosis en los grupos suplementados con LYC en comparación con el grupo alimentado con HFD sin suplemento.

Los resultados del estudio histológico de los hígados de las ratas en donde se evaluó la colesterosis se muestran en la **tabla 13**. De acuerdo con estos resultados, el grupo HFD-4s+ND-4s presentó colesterosis grado I en el 67 % y grado II en el 17 % de los animales; otro 17 % no presentó colesterosis. En cuanto a los grupos tratados, el grupo HFD-4s+ND+AT-4s

presentó colesterosis grado I en el 16.7% de las ratas; el 83.3% de los animales no presentó colesterosis. El grupo HFD-4s+ND+LYC-4s presentó colesterosis grado I y II en 16.7% de los animales respectivamente; mientras que el 66.7% de los animales no presentó colesterosis. El grupo HFD-4s+ND+AT+LYC-4s presentó colesterosis grado I y III en el 33.3 % de las ratas respectivamente, mientras que otro 33.3% no presentó colesterosis.

Tabla 13. Grado de esteatosis y colesterosis de las ratas en cada grupo experimental de 8 semanas

Grupos	Esteatosis				Colesterosis				Total
	0	I	II	III	0	I	II	III	n
ND-8s	6 [†]				6 [†]				6
HFD-4s+ND-4s			3	3	1	4	1		6
HFD-4s+ND+AT-4s		3	2	1	5	1			6
HFD-4s+ND+LYC-4s	1	1	2	2	4	1	1		6
HFD-4s+ND+AT+LYC-4s		3	3		2	2		2	6

[†]Diferencia estadística entre los grupos ND-8s y HFD-4s+ND-4s, HFD-4s+ND-4s+AT-4s, HFD-4s+ND+LYC-4s o HFD-4s+ND+AT+LYC-4s por la prueba de X^2 ($P<0.025$). ND-8s, dieta normal durante 8 semanas; HFD-4s+ND-4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal durante 4 semanas; HFD-4s+ND+AT-4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal y AT durante 4 semanas; HFD-4s+ND+LYC-4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal y LYC durante 4 semanas; HFD-4s+ND+AT+LYC-4s, dieta alta en grasa durante 4 semanas seguida de dieta normal, AT y LYC durante 4 semanas; n, número de ratas en cada grupo. La escala de esteatosis hepática es de acuerdo a la clasificación de Brunt (1999).

9. CONCLUSIONES

Los cambios obtenidos después de alimentar a las ratas durante 4 semanas con la HFD fueron evidentes, por lo que el modelo de HGNA establecido para este estudio es similar al reportado anteriormente y cumple con el objetivo de disponer de un modelo de HGNA comparable al que ocurre en humanos. Dicho modelo es adecuado para evaluar los tratamientos de AT y LYC.

Al cambiar a ND más la adición de AT, LYC o AT+LYC hubo una recuperación en el peso corporal, consumo de alimento, resistencia a la insulina, TG, CT, HDL y ALT en suero, así como TG en hígado.

El aumento en la actividad enzimática de SOD, CAT y GPx al cambiar de dieta ND-4s con o sin AT y/o LYC es positivo; sin embargo, no es posible saber cuál de los grupos presentó los mejores resultados.

El tratamiento con LYC, aunado al cambio a ND, demostró una mayor recuperación en el indicador de CT en hígado, la actividad enzimática de SOD y GPx y en las anomalías macroscópicas y microscópicas en los hígados.

De todos los indicadores de daño hepático evaluados, únicamente la enzima AST en suero y el MDA en hígado no mostraron ninguna mejoría con el cambio a ND con o sin AT y/o LYC.

En suma, el estilo de vida, con un énfasis especial en una dieta adecuada a la cual se incorporen alimentos que contengan un elevado contenido de LYC, ofrece ventajas para revertir la esteatosis hepática y experimental (HGNA en humanos).

10. REFERENCIAS

- Ackerman Z, Oron-Herman M, Grozovski M. 2005 Fructose-induced fatty liver disease: Hepatic effects of blood pressure and plasma triglyceride reduction. *Hypertension*, 45, 1012–1018.
- Adaramoye O, Amanlou M, Habibi-Rezaei M, Pasalar P, Ali MM. 2012. Methanolic extract of African mistletoe (*Viscum album*) improves carbohydrate metabolism and hyperlipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asian Pac J Trop Med*. Jun; 5(6):427–33.
- Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer H.U., 1974 (ed.) *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, pp. 673–677 New York.
- Albarado DC, McClaine J, Stephens JM. 2004 Impaired coordination of nutrient intake and substrate oxidation in melanocortin-4 receptor knockout mice. *Endocrinology*, 145, 243–252.
- Alvarez Martínez H. 2005. El paciente con hipertransaminemia. *Rev Fac Med UNAM.*; 48: 58–65.
- Anderson B, Rafferty AP, Lyon-Callo S. 2011. Fast-food consumption and obesity among Michigan adults. *Prev. Chronic. Dis*, 8, A71.
- Angulo P. 2002. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*; 19:291-302.
- Anstee QM, Goldin RD. 2006 Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int. J. Exp. Pathol.*, 87, 1–16.
- Arab L, Steck S. 2000. Lycopene and Cardiovascular Disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 71: 1691–5.
- Bahcecioglu IH, Kuzu N, Metin K, Ozercan IH, Ustündag B, Sahin K, Kucuk O. *Vet Med Int*. 2010. Lycopene prevents development of steatohepatitis in experimental nonalcoholic steatohepatitis model induced by high-fat diet. Oct 3; pii: 262179.
- Balunas MJ, Kinghor AD. 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci*, 78, 431–441.
- Basuny AM, Gaafar AM, Arafat SM. 2009. Tomato lycopene is a natural antioxidant and can alleviate hypercholesterolemia. *Afr J Biotechnol*. 8: 6627–6633.
- Belia S, Lupattelli G, Urbani E, Vaudo G, Roscini AR, Perni S, Marsili V. 2014. Oxidative balance in lymphocytes from patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Med Sci* 348:30–36.
- Bellentani S, Scaglioni F, Marino M, Bedogni G. 2010. Epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Dis* ;28:155–161.

- Bergheim I, Weber S, Vos M. 2008. Antibiotics protect against fructose-induced hepatic lipid accumulation in mice: Role of endotoxin. *J. Hepatol.* 48, 983–992.
- Berlanga A, Guiu-Jurado E, Porrás JA, Auguet T. 2014. Molecular pathways in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Gastroenterol*;7:221–239
- Bernal C, Martín-Pozuelo G, Lozano AB, Sevilla A, García-Alonso J, Canovas M, Periago MJ. 2013. Lipid biomarkers and metabolic effects of lycopene from tomato juice on liver of rats with induced hepatic steatosis. *J Nutr Biochem.* Nov; 24(11):1870–81.
- Bezerra IN, Curioni C, Sichieri R. 2012. Association between eating out of home and body weight. *Nutr. Rev.* 70, 65–79.
- Bignotto L, Rocha J, Sepodes B, Eduardo-Figueira M, Pinto R, Chaud M, de Carvalho J, Moreno H Jr, Mota-Filipe H. 2009. Anti-inflammatory effect of lycopene on carrageenan-induced paw oedema and hepatic ischaemia-reperfusion in the rat. *Br J Nutr.* Jul;102(1):126–33.
- Blanche C, Xiang Dong W. 2014. Non-Alcoholic Steatohepatitis and Hepatocellular Carcinoma: Implications for Lycopene Intervention. *Nutrients*; 6:124–162.
- Bradbury MW, Berk PD. 2004. Lipid metabolism in hepatic steatosis. *Clin Liver Dis.* Aug; 8(3):639–71, xi.
- Breinholt V, Lauridsen ST, Daneshvar B, Jakobsen J. *Cancer Lett.* 2000. Dose-response effects of lycopene on selected drug-metabolizing and antioxidant enzymes in the rat. Jun 30; 154(2):201–10.
- Britton B. 1995. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *FASEB J.* 9:1551–1558.
- Broncel M, Koter-Michalak M, Chojnowska-Jezierska J. 2006 The effect of statins on lipids peroxidation and activities of antioxidant enzymes in patients with dyslipidemia. *Przegl Lek.*; 63(9):738–42.
- Brown M, Goldstein J. 2008. Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metabol.*, 7, 95–96.
- Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, et al. 2004. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology*; 40:1387–1395.
- Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. 1999. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol.* Sep; 94(9):2467–74.

Buettner R, Parhofer K. G, Woenckhaus M. et al. 2006. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *Journal of Molecular Endocrinology*, vol. 36, no. 3, pp. 485–501.

Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer, LC. 2007. High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity [Silver Spring]*, 15, 798–808.

Bujanda, Bujanda L, Hijona E, Larzabal M, Beraza M, Aldazabal P, García-Urkiea N et al. 2008. Resveratrol inhibits nonalcoholic fatty liver disease in rats. *BMC Gastroenterology*, 8, 1–8.

Charlton M, Krishnan A, Viker K. 2011. Fast food diet mouse: novel small animal model of NASH with ballooning, progressive fibrosis, and high physiological fidelity to the human condition. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* Nov; 301(5):G825–34.

Chung J, Koo K, Lian F, Hu KQ, Ernst H, Wang XD. 2012. Apo-10'-lycopenoic acid, a lycopene metabolite, increases sirtuin 1 mRNA and protein levels and decreases hepatic fat accumulation in ob/ob mice. *J Nutr. Mar*; 142(3):405–10. doi: 10.3945/jn.111.150052. Epub Jan 18.

Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH. 2011. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science*. Jun 24; 332(6037):1519–23.

Conlon BA, Beasley J, Aebersold K, Jhangiani S & Wylie-Rosett J. 2013. Nutritional management of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Nutrients*, 5, 4093–4114.

Crouse III JR, Frohlich J, Ose L, et al. 1999. Effects of high doses of simvastatin and atorvastatin on high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein A-I. *Am J Cardiol* May 15; 83: 1476–7.

Davidson MH, Ma PTS, Stein E, et al. 2001. ZD4522 is superior to atorvastatin in decreasing low-density lipoprotein cholesterol and increasing high density lipoprotein cholesterol in patients with type IIa or IIb hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* Feb; 37 (2) Suppl. A: 292A.

Day CP, James OF. 1998. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology*. Apr; 114: 842–845 [PMID: 9547102].

DiMascio P, Kaiser S, Sies H. 1998. Lycopene as the most effective biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch Biochem Biophys*. 274: 532–538.

Dixon JB, Bhathal PS, Hughes NR, O'Brien PE. 2004. Nonalcoholic fatty liver disease: Improvement in liver histological analysis with weight loss. *Hepatology*, 39, 1647–1654.

Dyson JK, Anstee QM, McPherson S. 2014. Non-alcoholic fatty liver disease: a practical approach to treatment. *Frontline Gastroenterol*; 5:277–286.

- Encuesta de Salud y Nutrición (ENSANUT), 2012.
- Farnier M, Portal JJ, Maigret P. 2000. Efficacy of atorvastatin compared with simvastatin in patients with hypercholesterolemia. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* Jan;(1): 27–32.
- Fassio E, Alvarez E, Dominguez N, Landeira G, Longo C. 2004. Natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a longitudinal study of repeat liver biopsies. *Hepatology.* Oct; 40:820–6.
- Ferramosca A, Zara V. 2014. Modulation of hepatic steatosis by dietary fatty acids. *World J Gastroenterol.* 20:1746–1755.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanly GH. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Biol Chem.* 226:497–509.
- Fuhrman B, Elis A, Aviram. 1997. Hypocholesterolemic Effect of Lycopene and β -Carotene is Related to Suppression of Cholesterol Synthesis and Augmentation of LDL Receptor Activity in Macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 233: 658–662.
- Gianini EG, Testa R, Savarino V. 2005. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. *CMAJ.*; 172:367–79.
- Godbole V, York DA. 1978. Lipogenesis in situ in the genetically obese Zucker fatty rat [fa/fa]: Role of hyperphagia and hyperinsulinaemia. *Diabetologia,* 14, 191–197.
- Goorden SM, Buffart TE, Bakker A, Buijs MM. 2013. Liver disorders in adults: ALT and AST. *Ned Tijdschr Geneesk.* 157(43):A6443.
- Hadley CW, Clinton SK, Schwartz SJ. 2003. The consumption of processed tomato products enhances plasma lycopene concentrations in association with a reduced lipoprotein sensitivity to oxidative damage. *J Nutr.* Mar;133(3):727–32.
- Hassan HA, Edrees G. 2004. Therapeutic effect of lycopene-rich tomato juice on cardiac disorder in rats fed on fried food in oxidized frying oil. *Egypt J Hosp Med* 14: 115–126.
- Hatzis G, Ziakas P, Kavantzias N, Triantafyllou A, Sigalas P, Andreadou I, Ioannidis K, Chatzis S, Filis K, Papalampros A, Sigala F. 2013. Melatonin attenuates high fat diet-induced fatty liver disease in rats. *World J Hepatol.* Apr 27; 5(4):160–9.
- Hernández-Rodas MC, Valenzuela R, Videla LA. 2015. Relevant Aspects of Nutritional and Dietary Interventions in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int J. Mol. Sci.,* 16, 25168–25198.
- Higuchi N, Kato M, Shundo Y, Tajiri H, Tanaka M, Yamashita N, Kohjima M, Kotoh K, Nakamuta M, Takayanagi R, Enjoji M. 2008. Liver X receptor in

cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liverdisease *Hepatol Res.* 38(11):1122–9.

Hsiao PJ, Chen ZC, Hung WW, Yang YH, Lee MY, Huang JF, Kuo KK. 2013. Risk interaction of obesity, insulin resistance and hormone-sensitive lipase promoter polymorphisms (LIPE-60C > G) in the development of fatty liver. *Med Genet.* May 20;14:54.

Hsu YM, Lai CH, Chang CY, Fan CT, Chen CT, Wu CH. 2008. Characterizing the lipid-lowering effects and antioxidant mechanisms of tomato paste. *Biosci Biotechnol Biochem.* Mar; 72(3):677–85. Epub 2008 Mar 7.

Hu Min-Yu D, Yi-Lin Li S, Chong-He Jiang D, Zhao-Qian Liu D, Shu-Lin Qu D, and Yi-Ming Huang S. 2008. Comparison of lycopene and fluvastatin effects on atherosclerosis induced by a high-fat diet in rabbits. *Nutrition* 24. 1030–1038.

Huszar D, Lynch CA. 1997. Fairchild-Huntress, V. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell*, 88, 131–141.

Instituto Nacional de Geografía e Informática (INEGI); Anuario estadístico y geográfico de los Estados Unidos Mexicanos, 2008.

Instituto Nacional de Geografía e Informática (INEGI); Anuario estadístico y geográfico de los Estados Unidos Mexicanos, 2011.

Jacob K, Periago MJ, Böhm V, Berruezo GR. 2008. Influence of lycopene and vitamin C from tomato juice on biomarkers of oxidative stress and inflammation. *British Journal of Nutrition.* 99 (1): 137–146.

Ji G, Zhao X, Leng L, Liu P, Jiang Z. 2011. Comparison of dietary control and atorvastatin on high fat diet induced hepatic steatosis and hyperlipidemia in rats. *Lipids Health Dis.* Jan 26; 10:23.

Kanuri G, Bergheim I. 2013. In vitro and in vivo models of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Int J Mol Sci.* Jun 5; 14(6):11963–80.

Kanuri, G.; Spruss, A.; Wagnerberger, S. 2011. Role of tumor necrosis factor alpha [TNFalpha] in the onset of fructose-induced nonalcoholic fatty liver disease in mice. *J. Nutr. Biochem.* 22, 527–534.

Kim JY, Paik JK, Kim OY, Park HW, Lee JH, Jang Y, Lee JH. 2011. Effects of lycopene supplementation on oxidative stress and markers of endothelial function in healthy men. *Mar;* 215 (1):189–95.

Kim MJ, Jung HN, Kim KN, Ho-Kyung Kwak HK. 2008. Effects of cranberry powder on serum lipid profiles and biomarkers of oxidative stress in rats fed an atherogenic diet. *Nutrition Research and Practice*, 2(3), 158–164.

Koningsberg M. 2008. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. México, D.F.

Kuhad A, Sharma S, Chopra K. 2008. Lycopene attenuates thermal hyperalgesia in a diabetic mouse model of neuropathic pain. *Eur J Pain*. 12: 624–632.

Kumar V, Abbas A, Fausto N, Aster J. Robbins y Cotran. 2010. Patología estructural y funcional. Octava Edición. Elsevier Saunders, España.

Lee HY, Birkenfeld AL, Jornayvaz FR, Jurczak MJ, Kanda S, Popov V, Frederick DW, Zhang D, Guigni B, Bharadwaj KG, Choi CS, Goldberg IJ, Park JH, Petersen KF, Samuel VT, Shulman GI. 2011. Apolipoprotein CIII Overexpressing Mice Are Predisposed to Diet-Induced Hepatic Steatosis and Hepatic Insulin Resistance. *Hepatology*. 54:1650–1660.

Leite NC, Villela-Norueira CA, Cardoso CR, Salles GF. 2014. Non-alcoholic fatty liver disease and diabetes: from physiopathological interplay to diagnosis and treatment. *World J Gastroenterol*; 20:8377–8392.

Li J, Sun YM, Wang LF, Li ZQ, Pan W, Cao HY. 2010. Comparison of effects of simvastatin versus atorvastatin on oxidative stress in patients with coronary heartdisease. *Clin Cardiol*. Apr; 33(4):222–7.

Liu D, Shi J, Colina Ibarra A, Kakuda Y, Xue SJ. 2008. The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and b-carotene mixtures on the DPPH free radical *Food Science and Technology* 41, 1344–1349.

Lorenz M, Fechner M, Kalkowski J, Fröhlich K, Trautmann A, Böhm V, Liebisch G, Lehneis S, Schmitz G, Ludwig A, Baumann G, Stangl K, Stangl V. 2012. Effects of lycopene on the initial state of atherosclerosis in New Zealand White (NZW) rabbits. *PLoS One*, 7:e30808.

Luyckx FH, Lefebvre PJ, Scheen AJ. 2000. Non-alcoholic steatohepatitis: association with obesity and insulin resistance, and influence of weight loss. *Diabetes Metab*. Apr;26(2):98-106.

Marsh, D.J.; Hollopeter, G.; Huszar, D. 1999. Response of melanocortin-4 receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nat. Genet*. 21, 119–122.

Martín-Pozuelo G, Navarro-González I, González-Barrio R, Santaella M, García-Alonso J, Hidalgo N, Gómez-Gallego C, Ros G, Periago. 2014. The effect of tomato juice supplementation on biomarkers and gene expression related to lipid metabolism in rats with induced hepatic steatosis. *MJ Eur J Nutr*. Sep;54(6):933–44.

Masuoka HC, Chalasani N: Nonalcoholic fatty liver disease: an emerging threat to obese and diabetic individuals. *Ann N Y Acad Sci* 2013;1281:106–122.

Mataix, V. J. 2002 *Nutrición y Alimentación Humana (Ed.) Situaciones Fisiológicas y Patológicas*. p 1033. Oceano/ergon, Barcelona.

- Mayer J, Bates MW, Dickie MM. 1951. Hereditary diabetes in genetically obese mice. *Science*. 113, 746–747.
- Mayer J, Dickie MM, Bates MW. 1951. Free selection of nutrients by hereditarily obese mice. *Science*, 113, 745–746
- McCord, Fridovich. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*. 244:6049–6055.
- McCullough A. 2004. The clinical features, diagnosis and natural history of nonalcoholic fatty liver disease *Clin Liver Dis* 8. 521– 533.
- Miranda-Nantes CC, Fonseca EA, Zaia CT, Dekker RF, Khaper N, Castro IA, Barbosa AM. 2011. Hypoglycemic and Hypocholesterolemic Effects of Botryosphaeran from *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 in Diabetes-Induced and Hyperlipidemia Conditions in Rats. *Mycobiology*. Sep; 39(3):187–93.
- Misra R, Mangi S, Joshi S, Mittal S, Gupta SK, Pandey RM. 2006. LycoRed as an alternative to hormone replacement therapy in lowering serum lipids and oxidative stress markers: a randomized controlled clinical trial. *J Obstet Gynaecol Res*. Jun; 32(3):299–304.
- Mulkalwar SA, Munjal NS, More UK, More B, Chaudhari AB, Dewda PR. 2012. Effect of purified lycopene on lipid profile, antioxidant enzyme and blood glucose in hyperlipidemic rabbits. *Am J Pharm Tech Res*. 2: 461–470.
- Muniyappa R, Lee S, Chen H, Quon MJ. 2008. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. Jan; 294(1):E15–26. Epub Oct 23.
- Musso G, Gambino R, Cassader M. 2009. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid Res*. Jan; 48(1):1–26.
- Nakayama H, Otabe S, Ueno T. 2007. Transgenic mice expressing nuclear sterol regulatory element-binding protein 1c in adipose tissue exhibit liver histology similar to nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism*, 56, 470–475.
- Naoumova RP, Stuart D, Loukianos Rallidis, Omar Abu-Muhana, Clare Neuwirth, Nigel B. Rendell, Graham W. Taylor, Gilbert R. Thompson. 1997. Prolonged inhibition of cholesterol synthesis explains the efficacy of atorvastatin. *Lipid Res*. 38: 1496–1500.
- Navarro-González Inmaculada, Horacio Pérez-Sánchez, Gala Martín-Pozuelo, Javier García Alonso, María Jesús Periago. *Plos One*. 2014. January, Volume 9, Issue 1.

Neyestani TR, Shariatzadeh N, Gharavi A, Kalayi A, Khalaji N. 2007. Physiological dose of lycopene suppressed oxidative stress and enhanced serum levels of immunoglobulin M in patients with Type 2 diabetes mellitus: a possible role in the prevention of long-term complications. *J Endocrinol Invest*. Nov; 30(10):833–8.

Oana F, Takeda H, Hayakawa K. 2005. Physiological difference between obese [fa/fa] Zucker rats and lean Zucker rats concerning adiponectin. *Metabolism*, 54, 995–1001.

Ongi JP, Younossi ZM. 2007. Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH. *Clin Liv Dis* 11:1.

Paglia DE, Valentine WN. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*;70:158–169.

Palozza P, Simone R, Catalano a, Monego G, Barini A, Mele MC, Parrone N, Trombino S, Picci N, Ranelletti FO. 2011. Lycopene prevention of oxysterol-induced proinflammatory cytokine cascade in human macrophages: inhibition of NF- κ B nuclear binding and increase in PPAR γ expression. *J Nutr Biochem*. 22:259–268.

Pan M, Lai Ch, Tsai M, Ho Ch. 2014. Chemoprevention of nonalcoholic fatty liver disease by dietary natural compounds. *Mol Nutr Food Res*. 58, 147–171.

Parthasarathy S, Bin Azizi J, Ramanathan S, Ismail S, Sasidharan S, Said MI, Mansor SM. 2009. Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of aqueous, methanolic and alkaloid extracts from *Mitragyna speciosa* (Rubiaceae family) leaves. *Molecules*. Oct 9; 14(10):3964–74.

Petta S, Muratoreb C, Craxia A. 2009. Non-alcoholic fatty liver disease pathogenesis: The present and the future *S. Digestive and Liver Disease* 41; 615–625.

Postic C, Girard J. 2008. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes Metab*; 34:643–648.

Ramesh E, Elanchezhiana R, Sakthivela M, Jayakumara T, Senthil Kumar RS. Geraldine P, Thomas PA. 2008. Epigallocatechin gallate improves serum lipid profile and erythrocyte and cardiac tissue antioxidant parameters in Wistar rats fed an atherogenic diet. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 22 (2008) 275–284.

Ramesh E, Jayakumar T, Elanchezhian R, Sakthivel M, Geraldine P, Thomas PA. 2009. Green tea catechins, alleviate hepatic lipidemic-oxidative injury in Wistar rats fed an atherogenic diet. *Chem Biol Interact*;180:10–19.

- Rao AV, Agarwal S. 1998. Bioavailability and in vivo antioxidant properties of lycopene from tomato products and their possible role in the prevention of cancer. *Nutr Cancer*. 31:199 – 203.
- Ried K. 2011. Protective effect of lycopene on serum cholesterol and blood pressure: metaanalyses of intervention trials. *Maturitas*. 68: 299–310.
- Rinella ME, Elias MS, Smolak RR. 2008. Mechanisms of hepatic steatosis in mice fed a lipogenic methionine choline-deficient diet. *J. Lipid Res*. 49, 1068–1076.
- Robertson G, Leclercq I, Farrell GC. 2001. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. Nov; 281(5):G1135–9.
- Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. 2012. Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med* 52:59–69.
- Ryan MC, Itsiopoulos C, Thodis T. 2013. The Mediterranean diet improves hepatic steatosis and insulin sensitivity in individuals with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*; 59:138–143.
- SasidharanSR, Joseph JA, Anandakumar S, Venkatesan V, Madhavan CN, Agarwal A. 2014. *Scientific World Journal*. Ameliorative potential of *Tamarindus indica* on high fat diet induced nonalcoholic fatty liver disease in rats. Feb 4; 2014:507197.
- Schachter M. 2005. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundam Clin Pharmacol*. Feb; 19(1):117–25.
- Sezer ED, Eser YS, Deniz N, Taner O. 2011. Effect of atorvastatin therapy on oxidantantioxidant status and atherosclerotic plaque formation. *Vascular Health and Risk Management*, 7 333–343.
- Sheela CG, Augusti KT. 1995. Antiperoxide effects of S-allyl cysteine sulphoxide isolated from *Allium sativum* Linn and guggulipid in cholesterol diet fed rats May; 33(5):337–41.
- Shidfar F, Froghifar N, Vafa M, Rajab A, Hosseini S, Shidfar S & Gohari M. 2011. The effects of tomato consumption on serum glucose, apolipoprotein B, apolipoprotein A-I, homocysteine and blood pressure in type 2 diabetic patients. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, May; 62(3): 289–294.
- Shimomura I, Hammer RE, Richardson JA. 1998. Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: Model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev*. 12, 3182–3194.

Silaste ML, Alfthan G, Aro A, Kesäniemi A, Hörkkö S. 2007. Tomato juice decreases LDL cholesterol levels and increases LDL resistance to oxidation. *British Journal of Nutrition*. 98: 1251–1258.

Sorrentino G, Crispino P, Coppola D, De Stefano G. 2015. Efficacy of lifestyle changes in subjects with non-alcoholic liver steatosis and metabolic syndrome may be improved with an antioxidant nutraceutical: a controlled clinical study. *Drugs R D*;15:21–25.

Spruss A, Kanuri G, Wagnerberger S. 2009. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology*, 50, 1094–1104.

Stryer Lubert, Berg Jeremy M, Tymoczko John L. 2013. *Bioquímica con aplicaciones clínicas*. 7 ed. Ed. Reverté S.A. España.

Subhash K, Bose C, Agrawal BK. 2007. Effect of short term supplementation of tomatoes on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in type-II diabetes. *Indian J Clin Biochem*. Mar; 22(1):95–8.

Sutherland LN, Capozzi L C, Turchinsky N J, Bell R C, Wright DC. 2008. Time course of high-fat diet-induced reductions in adipose tissue mitochondrial proteins: potential mechanisms and the relationship to glucose intolerance. *American Journal of Physiology*, vol. 295, no. 5, pp. E1076–E1083.

Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. 2012. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J. Gastroenterol*. 18, 2300–2308.

Torbergson AC, Collins AR. 2000. Recovery of human lymphocytes from oxidative DNA damage; the apparent enhancement of DNA repair by carotenoids is probably simply an antioxidant effect. *Eur J Nutr*. Apr; 39(2):80–5.

Tremblay AJ, Lamarche B, Lemelin V, Hoos L, Benjannet S, Seidah NG, Davis HR Jr, Couture P. 2011. Atorvastatin increases intestinal expression of NPC1L1 in hyperlipidemic men. *J Lipid Res*. Mar; 52(3):558–65.

Tuomisto JT, Pohjanvirta R, Unkila M, Tuomisto J *Pharmacol Biochem Behav*. 1999. TCDD-induced anorexia and wasting syndrome in rats: effects of diet-induced obesity and nutrition. Apr; 62(4):735–42.

Upritchard JE, Sutherland WH, Mann JI. 2000. Effect of supplementation with tomato juice, vitamin E, and vitamin C on LDL oxidation and products of inflammatory activity in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. Jun; 23(6):733–8.

- Uyeda K, Repa J. 2006. Carbohydrate response element binding protein, ChREBP, a transcription factor coupling hepatic glucose utilization and lipid synthesis *J Cell Metab.* Aug; 4(2):107–110.
- Varela-Rey M, Embade N, Ariz U, Lu S, Mato JM, Martínez-Chantar ML. 2009. Non-alcoholic steatohepatitis and animal models: Understanding the human disease. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 41. 969–976.
- Verghese M, Richardson JE, Boateng J, Shackelford LA. 2008. Dietary lycopene has a Protective Effect on Cardiovascular Disease in New Zealand Male Rabbits. *J Biol Sci* 8(2): 268–77.
- Walldius, G I. Jungner, I, Holme, A.H. Aastveit, W. Kolar and E. Steiner. 2001. High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): A prospective study. *Lancet*, 358 (9298): 2026–2033.
- Wang Y, Ausman LM, Greenberg AS, Russell RM, Wang XD. 2010. Dietary lycopene and tomato extract supplementations inhibit nonalcoholic steatohepatitis-promoted hepatocarcinogenesis in rats. *Int J Cancer*;126:1788–1796.
- Wassmann S, Laufs U, Müller K, Konkol C, Ahlbory K, Bäumer AT, Linz W, Böhm M, Nickenig G. 2002. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Feb 1; 22(2):300–5.
- Williams D, Feely J. 2002. Pharmacokinetic-pharmacodynamic drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors. *Clin Pharmacokinet.* 41(5):343–70.
- Wong VW, Wong GL, Choi PC. 2010. Disease progression of non-alcoholic fatty liver disease: a prospective study with paired liver biopsies at 3 years. *Gut*; 59:969–974.
- Wortham M, He L, Gyamfi M. 2008. The transition from fatty liver to NASH associates with SAMe depletion in db/db mice fed a methionine choline-deficient diet. *Dig. Dis. Sci.* 53, 2761–2774.
- Wright JR, Colby HD, Miles PR. 1981. Cytosolic factors which affect microsomal lipid peroxidation in lung and liver. *Arch Biochem Biophys*;206: 296–304.
- Xia X, Ma Y, Xing X, Huang C, Li L, Gui G, Liu Q, Xue S. 2013. Antioxidant and hepatoprotective effect of different extracts of *Guizhencao* (herba *Bidentis bipinnatae*) against liver injury in hyperlipidemia rats. Aug; 33(4):518–23.
- Yalniz M, Bahcecioglu IH, Kuzu N, Poyrazoglu OK, Bulmus O, Celebi S, Ustundag B, Ozercan IH, Sahin K. 2007. Preventive role of genistein in an experimental non-alcoholic steatohepatitis model. *J Gastroenterol Hepatol.* Nov; 22(11):2009–14.

Yasim A, Ozbag D, Kilinc M, Ciralik H, Toru H, Gümüřalan Y. 2010. Effect of atorvastatin and ezetimibe treatment on serum lipid profile and oxidative state in rats fed with a high-cholesterol diet. *Am J Med Sci.* May; 339(5):448–52.

11. APÉNDICE

Abreviaturas

ALT	Alaninoamino transferasa
AST	Aspartatoamino transferasa
AT	Atorvastatina
CAT	Catalasa
CT	Colesterol total
d	día
DN	Dieta normal
dL	deci litro
g	gramos
g	gravedades
°C	Grado centígrado
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
HGNA	Hígado graso no alcohólico
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HFD	Dieta alta en grasa
EHNA	Esteatohepatitis no alcohólica
kg	kilogramos
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LYC	Licopeno
mg	miligramo
mL	mililitro
µg	Microgramo
rpm	Revoluciones por minuto
s	semanas
SD	Desviación estándar
SE	Error estándar
SOD	Superóxido dismutasa
TG	Triglicéridos
v/v	Volumen a volumen
µg	migro