



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Nutrición Humana

**Efecto de una dieta alta en grasa y colesterol sobre
marcadores hepáticos de estrés oxidativo en ratas *Sprague-Dawley***

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Nutrición Humana

Presenta:

Angélica Hernández Rodríguez

Dirigido por:

Dra. Minerva Ramos Gómez

Dra. Minerva Ramos Gómez

Presidente

M. en C. Rosa María Piña Zentella

Secretario

Dr. Jorge Luis Rosado Loria

Vocal

M en C Roberto Augusto Ferriz Martínez

Suplente

Dr. Olga Patricia García Obregón

Suplente

Dra. Margarita Teresa de Jesús
García Gasca

Director de la Facultad

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Dr. Irineo Torres Pacheco

Director de Investigación y
Posgrado

RESUMEN

EFFECTO DE UNA DIETA ALTA EN GRASA Y COLESTEROL SOBRE MARCADORES HEPÁTICOS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY

La enfermedad más común del hígado y de mayor importancia clínica es la enfermedad del hígado graso no alcohólico (HGNA, o NAFLD por sus siglas en inglés) y la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA o NASH por sus siglas en inglés); que se caracteriza por la acumulación de grasa en el hígado causada por diversos factores no asociados al consumo de alcohol, incluyendo la alteración en los parámetros metabólicos debido al consumo no moderado de nutrientes como una dieta alta en grasas y colesterol (HFHC por sus siglas en inglés) y el estrés oxidativo (EO) que se deriva de este exceso de consumo de nutrientes. Este último factor juega un papel determinante en la aparición de HGNA y su progresión a formas más graves de enfermedades del hígado. Una dieta alta en grasa y colesterol alterará marcadores hepáticos, aspartato aminotransferasa y alaninoaminotransferasa (ASL y ALT) y de estrés oxidativo, produciendo HGNA en ratas Sprague-Dawley. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de una dieta HFHC sobre marcadores de estrés oxidativo en hígado y su relación con daño histopatológico y parámetros bioquímicos en suero. Las ratas se sometieron a una dieta HFHC por 4 semanas, al término de este periodo se realizó un sacrificio parcial. Se evaluó el daño hepático por histopatología, así como las enzimas ASL y ALT y el perfil lipídico en suero. Se prepararon homogenados hepáticos para determinar la actividad de catalasa, glutatión s-transferasa y glutatión peroxidasa (CAT, GST y GPX), así como la concentración de GSH y malondialdehído (MDA). Una dieta alta HFHC induce esteatosis hepática no dependiente de alcohol confirmada con estudios histopatológicos. El cambio de dieta fue eficaz en normalizar los marcadores bioquímicos en suero (TG, COL, HDL y LDL), pero no así en el contenido de lípidos en hígado (TG y CT). El daño oxidativo se ve evidenciado por la disminución en las actividades de las enzimas antioxidantes, (CAT) y (GST), así como de los niveles del (GSH), que actúan como eliminadores del estrés oxidativo asociado a la progresión desde la esteatosis simple a esteatohepatitis. Como estrategia de tratamiento el cambio de dieta no es suficiente para normalizar los marcadores de estrés oxidativo. Con respecto al daño hepático, se requiere un estudio más amplio/detallado que explique la poca efectividad del cambio de dieta en revertir el daño histopatológico del hígado

Palabras clave: hígado graso no alcohólico, esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), dieta alta en grasa y colesterol, marcadores de estrés oxidativo, sistemas de defensa antioxidante.

SUMMARY

Effect of a diet high fat and high cholesterol on hepatic markers of oxidative stress in Sprague-Dawley rats

The most common disease of the liver and is the most clinically important disease of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD, or by its acronym NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH or NASH for its acronym in English); characterized by the accumulation of fat in the liver caused by factors not related to alcohol consumption, including alteration in metabolic parameters due to unmoderated nutrient intake as a diet high in fat and cholesterol (HFHC for short English) and oxidative stress (OS) that is derived from this excess nutrient intake. The latter factor plays a decisive role in the development of NAFLD and its progression to more severe forms of liver disease. A diet high in fat and cholesterol alter hepatic markers, aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase (ALT and ASL) and oxidative stress, causing NAFLD in Sprague-Dawley rats. The aim of this study was to evaluate the effect of a HFHC diet on markers of oxidative stress in liver and its relationship with histopathological damage and serum biochemical parameters. Rats were subjected to a HFHC diet for 4 weeks, at the end of this period a partial sacrifice was performed. Histopathology liver damage, as well as enzymes ALT and ASL and serum lipid profile evaluated. Liver homogenates were prepared to determine the activity of catalase, glutathione s-transferase and glutathione peroxidase (CAT, GST and GPX) and GSH concentration and malondialdehyde (MDA). A diet HFHC induces NAFLD confirmed by histopathology study. The change of diet was effective in normalizing biochemical serum markers (TG, CHOL, HDL and LDL), but not in the lipid content in liver (TG and CT). Oxidative damage is evidenced by the decrease in the activities of antioxidant enzymes, (CAT) and (GST), as well as levels (GSH), which act as scavengers of oxidative stress associated with the progression from simple steatosis to steatohepatitis. As treatment strategy changing diet is not sufficient to normalize stress markers oxidativo. With respect to liver damage, a larger / detailed study to explain the ineffectiveness of diet change to reverse liver damage histopathological required

Keywords: Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), nonalcoholic steatohepatitis (NASH), diet high in fat and cholesterol, markers of oxidative stress, antioxidant defense systems

ÍNDICE

RESUMEN	2
SUMMARY	3
ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
I. INTRODUCCIÓN	9
II. REVISIÓN DE LITERATURA	10
2.1. ENFERMEDADES HEPÁTICAS	10
2.2. HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO (HGNA)	11
2.2.1. Epidemiología	12
2.2.2. Histopatología de la HGNA	13
2.2.3. Factores de riesgo	13
2.2.4. Metabolismo de las grasas	15
2.2.5. Metabolismo de los carbohidratos	18
2.2.6. Alteraciones moleculares.....	19
2.3. HGNA Y ESTRÉS OXIDATIVO	20
2.3.1. Sistemas antioxidantes	22
2.3.2. Mecanismos enzimáticos y no enzimáticos.....	23
2.3.3. Sistemas no enzimáticos	25
2.4. TRATAMIENTO PARA LA HGNA.....	26
2.5. MODELOS ANIMALES DE HGNA.....	26

III. OBJETIVOS	28
IV. METODOLOGÍA	29
5.1 ANIMALES.....	29
5.1.1 Materiales y reactivos	29
5.2. MODELO ANIMAL CON DIETA ALTA EN GRASA Y COLESTEROL	30
5.3 TRATAMIENTO.....	31
5.4 SACRIFICIO DE ANIMALES Y OBTENCIÓN DE ÓRGANOS	32
5.5 PREPARACIÓN DE HÍGADOS PARA EL ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO	32
5.6 PROCEDIMIENTOS.....	32
5.6.1 Obtención de sangre	32
5.6.2 Determinación del perfil lipídico en plasma	33
5.6.3 Cuantificación del contenido lipídico en hígado.....	33
5.6.4 Análisis histopatológico	33
5.6.5 Determinación cuantitativa de alanina aminotransferasa (ALT)	34
5.6.6. Determinación cuantitativa de aspartato aminotransferasa (AST)	34
5.6.7 Preparación de homogenados citosólicos.....	35
5.6.8 Determinaciones enzimáticas y no enzimáticas	36
5.6.8.1 Determinación de la concentración de malondialdehído (MDA).	36
5.6.8.2 Cuantificación de proteínas en los homogenados citosólicos.....	37
5.6.8.3 Determinación de la concentración de glutatión reducido (GSH).....	37
5.6.8.4 Determinación de la actividad de glutatión-S-transferasa (GST)	38
5.6.8.5 Determinación de la actividad de glutatión peroxidasa (GPX).....	39

V. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	42
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
7.1 Efecto del cambio de dieta en el peso corporal	43
7.2 Efecto del cambio de dieta sobre los parámetros bioquímicos en suero	45
7.3 Efecto del cambio de dieta sobre las enzimas de daño hepático AST y ALT	46
7.4 Efecto del cambio de dieta sobre el análisis histopatológico.....	47
7.5. Efecto del cambio de dieta en las concentraciones de colesterol y triglicéridos en tejido hepático	50
7.7 Alteración de los sistemas antioxidantes en tejido hepático.....	51
I. CONCLUSIONES	57
ANEXOS	58
LITERATURA CITADA.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Progresión de EHNA a cirrosis hepática.....	11
2	Epidemiología en la progresión de HGNA hasta cirrosis hepática ..	12
3	Conformación de una lipoproteína	16
4	Esquema del metabolismo de las grasas.....	17
5	La glutatión peroxidasa elimina el H ₂ O ₂ , así como los peróxidos de lípidos.....	24
6	Mecanismos enzimáticos y no enzimáticos	26
7	Diseño experimental.....	32
8	Efecto de la dieta en el peso corporal de las ratas durante el periodo de experimentación	44
9	Histoarquitectura de tejido hepático de los animales de experimentación.....	49
10	Comparación de los marcadores de estrés oxidativo entre grupos experimentales.....	56
11	Efecto de una dieta alta HFHC sobre marcadores de estrés oxidativo y alteraciones histopatológicas en el hígado de ratas SP.....	58

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Modelos animales dieta alta en grasa y colesterol (HFHC)....	27
2	Composición de la dieta HFHC y dieta comercial	31
3	Clasificación histológica de los grados de esteatosis.....	34
4	Parámetros bioquímicos en suero	46
5	Enzimas AST y ALT en suero	48
6	Daño hepático. Grados de esteatosis y colesterosis	49
7	Concentraciones de colesterol y triglicéridos en tejido hepático y peso relativo de hígado.....	51
8	Marcadores de estrés oxidativo en hígado (GST , GSH, CAT, GPx , MDA/TBARS y GSH)	52

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades del hígado ocupan el 5to lugar dentro de las principales causas de muerte a nivel mundial. El hígado es el órgano blanco de diversas afecciones, entre las que destacan el hígado graso no alcohólico (HGNA) o NAFLD por sus siglas en inglés (Non alcoholic Fatty Liver Disease), que constituye un importante problema de salud. Así mismo, estudios demuestran que la alimentación de dietas ricas en colesterol y grasas saturadas induce la producción de radicales libres (RLs), seguido por el estrés oxidativo (EO); esta condición juega un papel determinante en la aparición de HGNA y su progresión a formas más graves de enfermedades del hígado.

La Fundación Americana del Hígado ha reconocido que la obesidad, la diabetes, los niveles elevados de grasa en la sangre (hiperlipemia) y resistencia a la insulina, se relacionan con la HGNA. De este modo, el metabolismo del colesterol y su relación con las enfermedades hepáticas son aspectos de enorme preocupación que pueden, en buena medida, controlarse nutricionalmente.

El presente trabajo pretende evaluar el efecto de una dieta alta en grasa y colesterol sobre marcadores hepáticos de estrés oxidativo en ratas Sprague-Dawley; así como determinar el efecto del cambio de dieta o estilo de vida en la normalización de estas alteraciones.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Enfermedades hepáticas

El hígado cumple múltiples funciones que guardan relación entre sí; de esta manera, en los trastornos hepáticos se alteran numerosas funciones a la vez (Guyton y Hall, 2011).

Diversos estudios han demostrado la relación entre la obesidad y enfermedades en la vida adulta, tales como hipertensión arterial, diabetes mellitus tipo 2, cáncer, enfermedades cardiovasculares. El exceso de grasa en el cuerpo, principalmente en forma de obesidad central, está estrechamente relacionada con estas enfermedades, especialmente con la enfermedad de hígado graso no alcohólico o HGNA (Damaso y col., 2007). Como resultado de la creciente prevalencia de la obesidad, las enfermedades del hígado pueden llegar a ser el trastorno hepático más común en los países desarrollados (Dixon y col., 2004).

Se reconoce como enfermedad del hígado graso no dependiente de alcohol (HGNA), y la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), al trastorno hepático observado en pacientes sin historia de consumo significativo de alcohol (Videla y col., 2004). La esteatosis hepática representa la forma más común de las enfermedades del hígado, además de ser un precursor de fibrosis, cirrosis y hepatocarcinoma. El estrés oxidativo juega un papel determinante en la aparición de esteatosis y su progresión a formas más graves de enfermedades del hígado. Además, este factor juega un papel importante en el desarrollo de la inflamación y fibrogénesis (García y col., 2013).

El estado de estrés oxidativo hepático podría promover el daño hepatocelular por inducción, alteración grave oxidativo de biomoléculas, con pérdida de sus funciones y el deterioro de la viabilidad celular, logrando así el desarrollo de la esteatohepatitis no alcohólica (Videla, 2009).

2.2. Hígado graso no alcohólico (HGNA)

La expresión “enfermedad del hígado graso no alcohólico” (HGNA, o NAFLD por sus siglas en inglés) se utiliza para describir diferentes cambios grasos hepáticos y la etapa más temprana del HGNA es la esteatosis hepática simple, que se caracteriza por la deposición de triglicéridos citoplasmáticos como macro y/o micro vesicular vacuolas lipídicas en más del 5% de los hepatocitos (Guías de la Organización Mundial de Gastroenterología-OMG, 2012; Bergheim y Kanuri, 2013).

La enfermedad de HGNA se define, actualmente, como la acumulación de grasa hepática, que excede 5 a 10% del peso del órgano, pero se estima como el porcentaje de hepatocitos afectados en el estudio de microscopía de luz (Neuschwander y Caldwell, 2003).

La acumulación excesiva de triglicéridos en los hepatocitos surge de un desbalance entre los triglicéridos adquiridos y removidos, como resultado de una dieta hipercalórica y/o desequilibrada, un aumento de los triglicéridos en la síntesis *de novo* y una mayor lipólisis en el tejido adiposo. La esteatosis hepática es a menudo autolimitada; sin embargo, ésta puede progresar a esteatosis hepática no alcohólica (EHNA) y distinguirse de la esteatosis simple por la presencia de lesión hepatocelular, inflamación de los hepatocitos y/o el depósito de colágeno (por ejemplo, fibrosis) (Bergheim y Kanuri, 2013) (Figura 1).

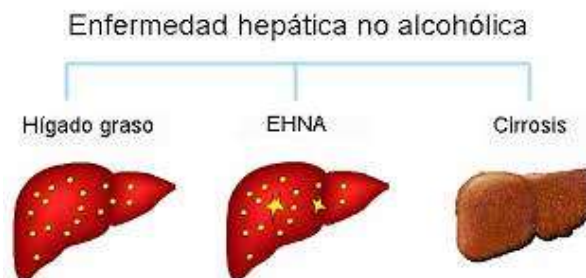


Figura 1. Desarrollo y progresión de la HGNA (Tariq y col., 2014).

2.2.1. Epidemiología

La prevalencia de esteatosis en países occidentales es de aproximadamente el 30%, mientras que en países asiáticos es del 15%. Se estima que el HGNA/EHNA ha de aumentar un 26% los costos médicos directos e indirectos en un quinquenio (Guías de la OMG, 2012).

Se ha establecido que la obesidad y la diabetes tipo 2 promueven el desarrollo de HGNA (Bujanda y col., 2008), por lo que entre un 69-98% de los pacientes con HGNA son obesos y de 65-70% de los personas con diabetes tipo 2 tienen HGNA .Aproximadamente del 10 al 30% de los pacientes con HGNA desarrollan EHNA (Wang y col., 2013). Es importante reconocer que a pesar que el HGNA no representa una causa de mortalidad a corto plazo, la progresión de esta condición a EHNA aumenta considerablemente el riesgo de cirrosis, falla hepática, y carcinoma hepatocelular (Guías de la OMG, 2012). La progresión de HGNA a EHNA se ha informado con cifras que varían de 1 a 40%. Estas diferencias dependen de la población estudiada y de los factores de riesgo presentes. Los principales factores incluyen la resistencia a la insulina, la dislipidemia (hipertrigliceridemia), el origen hispano y la obesidad central. Entre 3 y 5% de los sujetos con EHNA progresan a cirrosis hepática en un tiempo promedio de 20 años y de éstos 8% desarrollan hepatocarcinoma (Figura 2) (Bujanda y col.;2008).

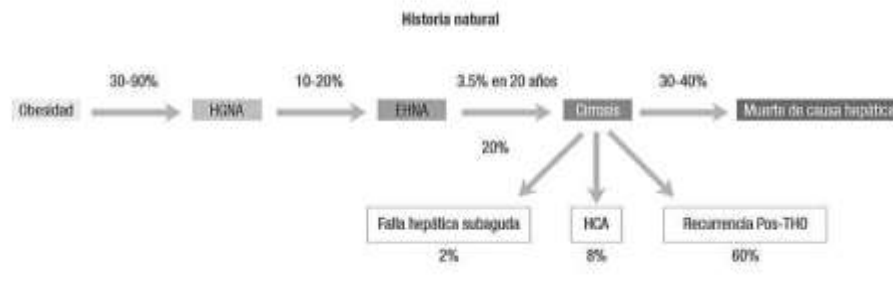


Figura 2. Epidemiología en la progresión de HGNA hasta cirrosis hepática

(Adaptado de Bujanda y col., 2008)

Aunque en México no hay estudios que documenten la prevalencia real de HGNA, partiendo de los patrones de obesidad y desarrollo HGNA en esta porción de la población mexicana se puede hacer una extrapolación. Con los datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT) que indican que el 32.7% de la población mexicana reúne los criterios de obesidad y que en promedio el 75% de estas personas puede padecer HGNA, se deduce que aproximadamente el 20% de la población mexicana podría tener HGNA. Además, teniendo en cuenta el último censo de población realizado por el INEGI en 2010, se estimaría que cerca de 22 millones de mexicanos están en riesgo de padecer HGNA. Esto sin tomar en cuenta los pacientes no obesos con hipertensión, diabetes y dislipidemia, por lo que las cifras anteriores podrían ser mayores.

2.2.2. Histopatología de la HGNA

El rasgo histológico más importante de la HGNA es la esteatosis de los hepatocitos, la cual se clasifica en macrovesicular y microvesicular. La esteatosis macrovesicular se caracteriza por grandes vacuolas que ocupan casi todo el citoplasma y que empujan el núcleo a la periferia de la célula. La esteatosis microvesicular se caracteriza por múltiples pequeñas vacuolas lipídicas, y el núcleo se encuentra en el centro de la célula. Típicamente, la esteatosis en la HGNA es centrolobulillar y macrovesicular. La esteatosis en más de 5% de los hepatocitos es necesaria para un diagnóstico de hígado graso no alcohólico (Takahashi, 2012).

2.2.3. Factores de riesgo

Los factores dietéticos y estilo de vida pueden contribuir a la acumulación de grasa en el hígado a través de múltiples vías, tal es el caso de alteraciones en los parámetros metabólicos ocasionados por el consumo no moderado de nutrientes como una dieta alta en grasas, el sedentarismo y el estrés oxidativo. (Videla y col., 2004).

Además, otros parámetros metabólicos incluyen la disfunción mitocondrial, el desequilibrio de aminoácidos, la hiperglucemia y los desequilibrios hormonales (Videla y col., 2004).

Entre los factores de riesgo más repetitivos para HGNA son la obesidad central, la resistencia a la insulina, la hiperglucemia en ayuno y la hipertrigliceridemia, siendo HGNA también considerada como una manifestación hepática del síndrome metabólico (Marchesini y col. 2003). Con respecto a la enfermedad avanzada de HGNA a EHNA, una correlación positiva significativa se ha identificado entre el estadio de fibrosis avanzada y los índices de adiposidad (por ejemplo, IMC, colesterol y niveles de LDL) (Rivera, 2008).

Estudios en pacientes con HGNA han encontrado que el consumo de carbohidratos simples, conducen a un aumento de las concentraciones circulantes de insulina, que contribuyen a las concentraciones elevadas de triglicéridos en ayunas, incluso bajo condiciones isocalóricas, dado que una dieta baja en grasas y alta en carbohidratos promueve el desarrollo de HGNA a través del aumento de la síntesis *de novo* de ácidos grasos. Una ingesta de hidratos de carbono más elevado (más de 54% de calorías) se ha asociado con inflamación del hígado (Sullivan, 2010).

Los carbohidratos refinados y grasas saturadas pueden tener un mayor potencial para aumentar la producción hepática de colesterol y triglicéridos (Fletcher y col., 2005). Es posible que las cantidades bajas a moderadas de grasa y el consumo de carbohidratos complejos puedan ser más benéficos en la mejora de HGNA. Además, el ejercicio moderado con cambios en la dieta es más eficaz en la mejora de anomalías del hígado que únicamente la dieta, y puede mejorar la HGNA independientemente de la pérdida de peso (Ueno y col., 1997; Hickman y col., 2004; Suzuki y col., 2005; Tamura y col., 2005; Eckard y col., 2013).

2.2.4. Metabolismo de las grasas

El hígado es el órgano metabólico central que controla los aspectos clave del metabolismo de los lípidos y la glucosa, en respuesta a señales nutricionales y hormonales. En condiciones de ayuno, el hígado convierte reservas de lípidos y glucógeno en energía disponible a través del proceso de la β -oxidación de ácidos grasos y la glucogenólisis/gluconeogénesis (Schug y Li, 2011).

La mayoría de los tejidos tienen la capacidad para la síntesis de colesterol pero no la desarrollan, puesto que el hígado suministra permanentemente colesterol a los tejidos a través de las lipoproteínas, y la entrada de colesterol a los tejidos inhibe la síntesis en los tejidos periféricos. En el hígado se produce la inhibición de la síntesis con la entrada de colesterol de la dieta, que llega al hígado formando parte de los remanentes de quilomicrones. Por lo tanto, el hígado se convierte en el árbitro que determina las necesidades de colesterol para el conjunto de órganos/tejidos y pone en marcha su síntesis sólo cuando el aporte dietético es insuficiente (Sánchez y Gil, 2010).

El hígado capta de forma eficiente el colesterol de origen dietético transportado en forma de quilomicrones (QM) y el de origen endógeno, proveniente de los órganos periféricos (por ejemplo, músculo y tejido adiposo), transportado en lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Los lípidos neutros mayoritarios (triglicéridos y ésteres de colesterol) son insolubles en el medio acuoso y deben estar cubiertos por moléculas anfipáticas (hidrofílicas e hidrofóbicas) para poder ser transportados en la sangre. Estas moléculas, denominadas lipoproteínas, son agregados esféricos que contienen proteínas (llamadas apoproteínas), colesterol libre y fosfolípidos alrededor del núcleo, donde se alojan las sustancias hidrofóbicas (ésteres de colesterol, triglicéridos), que se hacen así solubles en el agua (Figura 3) (Navarro y col., 2009).

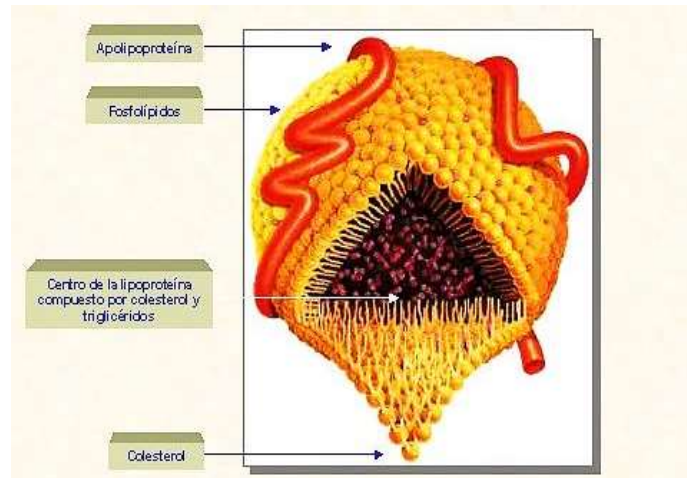


Figura 3. Conformación de una lipoproteína (Soler, 2007)

El colesterol, así como los demás componentes lipídicos de la dieta, es absorbido por los enterocitos en el intestino delgado. Una vez dentro de los enterocitos, el colesterol es esterificado e incorporado, junto con los triglicéridos procedentes también de la dieta a los QM, los cuales pasan a los canales linfáticos y después a la circulación sanguínea por la vena subclavia. En la Figura 4 se muestra un esquema básico del metabolismo y transporte de las grasas (Navarro y col., 2009).

Las lipoproteínas van descargando sus triglicéridos principalmente en el tejido adiposo (donde se almacenan como reserva) y en músculo (aportándoles energía), debido a la presencia de la enzima lipoproteína lipasa (LPL) en células endoteliales de los capilares que irrigan estos tejidos. La LPL hidroliza los triglicéridos, lo que permite la entrada de los ácidos grasos libres resultantes al interior de dichos tejidos (Navarro y col., 2009).

En el hígado, los ácidos grasos (AG) libres de todas las fuentes son oxidados por las mitocondrias, además de ser utilizados en la síntesis de triglicéridos, o para formar fosfolípidos y ésteres de colesterol. Los AG son el combustible principal oxidativo en el hígado; sin embargo, elevadas cantidades de carbohidratos y lípidos inducen cambios significativos en el metabolismo intermediario hepático. De hecho, los niveles altos de glucosa y de insulina estimulan la síntesis de AG a partir de glucosa e inhiben la β -oxidación de ácidos

grasos libres, re-dirigiendo los AG hacia la formación de triglicéridos (TG). Teniendo en cuenta que la cantidad de TG exportado como VLDL depende de la síntesis de los componentes de las proteínas, es probable que el exceso de AG sean convertidos en TG y almacenados en forma de gotitas de lípidos dentro de los hepatocitos (Reid, 2001).

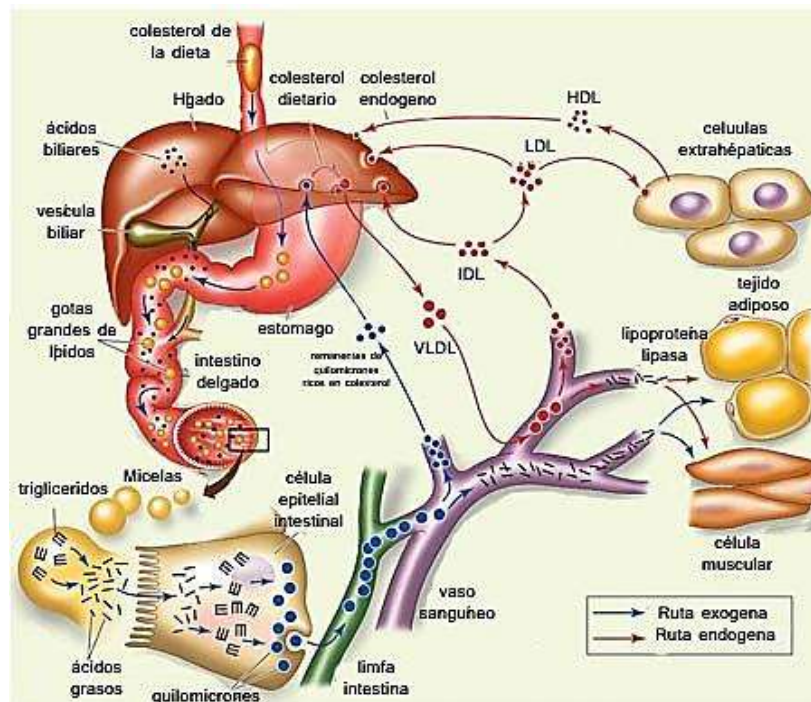


Figura 4. Esquema del metabolismo de las grasas.

IDL: lipoproteínas de densidad intermedia; LDL: lipoproteínas de baja densidad; QM: quílomicrones; LPL: lipoproteína lipasa; VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad (Adaptado de Ros y Laguna, 2006).

La acumulación de TG en hígado se produce cuando hay un cambio en el metabolismo de ácidos grasos para favorecer la lipogénesis neta en lugar de la lipólisis. Así, la esteatosis hepática se produce cuando la tasa de importación o síntesis de AG por los hepatocitos excede la tasa de exportación o el catabolismo. En consecuencia, los 4 mecanismos siguientes son posibles causas de la acumulación de lípidos en el hígado (Guyton y Hall, 2011):

1.-Aumento en entrega y la absorción en los hepatocitos de ácidos grasos de cadena larga (AGCL) por un exceso en la ingesta dietética o de la liberación del tejido adiposo.

2.- Aumento de AGCL *de novo* y síntesis de TG en hígado.

3.- La falta de la síntesis de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y exportación de TG.

4.- La falta de eliminación de ácidos grasos de cadena larga AGCL, debido a la disfunción hepática de β -oxidación mitocondrial.

Sin embargo, para entender cómo se desarrolla la HGNA es necesario entender primero cómo el hígado metaboliza los lípidos y carbohidratos bajo condiciones normales.

2.2.5. Metabolismo de los carbohidratos

Dentro del metabolismo de los hidratos de carbono, el hígado cumple estas funciones:

1. Depósito de grandes cantidades de glucógeno.
2. Conversión de galactosa y de la fructosa en glucosa.
3. Gluconeogenia.
4. Formación de compuestos químicos a partir de los productos intermedios de metabolismo de los hidratos de carbono.

El hígado resulta decisivo para mantener la glucemia dentro de los límites normales (Guyton y Hall, 2011).

El depósito de glucógeno explica por qué el hígado extrae el exceso de glucosa de la sangre, lo almacena y luego lo devuelve a la sangre cuando la glucemia empieza a descender de forma peligrosa, lo que se denomina como la función amortiguadora de la glucosa del hígado. La glucemia de una persona con una función hepática insuficiente se duplica o triplica si ingiere una comida rica en carbohidratos de carbono, con respecto a la de otra persona con una función hepática normal (Guyton y Hall, 2011).

La gluconeogenia hepática también contribuye decisivamente a mantener la glucemia dentro de la normalidad, puesto que sólo se activa en grado importante cuando la concentración de glucosa desciende por debajo de los valores normales. Entonces, grandes cantidades de aminoácidos y de glicerol de los triglicéridos se transforman en glucosa ayudando a mantener la glucemia dentro de los límites relativamente normales (Guyton y Hall, 2011).

2.2.6. Alteraciones moleculares

Una vez que se ha desarrollado la esteatosis, el hígado es sensibilizado y, por lo tanto, la respuesta inflamatoria puede acelerarse debido a una variedad de estímulos como es el caso del estrés oxidativo, citocinas pro-inflamatorias [por ejemplo, el factor de necrosis tumoral (TNF)- α], la partición de lípidos alterados y hepatotoxicidad mediada por los AG libres, colesterol anormal, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, hypoadiponectinemia (Takahashi, 2012).

Los lípidos en exceso que se acumulan bajo condiciones de sobrealimentación determinan los altos niveles intracelulares de AG saturados, que pueden inducir la disfunción celular y/o muerte celular, un fenómeno conocido como lipotoxicidad (Videla, 2009). Por lo anterior, se sugiere que el mecanismo involucrado entre la esteatosis y la obesidad ocurre cuando la cantidad de AG suministrada al hígado desde el intestino o tejido adiposo excede la cantidad necesaria para la oxidación mitocondrial, la síntesis de fosfolípidos y la síntesis de ésteres de colesterol (Reid, 2001).

Informes recientes han demostrado que la sirtuína-1 deacetilasa dependiente de NAD (SIRT1) es un importante regulador del metabolismo hepático. SIRT1 también regula el colesterol hepático y la homeostasis de ácido biliar a través de la modulación directa de los receptores X del hígado (LXR) y farnesoide X (FXR), receptores nucleares clave que funcionan como sensor de colesterol y bilis (Schug y Li, 2011).

La hipercolesterolemia exógena provoca la deposición de grasa en el hígado, la disminución de la población de hepatocitos, y también puede causar un mal funcionamiento del hígado, seguido de una aparente estenosis microvesicular debido a la acumulación intracelular de los lípidos. Además, el consumo de dietas ricas en colesterol induce la producción de radicales libres (RLs), seguido por EO e hipercolesterolemia (Ramesh y col., 2009).

2.3. HGNA y estrés oxidativo

El oxígeno molecular (O_2) es esencial para la supervivencia de los seres humanos y, en general, de todos los organismos aeróbicos (Novo y Parola, 2008). Sin embargo, el cuerpo humano produce especies reactivas de oxígeno (ERO), especies reactivas de nitrógeno (ERNs) y RLs en el proceso natural de oxidación. Estas moléculas pueden causar daños a las proteínas, a los lípidos y al ADN, pero generalmente son removidos por sustancias llamadas antioxidantes y sistemas de enzimas antioxidantes antes de que puedan atacar a las células (Balaban y col.; 2005). Por lo anterior, en el organismo existe un equilibrio entre las ERO/ERN/RLs y los sistemas de defensa antioxidante. Cuando dicho equilibrio se descompensa a favor de las primeras, se produce el denominado estrés oxidativo (EO) (Pérez, 2008).

Las diversas especies ERO/ERN/RLs en condiciones normales desempeñan un papel crucial en los distintos procesos fisiológicos que van desde la señalización celular, la inflamación y la defensa inmunitaria (Elahi y Matata, 2006). Sin embargo, cada vez hay más evidencia de que la producción anormal de ERO/ERN/RLs conducen a un aumento del estrés en las estructuras celulares y causa cambios en las vías moleculares que sustenta la patogénesis de varias enfermedades humanas importantes, incluyendo enfermedades del hígado (Pacher y Vassalle, 2008).

Un aspecto importante a considerar en el estudio del HGNA es su relación con el EO. Los estudios en modelos animales de HGNA indican una mayor producción de RLs en el hígado, como resultado del aumento del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) mitocondrial, y generación de H_2O_2 , asociado a la peroxidación de lípidos (Videla y col., 2004); por lo anterior, existe un aumento en la lipoperoxidación en HGNA (Morán-Ramos y col., 2012).

La lipoperoxidación afecta la actividad de la cadena transportadora de electrones (Cortés-Rojo y col., 2011), lo cual a su vez favorece la producción de más ERO y da lugar a un círculo vicioso. Por lo tanto, es de esperar que factores transcripcionales de regulación de sistemas antioxidantes como FoxO1 (por sus siglas en inglés, forkhead box protein O) y Nrf2 (por sus siglas en inglés, factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2) estén relacionados con el HGNA (Tanaka y col., 2008).

La disfunción mitocondrial también podría desencadenar una respuesta apoptótica en las células del hígado, lo que explicaría la liberación de las enzimas ALT y AST al torrente sanguíneo (Bujanda y col., 2008)

La oxidación de AG produce un incremento de la demanda hacia la membrana mitocondrial, ya que el flujo de electrones como producto de esta oxidación aumenta. La peroxidación de lípidos, tales como sustancias reactivas de ácido tiobarbitúrico (TBARS, por sus siglas en inglés) y los niveles de hidroperóxidos, así como marcadores de la oxidación de proteínas, tales como la carbonilación de proteínas, son marcadores de daño oxidativo de ERO que inducen una depleción de factores protectores intracelulares como el glutatión, empeorando el daño a nivel del hepatocito (Noeman y col., 2011).

Dado que el EO influye en los cambios que llevan a hígado graso y cirrosis y, ya que existen sistemas antioxidantes (enzimáticos y no enzimáticos) que ejerce un efecto protector contra el estrés oxidativo, se podría inferir una asociación entre estas enzimas y el deterioro en la función hepática (García y col., 2013).

2.3.1. Sistemas antioxidantes

Los organismos aeróbicos son protegidos del estrés oxidativo inducido por EROs y RLs por una serie de sistemas de defensa. Dichos sistemas de defensa contra el exceso de producción de ERO/RLs han evolucionado en mecanismos enzimáticos y no enzimáticos, protegiendo así a los organismos contra daños oxidantes. Sin embargo, diferentes factores externos (como la dieta) y el envejecimiento disminuye la capacidad de tales sistemas, resultando en perturbaciones del equilibrio redox (Papas, 1998; Benitez, 2008).

El factor transcripcional de Nrf2 se ha identificado como el regulador maestro de la respuesta celular antioxidante, de detoxificación y de regulación del estado redox (Sykiotis y col., 2011). Durante condiciones quiescentes, Nrf2 se encuentra inhibido en el citoplasma por la proteína Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) y sufre una constante ubiquitinación y degradación proteosomal (Zhang y col., 2009). Cuando el estrés oxidativo y electrofílico es elevado, Nrf2 se libera de Keap1, se trasloca hacia el núcleo y se une a ciertas proteínas (p. ej. Maf), promoviendo así la expresión de enzimas antioxidantes y detoxificantes, por medio de la unión en el ADN a los elementos *cis* que se encuentra en la región promotora, denominados: ARE (por sus siglas en inglés, antioxidant responsive element) y EpRE (por sus siglas en inglés, electrophile response element), permitiendo la síntesis de proteínas como la glutatión S-transferasa A1 (Gsta1), la subunidad catalítica de la glutamato cisteína ligasa (Gclc), importante para la síntesis del glutatión (GSH), entre otras (Lee y col., 2005; Osburn y Kensler, 2008; Zhang y col., 2013).

Por lo anterior, el estudio de Nrf2 sobre la HGNA ha despertado el interés de varios grupos de trabajo en los últimos años. Se ha propuesto una participación de Nrf2 sobre la HGNA debido a que el silenciamiento de Nrf2 permite una evolución acelerada de la patología (Tanaka y col., 2008).

2.3.2. Mecanismos enzimáticos y no enzimáticos

Los sistemas enzimáticos incluyen la superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y las enzimas implicadas en el ciclo de glutatión: glutatión peroxidasa (GPX), glutatión reductasa (GR) y glutatión-S-transferasa (GST) (Figura 5), entre otras enzimas (Mathews y col., 2002; Nistala y col., 2008).



Figura 5. Mecanismos enzimáticos y no enzimáticos

Catalasa (CAT).

La CAT elimina el peróxido de hidrógeno originado por la SOD al catalizar la conversión de superóxido en H_2O_2 (Figura 5).

La CAT es una enzima que está presente a concentraciones elevadas en los peroxisomas, descomponiendo el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.

La CAT junto con la GPX conforman el principal sistema enzimático de remoción de moléculas de H_2O_2 ; a altas concentraciones del mismo, la CAT se vuelve primordial en su remoción (Venereo,2002).

Glutación peroxidasa (GPX).

La GPX, la principal peroxidasa en los mamíferos presente en cantidades significativas en el citoplasma, cataliza la conversión de H_2O_2 en H_2O a través de la oxidación de GSH dando como resultado glutación oxidado (GSSG) (Figura 6). A diferencia de la CAT, ésta actúa a bajas concentraciones de H_2O_2 . Además, la GPX cataliza la degradación de los peróxidos lipídicos (LPO) y puede biotransformar los hidroperóxidos lipídicos a AG hidroxilados menos reactivos, evitando así el daño ocasionado por la reacción en cadena en las membranas celulares y sus funciones (Al-Gubory y col., 2004).

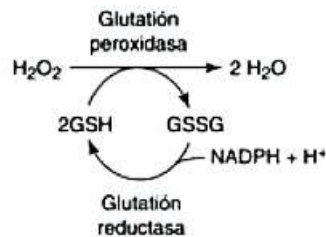


Figura 6. La glutación peroxidasa elimina el H_2O_2 , así como los peróxidos de lípidos (Devlin, 2004).

Glutación reductasa (GR):

La GR es un componente importante del mecanismo celular de defensa antioxidante. Esta enzima cataliza la reducción de la forma oxidada de glutación (GSSG) a GSH, empleando NADPH como cofactor. Por lo tanto, la GR es esencial para el ciclo del GSH, ya que mantiene los niveles adecuados de GSH (Figura 6). La capacidad de GPX para reducir H_2O_2 u otros peróxidos depende de la actividad de GR (Al-Gubory y col., 2004).

Glutación-S-transferasa (GST):

Las GST son una familia de isoenzimas citoplasmáticas que desempeñan un papel importante en la desintoxicación de metabolitos reactivos, catalizando la conjugación con GSH. Las GST están involucradas en el transporte intracelular de compuestos y su entrega a los sitios para la transformación posterior y/o la excreción (Al-Gubory y col., 2004).

2.3.3. Sistemas no enzimáticos

Glutación reducido (GSH):

El GSH es el antioxidante no enzimático más relevante, su función no es eliminar directamente las ERO, sino mantener el equilibrio redox y participar en las reacciones enzimáticas antioxidantes proporcionando los reductores equivalentes (Gaeda y col., 2005).

El GSH actúa a través de tres reacciones: 1) reacciones de conjugación, 2) oxidación, y 3) degradación, participando como cofactor de las enzimas GPx y GST (Figura 5), por lo que es responsable de la protección de los compuestos o grupos tioles celulares de la oxidación; por su relación con el ácido ascórbico y como reservorio operativo del óxido nítrico (NO•) en forma de S-nitrosoglutación, juega un importante rol en los mecanismos antioxidantes involucrados en la regulación de eventos celulares que incluyen expresión genética, síntesis de proteínas y ADN, proliferación celular y apoptosis, sistemas de traducción de señales y producción de citocinas (Gaeda y col., 2005).

El GSH, a diferencia de las vitaminas, puede sintetizarse intracelularmente a través de varios pasos enzimáticos; es un compuesto metabólicamente importante, por ello la concentración de GSH en los tejidos está muy regulada; por tanto, el agotamiento o el exceso de GSH en el cuerpo es una situación que no se presenta a menudo (Papas, 1998).

Por el contrario, el incremento de los niveles de GSH protege a los organismos frente a condiciones tóxicas, tales como la formación de peróxidos de ácidos grasos derivados de la oxidación lipídica, radiación ionizante, agentes alquilantes, u otros intermediarios reactivos (Devlin, 2004; Rios, 2006).

Varios estudios han relacionado a la HGNA con la peroxidación de lípidos, ROS y la disfunción mitocondrial (Haddad y col.,2011). El OX juega un papel importante en la patogénesis de la HGNA debido a que puede estar asociado con la infiltración de grasa en el hígado (Kojima y col., 2007).

2.4. Tratamiento para la HGNA

El tratamiento actualmente disponible más eficaz para HGNA es la intervención del estilo de vida para inducir la pérdida de peso, incluyendo modificación de la dieta y el aumento de la actividad física (Hash y col., 2013).

El tratamiento con atorvastatina (inhibidor de la reductasa de la HMG-CoA reductasa) disminuye el colesterol mitocondrial y aumenta de los niveles de glutatión, lo que sugiere una potencial implicación clínica para el tratamiento de la HGNA (Alkhouri y col., 2009).

2.5. Modelos animales de HGNA

Diversos modelos animales se han implementado para entender los mecanismos del desarrollo de esta patología, que incluyen desde modelos genéticamente modificados hasta modelos inducidos con dietas y la combinación de ambos modelos (Kanuri y Bergheim, 2013).

Ratones alimentados con una dieta alta en grasa, aumenta la presión arterial sistólica e induce la disfunción endotelial. Se han utilizado diferentes tipos de dietas ricas en grasa que oscila entre el 20% y 60% de energía, el tipo de grasa puede ser de tipo animal tales como, manteca o cerdo, sebo de buey o aceites vegetales como aceite de oliva o de coco (Panchal y Brown, 2011).

Por otro lado, la sacarosa se ha usado para simular el síndrome metabólico humano en modelos animales, ya que induce lipogénesis en ratas junto con un aumento de las concentraciones plasmáticas de insulina, la leptina, triglicéridos, ácidos grasos libres, además de causar esteatosis por lo tanto, la combinación de grasa y sacarosa induce esteatosis hepática y aumento de las enzimas hepáticas lipogénicas en ratas (Panchal y Brown, 2011). En el Cuadro 1 se muestra un resumen de algunos estudios previamente reportados.

Cuadro 1. Modelos animales dieta alta en grasa y colesterol (HFHC)

AUTOR	CEPA	DIETA
Moghadasian y col. (2001)	Ratas C57Bl/6J	60% grasas, 1.25% colesterol por 24 semanas
Lieber y col. (2004)	Ratas Sprague-Dawley	35% de energía de grasa, 47% de carbohidratos y 18% de proteína.
Ramesch y col. (2008)	Ratas Wistar	2.5% de colesterol, 10% de sacarosa y 10% aceite vegetal hidrogenado.
Kitamori y col. (2012)	SHRSP5/Dmcr	5% colesterol, 35.5% lípidos.
Sverdlov y col. (2006)	En ratones, ApoE2 knock-out	21% de grasa y 0,2% de colesterol en peso.
Ferre y col. (2005)	En ratones, ApoE knock-out	20% aceite de olivo, 0.1% colesterol.

Otros estudios demuestran que ratas Wistar alimentadas con una dieta aterogénica elaborada mediante la mezcla de cantidades iguales de un polvo de alimento comercial y componentes aterogénicos como son: 5% de colesterol, 20% de sacarosa, 20% aceite vegetal hidrogenado, 2% de colato de sodio, 20% lactosa, 0,4% de cloruro de colina y 0,15% tiouracilo, mezclado con una cantidad igual (w / w) de alimento de polvo comercial, mostraron niveles elevados en suero de TG, colesterol LDL, el colesterol VLDL, HDL colesterol; así mismo, los valores de riesgo cardíaco fueron significativamente ($P < 0,001$) mayor en las ratas alimentadas con la dieta aterogénica en comparación a los que se les dio una dieta normal (Ramesch y col., 2008).

HIPÓTESIS

El cambio de dieta es eficaz para normalizar los marcadores bioquímicos, histopatológicos y de estrés oxidativo en ratas Sprague-Dawley alimentadas con una dieta alta en grasa y colesterol.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el efecto de una dieta alta en grasa y colesterol sobre marcadores hepáticos de estrés oxidativo en ratas Sprague-Dawley, así como el cambio de dieta en la normalización de estas alteraciones (histopatológicas y de estrés oxidativo).

Objetivos particulares

Evaluar el efecto del cambio de dieta en:

1. Los parámetros bioquímicos TG, COL, HDL y LDL y de daño hepático enzimas AST y ALT en suero
2. El tipo y grado de alteración histopatológica en hígado.
3. Concentración de colesterol y triglicéridos en hígado.
4. Los niveles de marcadores enzimáticos (CAT, GPx y GST) y no enzimáticos (MDA/TBARS y GSH) de estrés oxidativo en hígado

IV. METODOLOGÍA

5.1 Animales

Se emplearon ratas macho Sprague-Dawley de un peso promedio de 180 ± 10 g, las cuales fueron adquiridas de laboratorios Harlan México S.A. de C.V.

5.1.1 Materiales y reactivos

Los reactivos para las determinaciones enzimáticas fueron los siguientes:

Ácido 5,5'-ditiobis dinitro benzoico (DTNB), 1-cloro,-2,4-dinitrobenceno (CDNB), L-glutación reducido (GSH) 99%, glutación reductasa (GR), hidroxicumeno, nicotín-adenín-difosfato reducido (NADPH), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), cloruro de potasio, sacarosa ultra pura y Tritón X-100 fueron de la marca Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Metanol, ácido tricloro-acético (TCA), ácido tiobarbitúrico (TBA), cloruro de magnesio ($MgCl_2$), cloruro de potasio (KCl), ácido etilén diamino tetra acético (EDTA), etanol 100%, fosfato de sodio monobásico (NaH_2PO_4), fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4), Tris hidrocloreuro ultrapuro (TRIS-HCl) y TRIS base ultrapuro fueron de la marca J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, EUA).

Para la determinación de glucosa se utilizaron tiras reactivas AccuChek® de la marca comercial ROCHE®.

El kit enzimático para determinar el perfil de lípidos fue de la marca RANDOX® (Antrim, Reino Unido).

El kit para la cuantificación de proteína por el método del ácido bicinconínico (BCA) fue de la marca Pierce, Inc. (Rockford, IL, EUA).

5.2. Modelo animal con dieta alta en grasa y colesterol

Los componentes de la dieta HFHC y dieta estándar se muestran en el Cuadro 2.

Se evaluaron semanalmente el nivel de consumo de alimento y el peso corporal de los animales a lo largo del estudio (Ramesh y col., 2008). La dieta estándar (comercial) fue de la marca Harlan México S.A. de C.V. La composición en kcal de la dieta se calculó conforme a lo descrito en la tabla nutrimental de cada ingrediente en el envase.

Cuadro 2. Composición de la dieta HFHC y dieta comercial

Composición HFHC*	Cantidad
Colesterol	2.5 %
Sacarosa	10 %
Manteca vegetal hidrogenada	10 %
Colato de sodio	1 %
Lactosa	10 %
Cloruro de colina	0.2 %
Tiouracilo	0.15 %
Alimento comercial	66.1 %
Proteína	12.5 %
Grasa	37.5 %
Carbohidratos	50 %
Total de (kcal/g)	4 kcal/g
Composición dieta-comercial	Cantidad
Proteína	24 %
Grasa	18 %
Carbohidratos	58 %
Total de (kcal/g)	3.1

* Tomado de Ramesh y col., 2008

5.3 Tratamiento

Se empleó un total de 35 ratas, las cuales se aclimataron durante una semana en condiciones de 12 horas de luz, 12 horas de oscuridad con temperatura y humedad controladas, con agua y alimento estándar *ad libitum*. Después de una semana de aclimatación, los animales se dividieron aleatoriamente en 4 grupos en jaulas individuales de acero inoxidable y se les proporcionó la dieta de acuerdo al esquema presentado en la Figura 7.

Normal 4 s: grupo normal, las ratas recibieron alimento estándar durante 4 semanas.

Normal 8 s: grupo normal, las ratas recibieron alimento estándar durante 8 semanas.

Modelo: grupo modelo, las ratas se alimentaron con dieta HFHC durante 4 semanas.

DC: dieta control, las ratas recibieron la dieta HFHC durante 4 semanas y posteriormente se alimentaron con dieta estándar durante 4 semanas.

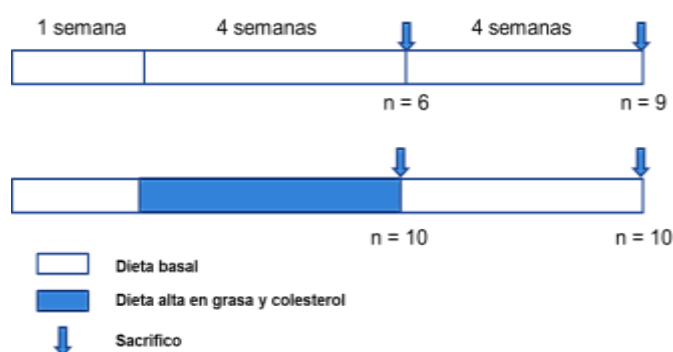


Figura 7. Diseño experimental empleado en el presente proyecto.

5.4 Sacrificio de animales y obtención de órganos

Esta dieta se les proporcionó a los animales durante 30 días; una vez transcurrido este tiempo, las ratas del grupo normal 4s y del grupo modelo se sacrificaron para determinar los cambios en el modelo de animales sin tratamiento.

Se utilizó una cámara de sacrificio con éter etílico para la asfixia de los animales y posterior incisión vertical desde el abdomen hasta el tórax, para la obtención de sangre por punción cardiaca; se llevó a cabo el corte de la vena porta para asegurar la muerte clínica. Posteriormente, se extrajo el hígado y la aorta, y se lavaron con solución fisiológica estéril fría.

Las muestras obtenidas se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C para su análisis posterior.

5.5 Preparación de hígados para el análisis histopatológico

Tinción con hematoxilina-eosina (HE): Se removió parte del tejido hepático, se lavó con solución fisiológica estéril y se fijó con formaldehído amortiguado al 4% amortiguado para una posterior inmersión en parafina, microdissección y tinción con hematoxilina y eosina (H&E).

5.6 Procedimientos

5.6.1 Obtención de sangre

Una vez anestesiado el animal, se realizó una punción cardiaca para la extracción de 10 mL de sangre en un tubo BD vacutainer® serum. Posteriormente, la muestra se centrifugó 10 minutos a 10,000 rpm para la obtención del suero, el cual se colocó en varias alícuotas de 500 µL cada una y se congelaron a -20° hasta el día de las determinaciones bioquímicas.

5.6.2 Determinación del perfil lipídico en plasma

Se determinó el perfil lipídico (triglicéridos, colesterol, HDL,) mediante kits enzimáticos Randox Laboratories Ltd. (Crumlin, Reino Unido).

5.6.3 Cuantificación del contenido lipídico en hígado

Para la cuantificación de triglicéridos de tejido hepático se utilizó el método descrito por Seo y colaboradores (2010). Brevemente, muestras de tejido hepático se lisaron con hidróxido de potasio etanólico (dos partes de etanol: primera parte KOH 30%), y se incubaron durante toda la noche a 55 °C. A los lisados se les adicionó un volumen de una solución de agua:etanol (1:1) y se centrifugaron por 5 minutos a 7,500 rpm. El sobrenadante se mezcló con un $MgCl_2$ 1 M, posteriormente se incubó en hielo por 10 minutos y se centrifugó por 5 minutos a 7,500 rpm.

5.6.4 Análisis histopatológico

Finalmente, los tejidos se observaron al microscopio y se evaluó el grado de esteatosis de acuerdo a la clasificación de Egawa y col. (2003), la cual se describe a continuación: grado 0 (Ninguna vacuola de grasa); grado I (Pocas vacuolas, grasa dispersa); grado II (Vacuolas de grasa dispersas en zona 3); grado III (Vacuolas de grasa en zonas 2 y 3); y grado IV (Numerosas vacuolas de grasa en zonas 2 y 3) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Clasificación histológica de los grados de esteatosis

Grado:	Observación:
Grado 0	Ninguna vacuola de grasa
Grado I	Pocas vacuolas, grasa dispersa
Grado II	Vacuolas de grasa dispersas en zona 3
Grado III	Vacuolas de grasa en zonas 2 y 3
Grado IV	Numerosas vacuolas de grasa en zonas 2 y 3

El análisis histopatológico estuvo a cargo del Dr. Marco Alonso Gallegos Corona, profesor investigador encargado del laboratorio de Histopatología de la Facultad de Medicina, UAQ.

5.6.5 Determinación cuantitativa de alanina aminotransferasa (ALT)

La determinación de ALT se realizó por el método colorimétrico de la marca Spinreact ALT (Oyewo y col., 2012).

Para esta determinación, las soluciones se adicionaron en el siguiente orden: se colocaron en una celda de cuarzo 1 mL de la mezcla de los reactivos R1 y R2 y 100 μ L de la muestra, y se incubó 1 minuto a una de temperatura de 30° C. Pasado el minuto, las muestras se leyeron inmediatamente a 340 nm en un espectrofotómetro. Se calculó el promedio del incremento de absorbancia por minuto ($\Delta A/\text{min}$). El cálculo de la concentración de ALT se realizó con la siguiente fórmula:

$$\Delta A/\text{min} \times 1750 = \text{U/L de ALT}$$

Unidades: La unidad internacional (UI) es la cantidad de enzima que convierte 1 μ mol de substrato por minuto, en condiciones estándar. La concentración se expresa en unidades por litro (U/L).

5.6.6. Determinación cuantitativa de aspartato aminotransferasa (AST)

La determinación de AST se realizó por el método colorimétrico (Mosby, 1984). Para esta determinación, las soluciones se adicionaron en el siguiente orden: se colocaron en una celda de cuarzo 1 mL de la mezcla de los reactivos R1 y R2 y 100 μ L de la muestra, y se incubó 1 minuto a una de temperatura de 30 °C. Pasado el minuto, las muestras se leyeron inmediatamente a 340 nm en un espectrofotómetro.

Para el cálculo de la concentración de AST se realizó con la siguiente fórmula:

$$\Delta A/\text{min} \times 1750 = \text{U/L de AST}$$

Unidades: La unidad internacional (UI) es la cantidad de enzima que convierte 1 μmol de sustrato por minuto, en condiciones estándar. La concentración se expresa en unidades por litro (U/L).

5.6.7 Preparación de homogenados citosólicos

Para las determinaciones de GSH y GST en los homogenados citosólicos de hígado, se pesaron 0.3 g de órgano en un tubo cónico, se añadió 4 mL de solución amortiguadora Tris/Sacarosa (Anexo 1) y se homogenizaron con la ayuda de un Polytron (Kinematica, Suiza).

Los homogenados se centrifugaron a 8000 g durante 20 minutos a 4 °C en una centrífuga Universal 32 R (Andreas Hettich GMBH & Co. KG, Alemania). Se recuperó el sobrenadante mediante una pipeta Pasteur y se transfirió a la celda de la ultracentrífuga Beckman Optima L90K (Beckman, EUA). Los tubos se sometieron a ultracentrifugación a 4 °C con una velocidad 100,000 g durante 1 hora. El sobrenadante o citosol se transfirió a tubos Eppendorf y se almacenó a -70 °C hasta su análisis. Durante todo el procedimiento los tubos y las soluciones se mantuvieron a 4 °C en hielo.

Para la determinación de las actividades de GPX y CAT en los homogenados citosólicos de hígado, se pesaron 0.3 g de órgano en un tubo cónico, se añadieron 3 mL de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM (Anexo 1), que contenía EDTA 0.5 mM, Tritón 0.5% y etanol 0.01 mL/mL, posteriormente se homogenizaron con la ayuda de un Polytron. Los homogenados se centrifugaron a 8,000 g durante 15 minutos a 4 °C en una centrífuga Universal 32 R (Hettich). El sobrenadante se colocó en tubos Eppendorf y se almacenó a -80 °C hasta su análisis. Todo el tiempo los tubos y las soluciones se mantuvieron a 4 °C.

5.6.8 Determinaciones enzimáticas y no enzimáticas

5.6.8.1 Determinación de la concentración de malondialdehído (MDA).

Este método se basa en el empleo del MDA como un marcador de daño oxidativo de lípidos mediante la determinación de su concentración, la cual varía dependiendo del tipo de estrés al que se sometan las células. Este marcador es cuantificado mediante el ensayo de sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Qui y col., 2010).

Se pesaron 100 mg de tejido, se añadió 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.4 (Anexo 16) con KCl al 1.17% (Anexo 1) y se homogenizaron con la ayuda de un Polytron. Los homogenados se centrifugaron a 8,000 g durante 5 minutos a 4 °C en una centrífuga Universal 32 R. Se separó la fracción nuclear que se encuentra en el pellet, se tomó el sobrenadante y se centrifugó a 10,500 g durante 20 minutos a 4 °C en una centrífuga Universal 32 R. Se recuperó el sobrenadante mediante una pipeta Pasteur y se transfirieron 850 µL a un tubo Eppendorf; se agregaron 150 µL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.4, 1 mL de TBA al 0.67% (Anexo 18) y 1 mL de TCA al 10% (Anexo 1), se agitó el tubo y se puso a ebullición durante 20 minutos. Se colocaron los tubos en hielo y se agregaron 2.5 mL de butanol y se centrifugaron a 4,500 rpm durante 10 minutos a 4 °C en una centrífuga Universal 32 R. Se recuperó el sobrenadante mediante una pipeta Pasteur y las muestras se leyeron por espectrofotometría a una longitud de onda de 532 nm a 25 °C en el espectrofotómetro UV-Vis modelo Lambda 40 (Perkin Elmer). Todo el tiempo los tubos y las soluciones se mantuvieron a 4 °C.

La concentración de MDA se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{nmol}}{\text{mg de tejido}} = \frac{(\text{Abs}) (1 \times 10^9) (0.0025)}{(1.56 \times 10^5) (0.5) (\text{mg de tejido})}$$

Donde:

Abs: absorbancia de la muestra a 532 nm.

0.0025: Volumen final del butanol (L)

1.56×10^5 : es el coeficiente de extinción molar ($M^{-1} \text{cm}^{-1}$).

0.5: tamaño de la celda del espectro.

mg de tejido: mg de tejido usados para la preparación de la muestra.

5.6.8.2 Cuantificación de proteínas en los homogenados citosólicos

La cuantificación de proteínas de los homogenados citosólicos se realizó por el método del ácido bicinconínico (BCA), empleando albúmina bovina como estándar.

Se realizaron diluciones apropiadas de los citosoles con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 6.5 (Anexo 1). Posteriormente, se colocaron 50 μL del citosol diluido en placas de 96 pozos (tres pozos por muestra). Se agregaron 250 μL de la solución de trabajo para la determinación de proteína (Anexo 1) en cada pozo.

La placa se incubó una hora a temperatura ambiente o 30 min a 37 °C. Finalmente, las muestras fueron leídas en un lector de microplacas modelo Versa Max Tunable Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) a una longitud de onda de 562 nm. Los resultados se analizarán con el software Pro Ver.4.7.1.

5.6.8.3 Determinación de la concentración de glutatión reducido (GSH).

La concentración de GSH se determinó por el método de Ellman (1959), basado en la habilidad del grupo SH para reducir ácido 5,5'-ditiobis dinitro benzoico (DTNB) a ácido 5-tiio-2-nitrobenzoico (TNB). Los niveles de GSH en las muestras se calcularon extrapolando la absorbancia de las muestras en la curva de calibración que se realizó previamente.

Para la realización de la curva estándar de GSH, las soluciones se adicionaron en el siguiente orden: Solución amortiguadora TRIS 0.2 M, EDTA 0.02 M pH 8.2, TRIS-EDTA (Anexo 1), solución de trabajo inicial para la curva estándar de GSH (Anexo 1), metanol y solución de DTNB 2.46 mM (Anexo 1). La reacción se inició con la adición de este último reactivo y se incubó por 5 minutos. Las muestras se leyeron inmediatamente por espectrofotometría a una longitud de onda de 412 nm a 25 °C en el lector de microplacas modelo Versa Max Tunable Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

Para las muestras se utilizaron citosoles concentrados, a los cuales se les precipitó previamente la proteína con el siguiente procedimiento: En un tubo Eppendorf se adicionaron 120 µL de agua destilada, 150 µL de citosol concentrado y 30 µL de TCA al 20% (Anexo 1), a continuación se dejó reposar por 30 minutos a 4 °C y luego se centrifugó a 8,000 g por 5 minutos a 4 °C.

Se recuperó el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo Eppendorf. De este nuevo tubo se tomaron 50 µL para colocarse en placas de 96 pozos (tres pozos por muestra). Se agregaron además 150 µL de solución amortiguadora TRIS-EDTA, 80 µL de metanol y 20 µL de DTNB.

Las muestras se incubaron 5 minutos y se leyeron inmediatamente bajo las mismas condiciones utilizadas en la curva estándar. Los resultados se expresan en µM/mg de proteína considerando el factor de dilución.

5.6.8.4 Determinación de la actividad de glutatión-S-transferasa (GST)

Este método se basa en la reacción catalizada por esta enzima entre GSH y el sustrato CDNB (1-cloro,-2,4-dinitrobenceno), el cual tiene un amplio intervalo para detectar las diferentes isoenzimas. Una unidad de GST se define como la cantidad de enzima que produce 1 nmol de CDNB-GSH conjugado por minuto (Habig y col., 1974).

De las diluciones de los homogenados citosólicos empleadas para la cuantificación de proteínas, se colocaron 50 μL en placas de 96 pozos (tres pozos por muestra). Se agregaron 100 μL de la solución de trabajo de GSH 3 mM (Anexo 9) y en seguida se adicionaron 150 μL de la solución de trabajo CDNB de 2 mM (Anexo 1) en cada pozo, evitando la formación de burbujas.

La formación del conjugado CDNB-GSH por la enzima de GST se monitoreó inmediatamente por espectrofotometría a una longitud de onda de 340 nm a 25 °C en un período de 2 minutos de reacción en el lector de microplacas modelo Versa Max Tunable Microplate Reader, obteniéndose lecturas cada 20 segundos.

Los resultados se analizaron con el software Pro Ver.4.7.1. La actividad de GST se expresa en nmol de producto formado por mg de proteína por minuto, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{nmol}}{(\text{mg}) (\text{min})} = \frac{\Delta (\text{abs min 2} - \text{abs min 1})}{(\text{mg de proteína}) (0.0096)}$$

Donde:

abs min 2: es la absorbancia de la muestra a 340 nm en el min 2 de reacción.

abs min 1: es la absorbancia a 340 nm en el min 1 de reacción.

mg proteína: mg de proteína de la muestra considerando el factor de dilución.

0.0096: es el coeficiente de extinción de CDNB ($\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

5.6.8.5 Determinación de la actividad de glutatión peroxidasa (GPX)

La actividad de GPX se determinó por el método de Plagia y Valentine (1976), el cual se basa en la oxidación de GSH a glutatión oxidado (GSSG) catalizado por GPX, completando el ciclo convirtiendo GSSG a GSH utilizando glutatión reductasa y NADPH.

Para esta determinación, las soluciones se adicionaron en el siguiente orden: se colocaron en placas de 96 pozos (tres pozos por muestra) 100 μL de solución amortiguadora de reacción (Anexo 1), 50 μL cocktail de GSH/GR (42 mM GSH, 10 unidades/mL de GR) (Anexo 1), 50 μL muestra y 50 μL NADPH (Anexo 1). Justo antes de realizar la lectura, se adicionaron 50 μL de hidroperóxido de cumeno 1 mM (Anexo 1) y se mezclaron bien. Las muestras se leyeron inmediatamente por espectrofotometría a una longitud de onda de 340 nm a 25 °C, con una frecuencia de mediciones cada 9 segundos por un tiempo de corrida de 2 minutos en el lector de microplacas modelo Versa Max Tunable Microplate Reader.

Nota: No deben transcurrir más de 10 segundos entre la adición de hidroperóxido de cumeno y la lectura de la muestra en el espectrofotómetro.

La actividad de GPX (unidades/mL) se calculó usando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{nmol}}{(\text{mg}) (\text{min})} = \frac{[(\text{Pendiente de la muestra}) - (\text{Pendiente del blanco de reacción})]}{(0.02018) (\text{mg de proteína})}$$

Donde:

0.02018: es el coeficiente de absortividad molar del NADPH ($\text{nM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

mg proteína: mg de proteína de la muestra considerando el factor de dilución.

5.6.8.6 Determinación de la actividad de catalasa (CAT).

La actividad de CAT se midió por el método de Aebi (1984). Se realizaron diluciones apropiadas de los citosoles con solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7 (Anexo 1). Se ajustó la concentración de peróxido de hidrógeno 30 mM (Anexo 1) realizando una lectura de la absorbancia a 240 nm en el espectrofotómetro UV-Vis modelo Lambda 40 (Perkin Elmer) y se calculó la concentración con la siguiente fórmula:

$$[\text{H}_2\text{O}_2] \text{ mM} = A_{240} / 0.0436$$

Donde:

A_{240} : es la absorbancia del peróxido H_2O_2 30 mM a 240 nm.

0.0436: es el coeficiente de extinción del H_2O_2 ($\mu M^{-1}cm^{-1}$).

Para esta determinación, las soluciones se adicionaron en el siguiente orden: se colocaron en una celda de cuarzo 1700 μL de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7 (Anexo 1), 300 μL del citosol diluido y 1000 μL de H_2O_2 30 mM (Anexo 1). Las muestras se leyeron inmediatamente en el espectrofotómetro UV-Vis modelo Lambda 40 (Perkin Elmer), ya que la reacción comienza al agregarse el H_2O_2 , monitoreándose el decremento en la absorbancia con una frecuencia de mediciones cada 5 segundos por un tiempo de corrida de 30 segundos basados en la velocidad de descomposición del H_2O_2 a 240 nm a 25 °C.

Nota: Los citosoles se analizaron dentro de 5 a 10 min después de su dilución.

La actividad de CAT se calculó usando la siguiente fórmula:

$$[\text{Actividad enzimática}] = \frac{(\Delta \text{abs/min}) (\text{Volumen total}) (\text{Factor de dilución})}{(\text{volumen muestra}) (\text{min}) (0.0436)}$$

Donde:

Volumen total (mL): 3 mL

Volumen muestra (mL): 0.30 mL.

min: 0.5 min

0.0436: es el coeficiente de extinción del H_2O_2 ($\mu M^{-1}cm^{-1}$).

Los resultados se expresaron en U/mg de proteína.

V. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados del efecto del cambio de dieta en el peso se reportaron como la media \pm DE o el error estándar (EE) de la media. La evaluación estadística de los datos se determinó mediante el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%, seguida de la comparación de medias por la prueba de Tukey. Se empleó la prueba de χ^2 para determinar diferencias en el grado de esteatosis y colesterosis. Los análisis se realizaron en el programa estadístico Sigma Stat versión 11.0.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el objetivo de evaluar el efecto de una dieta alta en grasa y colesterol (HFHC) sobre marcadores hepáticos de estrés oxidativo en ratas Sprague-Dawley, así como el cambio de dieta en la normalización de estos parámetros, se siguió la metodología propuesta por Ramesh y colaboradores (2008), empleando ratas macho Sprague-Dawley alimentadas con una dieta HFHC. Con esta dieta además se pretendió determinar el grado de daño hepático y las características fisiológicas y/o bioquímicas del modelo empleado.

7.1 Efecto del cambio de dieta en el peso corporal

En la Figura 8 muestra la curva de crecimiento de los grupos bajo estudio y como se puede observar los animales alimentados por 4 y 8 semanas con una dieta estándar tuvieron un comportamiento normal de crecimiento durante todo el periodo de experimentación (de acuerdo a la tasa de crecimiento publicada por Harlan). El cambio en el peso corporal de animales alimentados con una dieta HFHC fue moderado hasta la 3 y 4 semana, mostrando en estas semanas una ligera disminución de peso (10%) comparado con el peso corporal del grupo control.

Esto resultados concuerdan con lo señalado por Kitamori y colaboradores (2011), quienes también observaron que los animales alimentados con una dieta alta en grasa y colesterol (300 a 700 mg/dl de colesterol) presentaron una disminución de peso, comparado con el grupo control. Por su parte, Garlipp y colaboradores (2011) observaron una disminución del consumo de alimento en los animales que recibieron dieta HFHC, mismo comportamiento obtenido en este trabajo y puede ser una razón que explica la pérdida de peso.

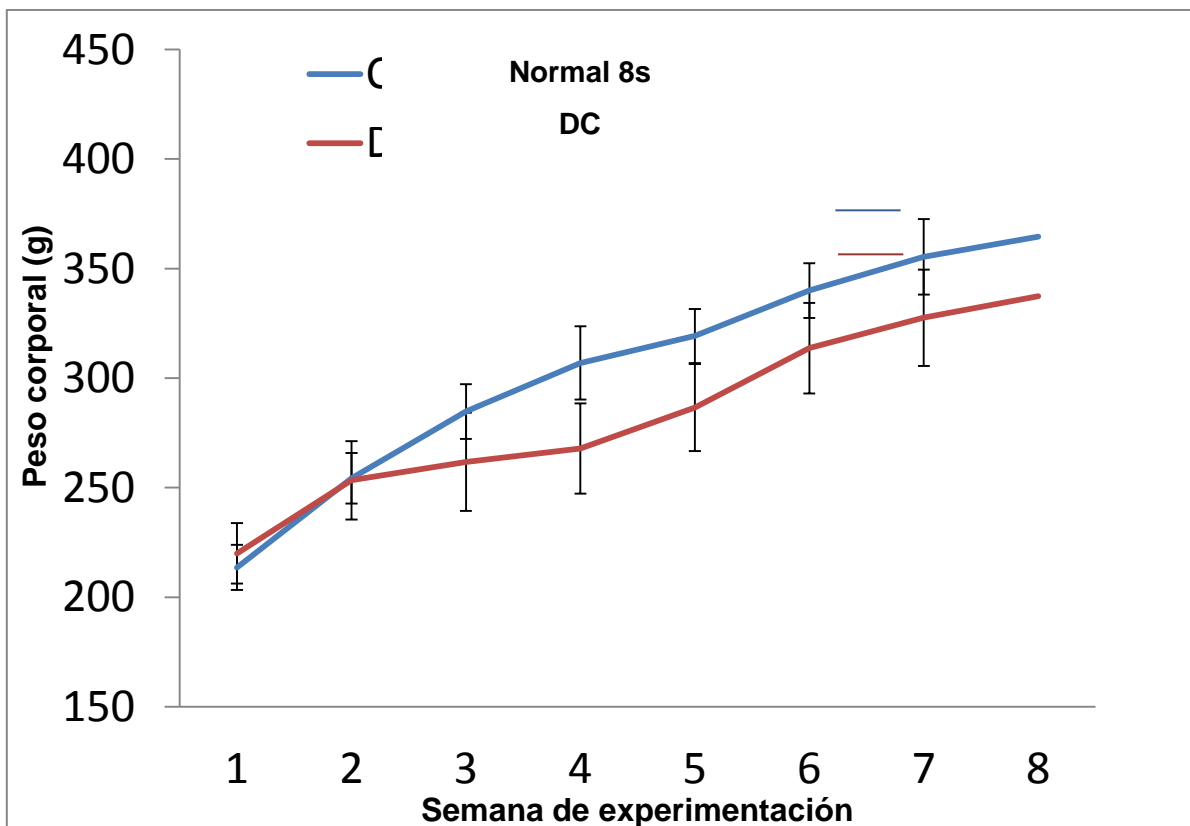


Figura 8. Efecto de la dieta en el peso corporal de las ratas durante el periodo de experimentación. Los valores representan medias \pm DE para el número de semanas por grupo. La diferencia significativa se evaluó mediante una prueba T student $p < 0,05$. *Representa la diferencia significativa entre el grupo control y el grupo tratado con la dieta a las 4 y 8 semanas.

Hay pocos estudios donde se demuestra modelos de esteatosis con obesidad; sin embargo, sigue siendo controversia sobre la pérdida de peso en respuesta a la dieta HFHC, posiblemente como resultado de las variaciones en el tipo de lípidos ingeridos, el tipo de cepa o modelo animal, así como en las semanas de experimentación (Shirayev y col., 2009).

7.2 Efecto del cambio de dieta sobre los parámetros bioquímicos en suero

Los factores dietéticos y estilo de vida pueden contribuir a la acumulación de grasa en el hígado a través de múltiples vías, tal es el caso de alteraciones en los parámetros metabólicos ocasionados por el consumo no moderado de nutrientes como una dieta alta en grasas. El Cuadro 4 muestra los resultados de la determinación en suero de TG, COL, LDL y HDL de los 4 grupos experimentales, observándose que los animales alimentados con la dieta HFHC presentaron una diferencia significativa con respecto a los grupos restantes, teniendo la mayor concentración de los parámetros bioquímicos. En los animales del grupo DC se observa que, con el cambio de dieta, las concentraciones de los parámetros bioquímicos se normalizaron con respecto al grupo control. Los parámetros bioquímicos de los animales del grupo modelo superan los parámetros normales reportados en la literatura para las ratas Sprague-Dawley; por lo tanto, animales con niveles de TG > 99.9 (mg/dL) y COL >96.9 (mg/dL) se consideraron con hiperlipidemia (Goñi y col., 2011).

Estos resultados concuerda con estudios anteriores en los que se demuestra que una dieta alta en lípidos eleva las concentraciones de TG y COL en suero, por lo tanto los niveles de HDL y LDL se ven afectados, siendo estos considerados como los factores de riesgo más reproducibles para HGNA (Shelvy Sullivan, 2010).

Cuadro 4. Parámetros bioquímicos en suero

GRUPOS	TG mg/dl	COL mg/dl	HDL mg/dl	LDL mg/dl
NORMAL 4S	59.22 ± 4.86 ^a	130.17 ± 4.33 ^a	40.18 ± 1.19 ^a	10.83 ± 2.33 ^a
MODELO	201.75 ± 5.28 ^b	436.47 ± 48.06 ^b	82.30 ± 0.18 ^b	331.40 ± 3.8 ^b
NORMAL 8S	86.33 ± 0.38 ^a	85.17 ± 9.17 ^a	48.21 ± 0.71 ^a	16.17 ± 0.20 ^a
DC	78.12 ± 2.16 ^a	97.17 ± 8.76 ^a	50.50 ± 0.44 ^a	15.87 ± 4.9 ^a

Triglicéridos (TG), colesterol (COL), lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteína de baja densidad (LDL). Los resultados se reportan como la media ± EE. La evaluación estadística de los datos se determinó mediante el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel del confianza del 95%, seguida de la comparación de medias por la prueba de Tukey.

Algunos estudios emplean dietas altas en grasas y colesterol y muestran un aumento en las concentraciones de los parámetros bioquímicos en suero. Penyakit y colaboradores (2007) observaron que ratas Sprague-Dawley tratadas con una dieta alta en grasa (20% manteca) y colesterol (4.5%) incrementaron sus niveles de TG (> 300 mg/dl), COL (> 200 mg/dl) y LDL, y disminución en HDL, después de 3, 6, y 12 semanas de experimentación. Así mismo, hay poca evidencia que demuestre el efecto del cambio de dieta sobre los parámetros bioquímicos. Sin embargo, nuestro estudio fue consistente con el de Ji y colaboradores (2011), en el que ratas Sprague-Dawley alimentadas con una dieta alta en grasa por 12 semanas y después con una dieta normal por 8 semanas, muestran una disminución significativa en las concentraciones de COL(50%), TG(20%), HDL(1%) y LDL(60%) en suero. Otro estudio demostró que una ingesta alta de colesterol en la dieta (4.5%) incrementan las concentraciones de COL y TG en suero (Ilmu y col., 2007).

7.3 Efecto del cambio de dieta sobre las enzimas de daño hepático AST y ALT

La AST es una enzima intracelular, se encuentra en niveles altos en el músculo del corazón, las células del hígado, las células del músculo esquelético y en menores cantidades en otros tejidos. Aunque un nivel elevado de AST en suero no es específico de enfermedad hepática, éste se emplea principalmente para su diagnóstico y seguimiento, junto con otras enzimas como la ALT, la cual también es una enzima intracelular y cuyos niveles elevados también se observan en enfermedades hepáticas (Yang y col. ;2014).

En el Cuadro 5 se presentan los resultados de los niveles enzimáticos de AST y ALT para los 4 grupos, donde podemos observar que los animales del grupo modelo tienen niveles elevados de ambas enzimas comparado con el grupo control. Sin embargo, el cambio de dieta en el grupo con DC no tuvo un efecto significativo en la disminución de los niveles de estas enzimas, debido posiblemente a la presencia de daño hepático en este grupo.

Lo anterior se pudo corroborar con los resultados histopatológicos que se describen en la sección siguiente. La disfunción mitocondrial producida por una ingesta alta de lípidos también podría desencadenar una respuesta apoptótica en las células del hígado, lo que explicaría la liberación de las enzimas ALT y AST al torrente sanguíneo (Noeman y col., 2011).

Cuadro 5. Enzimas AST y ALT en suero

GRUPO	AST (U/L)	ALT (U/L)
Normal 4 s	114.0	57.0
Modelo	136.0	125.0
Normal 8 s	123.8	71.5
CD	169.3	89.0

Niveles elevados de AST pueden presentarse en enfermedades avanzadas a la esteatosis simple (Pan y col., 2014). De acuerdo con Pashos y Paletas (2009), los niveles de ALT son más altos que los niveles de AST en la mayoría de los casos, pero el nivel de AST puede ocasionalmente ser más alto que el nivel de ALT, especialmente en la presencia de cirrosis.

7.4 Efecto del cambio de dieta sobre el análisis histopatológico

Los factores dietéticos y estilo de vida pueden contribuir a la acumulación de grasa en el hígado. En el cuadro 6 se muestra el número de ratas por grupo que presentaron daño hepático por esteatosis y colesterosis. Las ratas alimentadas con dieta HFHC presentaron/desarrollaron esteatosis grado II y III, y colesterosis grado II. Por otro lado, en el grupo con DC se observó una disminución en el grado del daño con el cambio de dieta, pero no fue totalmente reversible.

De manera similar, Ji y colaboradores (2011) observaron que el área de esteatosis hepática disminuyó con el cambio de una dieta alta en grasa por 12 semanas a dieta normal por 8 semanas, comparado con el grupo modelo alimentado con dieta alta en grasa por 20 semanas.

El daño hepático producido en las ratas puede explicarse por la presencia de lípidos en exceso que se acumularon bajo condiciones de sobrealimentación durante la dieta HFHC, ya que esto va a determinar los altos niveles intracelulares de AG saturados que pueden inducir la disfunción celular y/o muerte celular, un fenómeno conocido como lipotoxicidad (Videla, 2009). Con lo anterior, estudios previos han sugerido que este es el mecanismo involucrado en la esteatosis y ocurre cuando la cantidad de AG suministrada al hígado desde el intestino o tejido adiposo excede la cantidad necesaria para la oxidación mitocondrial, la síntesis de fosfolípidos y la síntesis de ésteres de colesterol (Reid, 2001).

Cuadro 6. Daño hepático. Grados de esteatosis y colesterosis

	Esteatosis				Colesterosis				n
	0	I	II	III	0	I	II	III	
NORMAL 4 S	4				4				4
MODELO			1	3	3		1		4
NORMAL 8 S	6				6				6
DC			3	3	1	4	1		6

X²; p<0.05

Los resultados anteriores se pueden corroborar con la histoarquitectura del tejido hepático de los animales de experimentación (Figura 9), donde podemos observar el grado de esteatosis y colesterosis que presentaron las ratas con inflamación y daño hepatocelular, lo que podría explicar a su vez los niveles elevados de las enzimas AST y ALT en suero (Bujanday col.,2008). El mayor daño se encuentra en el grupo modelo (Figura 9b) y en el grupo DC (Figura 9d), lo que sugiere que el daño al hígado permanece y no es totalmente reversible tras el cambio de dieta.

La colesterosis se relaciona con el metabolismo del colesterol y se caracteriza por la presencia de un exceso de gotas lipídicas en el citoplasma, las cuales se componen principalmente de ésteres de colesterol derivados del colesterol libre (Wang y col., 2014). La acumulación difusa de estas gotas lipídicas le da un aspecto de fino reticulado amarillo dorado, tal y como se observa en la Figura 9d. El desarrollo de colesterosis es característico de las vías biliares, principalmente la vesícula. Por lo tanto, la presencia de colesterosis en hígado es un hallazgo importante en este modelo animal, por lo que se requieren realizar más estudios al respecto.

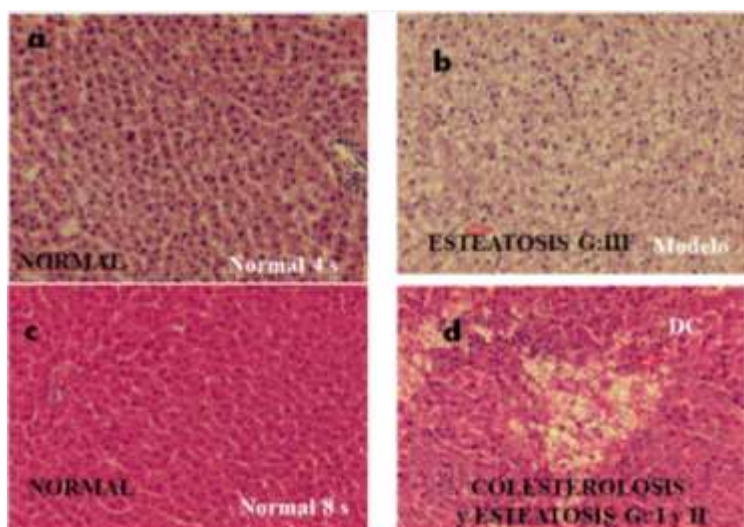


Figura 9. Histoarquitectura de tejido hepático de los animales de experimentación. a) Hígado de ratas alimentadas con dieta normal por 4 semanas, b) alimentadas con dieta HFHC por 4 semanas, c) alimentadas con dieta normal por 8 semanas y d) alimentadas con dieta HFHC por 8 semanas. H&e (x100)

Estudios previos en ratas y en humanos han sugerido que el ejercicio moderado junto con cambios en la dieta es más eficaz en la mejora de anomalías en el hígado que la dieta sola, y puede mejorar la HGNA independientemente de la pérdida de peso (Ueno y col., 1997; Hickman y col., 2004; Suzuki y col., 2005; Tamura y col., 2005; Ji y col., 2011; Eckard y col., 2013).

7.5. Efecto del cambio de dieta en las concentraciones de colesterol y triglicéridos en tejido hepático

Una ingesta elevada de carbohidratos y grasas saturadas pueden tener un mayor potencial para aumentar el contenido de lípidos del hígado, además de aumentar también la producción hepática de colesterol y triglicéridos (Fletcher y col., 2005).

De acuerdo a los resultados anteriores, se observa que la normalización de los parámetros bioquímicos en suero no se asocia a la mejora o reversibilidad del daño hepático; por lo tanto, la determinación de la concentración de TG y COL en tejido hepático puede explicar el mecanismo involucrado en este modelo.

El Cuadro 7 muestra que el grupo modelo tuvo un aumento significativo en la concentración de TG y COL en hígado; sin embargo, estos parámetros disminuyeron en el grupo de la dieta control (DC) después del cambio de dieta, pero no a las concentraciones del grupo normal de 8 semanas. Estos resultados se confirman con estudios previos realizados por Ji y colaboradores (2011), quienes observaron una disminución de las concentraciones de TG totales (TGT) y COL total (CT) de 35% y 30%, respectivamente, en tejido hepático de ratas alimentadas con HFHC durante 12 semanas y posterior cambio de dieta por 8 semanas.

Estas observaciones también son consistentes con estudios recientes indicando que una dieta HFHC induce acumulación de lípidos en tejido hepático debido a la regulación positiva en la expresión de genes lipogénicos (SREBP-1c, FAS and ACC1) y la regulación negativa sobre genes relacionados con la exportación de VLDL (MTP-1 acyl-CoA oxidasa), sin el incremento en la entrada de LDL al hígado (Okada y col., 2013).

Cuadro 7. Concentraciones de colesterol y triglicéridos en tejido hepático y peso relativo de hígado.

GRUPOS	TGT (mg/dl)	CT (mg/dl)	PESO RELATIVO
NORMAL 4 S	24.6 ± 0.48	19.60 ± 4.33	3.49 ± 0.04
MODELO	83.7 ± 0.23	52.30 ± 48.06	5.86 ± 0.05
NORMAL 8 S	29.6 ± 0.21	89.50 ± 9.17	3.02 ± 0.01
DC	51.0 ± 0.73	99.70 ± 8.76	3.92 ± 0.04

Los resultados se reportan como la media ± EE. La evaluación estadística de los datos se determinó mediante el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel del confianza del 95%, seguida de la comparación de medias por la prueba de Tukey.

Todos los resultados obtenidos sobre el daño hepático pueden ser explicados con estudios donde describen que, la hipercolesterolemia exógena provoca la deposición de grasa en el hígado, el agotamiento de la población de hepatocitos, y también puede causar un mal funcionamiento del hígado, seguido de una aparente estenosis microvesicular debido a la acumulación intracelular de los lípidos (Ramesh y col., 2009).

7.7 Alteración de los sistemas antioxidantes en tejido hepático

El estrés oxidativo está altamente correlacionado con una amplia variedad de estados de enfermedad inflamatorios y metabólicos, incluyendo la obesidad y enfermedades del hígado como la esteatosis no alcohólica. Es altamente correlacionada con daño acumulativo en el cuerpo causado por los RLs inadecuadamente neutralizados por los antioxidantes, mismos que pueden afectar negativamente a la supervivencia celular debido al daño de la membrana a través del daño oxidativo de los lípidos, proteínas y modificación irreversible del ADN (Noeman y col., 2011). La progresión desde la esteatosis simple a esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) es un proceso que se logra, por lo general, con la participación de los fenómenos dominantes tales como resistencia a la insulina, el estrés oxidativo y la inflamación (Haddad y col., 2011).

Las enzimas GST son responsables de proteger contra las moléculas de electrófilos, tales como los generados durante el estrés o la administración de agentes farmacéuticos oxidativo. El Cuadro 8 muestra los resultados de los marcadores de estrés oxidativo, donde la actividad de GST fue significativamente mayor para los grupos modelo y DC con respecto al grupo normal. De manera similar, en un estudio realizado en humanos se observó que la actividad de GST en pacientes aumenta con la progresión a HGNA, debido a que los pacientes pueden tener una capacidad reducida para combatir los daños oxidativos de compuestos electrófilos (Hardwick, 2009).

Cuadro 8. Marcadores de estrés oxidativo en hígado (GST, GSH, CAT, GPx, MDA/TBARS)

GRUPOS	GST (nmol/mgxmin)	GSH (μ M/mg prot)	CAT (U/mg prot)	GPX (U/mg prot)	MDA (U/mg tejido)
NORMAL 4 S	283.69 \pm 5.1 ^a	168.11 \pm 18.80 ^a	27.98 \pm 5.67 ^a	5.03 \pm 0.85 ^a	0.02 \pm 0 ^a
MODELO	610.56 \pm 4.2 ^b	122.7 \pm 9.20 ^b	30.99 \pm 6.60 ^a	4.58 \pm 0.80 ^a	0.25 \pm 0 ^b
NORMAL8 S	286.12 \pm 2.2 ^a	163.84 \pm 18.91 ^a	26.91 \pm 6.83 ^a	4.7 \pm 0.69 ^a	0.03 \pm 0 ^a
DC	512.77 \pm 2.5 ^c	137.38 \pm 14.32 ^b	39.5 \pm 8.84 ^b	4.49 \pm 0.70 ^a	0.02 \pm 0 ^a

Los valores son expresados como los promedios \pm DE. $p < 0,05$. *Representa la diferencia significativa entre grupo control y grupo modelo.

El Cuadro 8 también muestra los resultados de GPX donde no se observa diferencia estadística significativa entre los 4 grupos. Esta enzima metaboliza el peróxido de hidrógeno en agua mediante el uso de GSH como donante de hidrógeno. A diferencia de otras enzimas, como la CAT que realiza esta misma función, GPX tiene un espectro más amplio, porque también reduce peróxidos lipídicos, catalizando la reacción a través de la cual el GSH reacciona con peróxidos para transformarlos en agua y alcohol.

El comportamiento de la enzima GPX en nuestro estudio no concuerda con otros estudios, debido posiblemente al tipo de isoenzima evaluada.

Se ha observado que la isoenzima mitocondrial es la principal enzima GPX alterada en EHNA, debido principalmente al agotamiento del GSH mitocondrial por diversos mecanismos, lo que a su vez disminuye la actividad catalítica óptima de la GPX mitocondrial (Tariq y col., 2014). Por el contrario, en nuestro estudio se determinó la actividad de la enzima GPX citosólica. Sin embargo, otro estudio también ha demostrado que no se detectaron diferencias en la actividad de la enzima GPX mitocondrial en el hígado de ratas alimentadas con dieta alta en grasa con respecto al grupo control con dieta normal (Melega y col., 2013). De acuerdo a Matsuzawa (2008), es posible que se esté dando diferente mecanismo de regulación para esta enzima por el exceso de lípidos, a diferencia de otras enzimas antioxidantes.

Las concentraciones de GSH disminuyeron significativamente en los grupos modelo y DC, con respecto al grupo control. Se ha reportado que una dieta alta en grasa afecta los niveles de GSH en el hígado de los roedores (Melega y col., 2013). El GSH funciona como un secuestrador directo de RLs y en la reparación de daño biológico causado por los mismos, como un sustrato para la actividad de GPX en la eliminación de intermediarios reactivos por la reducción de hidroperóxidos, y como un cofactor para muchas enzimas, incluyendo la GST. Dado que la actividad de GPX no se modifica, el posible mecanismo de agotamiento de la concentración de GSH se debe a su utilización como cofactor por la enzima GST (Maritim y col., 2003; Venkateswaran y Pari, 2003; García, 2004). Con respecto a lo anterior se encontró una correlación negativa entre la actividad de GST y la concentración de GSH ($r=-0.0097, p=0.003$). Los bajos niveles de GST también están correlacionados negativamente con los bajos niveles de ALT ($r=0.961, p=0.039$

La CAT es una enzima de amplia distribución, que consiste de cuatro subunidades proteicas.

Su actividad se localiza básicamente en los peroxisomas, en donde cataliza la conversión de H_2O_2 en agua y oxígeno molecular en muchos tejidos, siendo por tanto específicamente responsable de la destrucción de H_2O_2 dañino generado en exceso por diferentes procesos subcelulares, y por estrés biótico y abiótico (González y col., 2000; Limaye y col., 2003; Fernández y col., 2004). En el Cuadro 8 se observa que la actividad de CAT es significativamente mayor en el grupo DC, aún comparada con la actividad del grupo modelo, lo que sugiere que la actividad de esta enzima no se normaliza a pesar del cambio de dieta. Estos resultados concuerda con un estudio realizado en humanos, donde la actividad de CAT se incrementa en pacientes con HGNA (Perlemuter, 2005). Otro estudio también demuestra que la actividad de CAT aumenta con la progresión de la enfermedad (Hsiung, 2013). Se encontró una correlación positiva con los niveles altos de AST ($r=0.969, p=0.030$). La figura 10 muestra un resumen de las alteraciones que resultaron en los sistemas antioxidantes de los grupos experimentales.

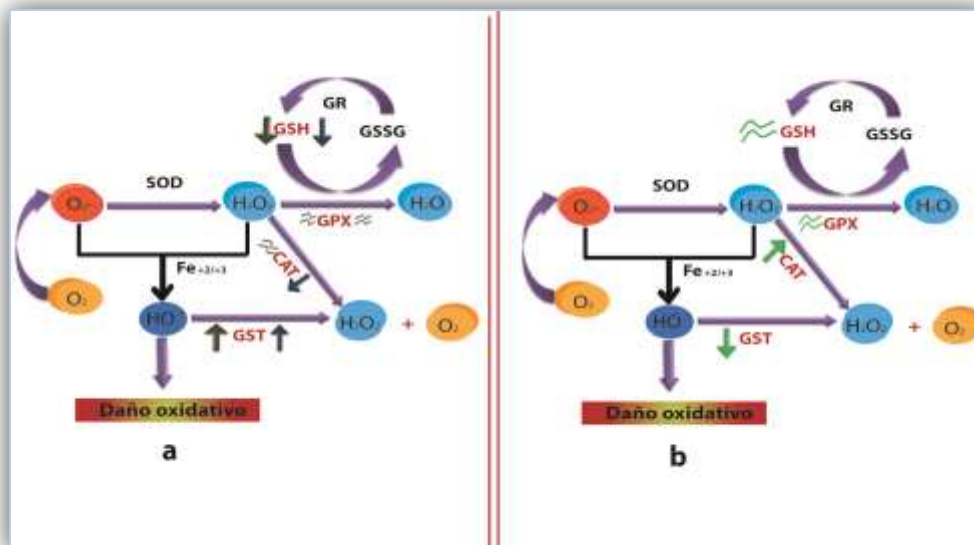


Figura 10. Comparación de los marcadores de estrés oxidativo entre grupos experimentales. Las flechas café indican la comparación entre el grupo **modelo** (4 semanas dieta HFHC) con respecto al grupo **normal 4s** (dieta estándar por 4 semanas). Las flechas azul indican la comparación entre el grupo **DC** (4 semanas dieta HFHC) y 4 semanas dieta normal) con respecto al grupo **normal 8s** (4 semanas dieta estándar). Las flecha verdes indican la comparación entre el **DC** (4 semanas dieta HFHC) con respecto al grupo **modelo** (4 semanas dieta HFHC).

La peroxidación lipídica puede dar lugar a daños reversibles e irreversibles en las células y los tejidos. En el Cuadro 8 podemos observar que las ratas del grupo modelo presentan un aumento significativo en la concentración de MDA-TBARS, con respecto al resto de los grupos.

El MDA es un producto final estable de la peroxidación lipídica y, por lo tanto, puede utilizarse como un marcador indirecto de la acumulación de peróxidos lipídicos. Noeman (2012) demuestra que una dieta alta en grasa aumenta la peroxidación lipídica en tejido hepático incrementando los niveles de MDA. De igual manera, Surapaneni y Jainu (2014) demostraron que una dieta alta en grasa aumenta niveles séricos de MDA y se han correlacionado con la gravedad de las enfermedades del hígado.

Por otro lado, los niveles hepáticos de MDA-TBARS se redujeron en las ratas del grupo DC, lo que sugiere que la disminución en la entrega y absorción de AGCL y colesterol por el cambio de dieta disminuyó a su vez la infiltración de grasa en el hígado, la producción de RLs como resultado de la disminución de la disfunción mitocondrial y la peroxidación de lípidos (Videla y col., 2004; Kojima y col., 2007; Haddad y col., 2011; Guyton y Hall, 2011; Morán-Ramos y col., 2012). Se encontró una correlación positiva en la concentración de TG ($r=0.96, p=0.00$), COL ($r=0.99, 0.01$), HDL ($r=0.97, p=0.03$) y LDL ($r=1.00, p=0.00$).

La figura 11 muestra un esquema del efecto que tuvo una dieta HFHC sobre marcadores de estrés oxidativo y alteraciones histopatológicas en el hígado de ratas Sprague-Dawley, y su efecto en la progresión de la enfermedad hasta hígado graso no alcohólico (EHNA). La ingesta de una dieta alta en calorías provenientes principalmente de grasas, carbohidratos y baja actividad física conducen a un incremento de TG y CT que se almacena en gotas de lípidos que con el tiempo podría llegar a un grado II y III de esteatosis y colesterosis en hígado.

Efectos concomitantes como la hiperlipidemia tienen un efecto promotor. Además, las ERO son mediadores potenciales que promueven el desarrollo de esteatosis hepática a la esteatohepatitis y fibrosis hepática. Bajo condiciones fisiológicas, el metabolismo de los ácidos grasos está estrechamente controlada por antagonistas tales como los antioxidantes, entre otros, que están implicados en la eliminación de EROS y en los procesos antiinflamatorios (Bettermann y col. 2014).

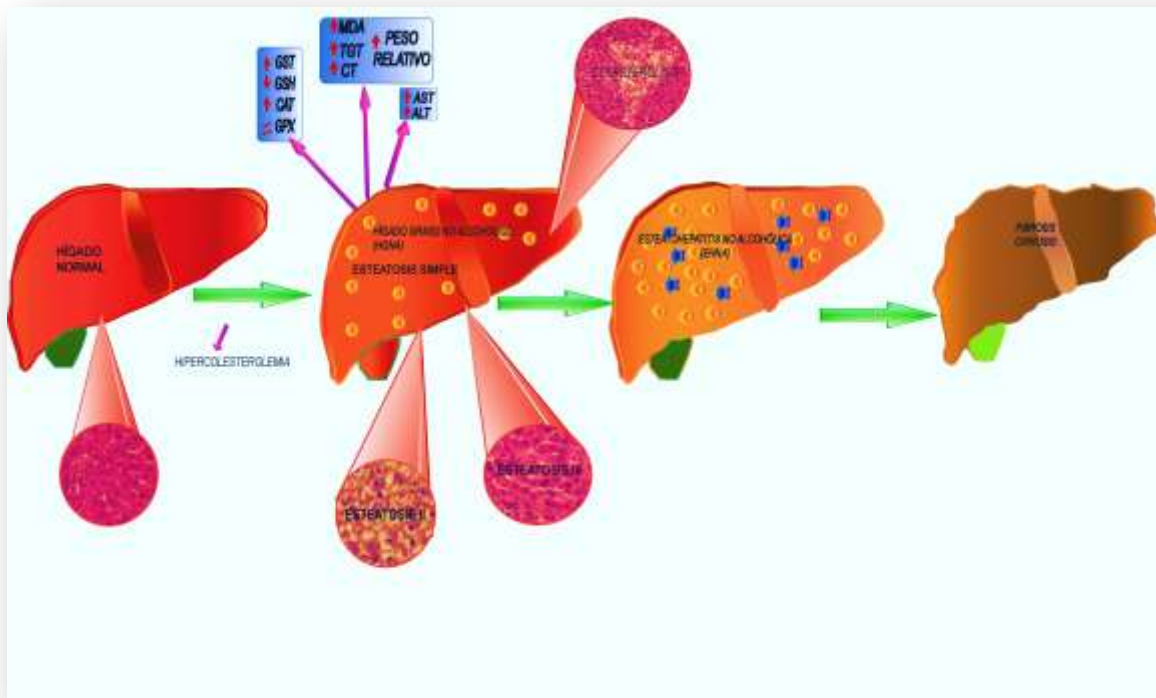


Figura 11. Efecto de una dieta alta HFHC sobre marcadores de estrés oxidativo y alteraciones histopatológicas en el hígado de ratas SP.

I. CONCLUSIONES

Una dieta alta en grasa (10 %) y alta en colesterol (2.5 %) induce esteatosis hepática no dependiente de alcohol confirmada con estudios histopatológicos. El cambio de dieta fue eficaz en normalizar los marcadores bioquímicos en suero (TG, COL, HDL y LDL), pero no así en el contenido de lípidos en hígado (TG y CT).

El daño oxidativo se ve evidenciado por la disminución en las actividades de las enzimas antioxidantes, tales como la catalasa (CAT) y la glutatión S-transferasa (GST), así como de los niveles del glutatión reducido (GSH), que actúan como eliminadores del estrés oxidativo asociado a la progresión desde la esteatosis simple a esteatohepatitis. Como estrategia de tratamiento el cambio de dieta no es suficiente para normalizar los marcadores de estrés oxidativo

Con respecto al daño hepático, se requiere un estudio más detallado que explique la poca efectividad del cambio de dieta en revertir el daño histopatológico al hígado de ratas Sprague-Dawley alimentadas con una dieta alta en grasa y colesterol.

No todos los marcadores mejoran con el cambio de dieta, se sugiere una combinación de terapias/tratamientos.

ANEXOS

NaOH 1.0 M

- a) Para 25 mL se pesa 1 g de NaOH.
- b) Se afora a 25 mL.

Solución amortiguadora Tris/Sacarosa pH 7

- a) Pesar 7.9 g de Tris-HCl.
- b) Pesar 2.1 g de $MgCl_2$.
- c) Pesar 1.9 g de KCl.
- d) Pesar 85.6 g de sacarosa ultra pura.
- e) Aforar a 1000 mL de H_2O destilada.

Nota: medir pH al 80% de la solución y después aforar.

Solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7

- a) Pesar 1.362 g de NaH_2PO_4 .
- b) Pesar 2.67 g de Na_2HPO_4 .
- c) Aforar a 500 mL de H_2O destilada.

Nota: medir pH al 80% de la solución y después aforar.

Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 6.5

- a) Pesar 2.362 g de NaH_2PO_4 .
- b) Pesar 1.85 g de Na_2HPO_4 .
- c) Aforar a 500 mL de H_2O destilada.

Nota: medir pH al 80% de la solución y después aforar.

Solución de trabajo para determinación de proteína

- a) Se miden 10 mL de reactivo A.
- b) Se agregan 200 μL de reactivo B.

Solución amortiguadora Tris-EDTA pH 8.2

- a) Pesar 0.744 g de EDTA y aforar a 100 mL (concentración 0.02 M).
- b) Pesar 3.152 g de TRIS y aforar a 100 mL (concentración 0.2 M).
- c) Se mezclan con una proporción 1:1

Nota: Medir pH al 80% de la solución y aforar.

Solución de trabajo inicial GSH

- a) Pesar 0.00184 g de GSH.
- b) Disolver en 10 mL de metanol.

Nota: Se debe almacenar en refrigeración.

Solución de DTNB 2.46 mM

- a) Pesar 0.0243 g de DTNB.
- b) Disolver en 25 mL de metanol.

Nota: Se debe almacenar en refrigeración.

Solución de ácido tricloro acético (TCA) al 20%

- a) Pesar 1.1051 g de TCA
- b) Disolver en 5 mL de agua destilada.

Solución de trabajo GSH 3 mM

- a) Preparar una solución stock de 150 mM: pesar 0.2305 g de GSH y disolver en 5 mL de solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.1 M (Anexo 10).
- b) Para preparar la solución de trabajo se mezclan 140 μ L de solución stock y se añaden 6.86 mL de solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.1 M

Nota: La solución stock es estable por máximo 4 días; la solución de trabajo es estable por 24 h.

Solución de trabajo CDNB 2 mM

- a) Preparar una solución stock de 60 mM: pesar 0.0244 g de CDNB y disolver en 2 mL de metanol absoluto.
- b) Para preparar la solución de trabajo se mezclan 300 μ L de solución stock y se añaden 8.7 mL de solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.1 M (Anexo 10).

Nota: La solución stock es estable por máximo 4 días; la solución de trabajo es estable por 24 h.

Solución amortiguadora de reacción Tris-EDTA pH 8.

- a) Se pesan 3.94 g de Tris-HCl (concentración 50 mM).
- b) Se pesan 0.0936g de EDTA (concentración 0.5 mM).

- c) Se afora a 500 mL.

Nota: Se mide el pH al 80% y después se afora.

Cocktail GSH/GR (42 mM GSH, 6 unidades de GR/mL)

- a) Pesar 0.0129 g de GSH y disolver en 10mL de solución amortiguadora de reacción (Anexo 18).
b) Tomar 66 μ L de glutatión reductasa (GR).
c) Aforar a 5 mL con solución amortiguadora de reacción.

Nota: El cocktail se guardó por separado, agregando 25 μ L de cada solución al pozo.

Solución NADPH 5 mM

- a) Se pesan 0.0124 g de NADPH en 10 mL de solución amortiguadora de reacción.

Nota: La solución debe de utilizarse inmediatamente después de que se prepara y no debe de congelarse para su reuso.

Hidroperóxido de cumeno 3 mM.

- a) Se toman 5.55 μ L de hidroperóxido de cumeno al 80% y se afora a 10 mL con H₂O destilada.

Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 30 mM.

- a) Tomar 80 μ L de H₂O₂ al 30% en 250 mL de solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 7.

LITERATURA CITADA

Aebi H. Catalase in vitro. 1984. *Methods Enzymol* ; 105:121-126

Al-Gubory KH, Bolifraud P, Ceballos-Picot I., Germain G, Nicole A. 2004. Antioxidant enzymatic defence systems in sheep corpus luteum throughout pregnancy. *Reproduction*. 128(6):767-74.

Naim Alkhouri¹, Dixon Laura J , and Feldstein Ariel E. 2009. Lipotoxicity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Not All Lipids Are

Created Equal. August. *Gastroenterol Hepatol.* ; 3(4): 445–451. doi:10.1586/egh.09.32

Balaban, Shino Nemoto and Toren Finkel. Mitochondria, Oxidants, and Aging (2005). *Cell*, Vol. 120, 483–495

Bergheim Ina and Giridhar Kanuri. 2013. In Vitro and in Vivo Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *International Journal of Molecular Sciences*; 11963-11980; doi:10.3390/ijms140611963"

Bettermann Kira , Hohensee Tabea and Haybaeck Johannes. 2014. Steatosis and Steatohepatitis: Complex Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*; 15, 9924-9944; doi:10.3390/ijms15069924

Bujanda Luis , Elizabeth Hijona, Mikel Larzabal, Marta Beraza, Pablo Aldazabal, Nerea García-Urkia, Cristina Sarasqueta, Angel Cosme, Belen Irastorza, Alberto González, and Juan I Arenas, Jr. 2008. Resveratrol inhibits nonalcoholic fatty liver disease in rats. *BMC Gastroenterol.* 8: 40.

Damaso A.R.W.L., do Prado ,A. de Piano a, L. Tocka, D.A. Caranti , M.C. Lofrano, J. Carnier , D.J.M. Cristofalo , H. Lederman , S. Tufikc, M.T. de Mello. 2007. Relationship between nonalcoholic fatty liver disease prevalence and visceral fat in obese adolescents. *Digestive and Liver Disease* 40 (2008) 132–139.

Dixon John B. ,Prithi S. Bhathal, Norman R. Hughes, and Paul E. O'Brien. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Improvement in Liver Histological Analysis With Weight Loss .2004. *Hepatology* Volume 39, Issue 6."

Eckard Carly, Renee Cole, Joshua Lockwood, Dawn M. Torres, Christopher D. Williams, Janet C. Shaw and Stephen A. Harrison.2013.Prospective histopathologic evaluation of lifestyle modification in nonalcoholic fatty liver disease: a randomized trial.Ther Adv Gastroenterol (2013) 6(4) 249–259

Egawa Tetsu , Katsumi Toda, Yoshihisa Nemoto, Masafumi Ono, Naoaki Akisawa, Toshiji Saibara, Yoshihiro Hayashi, Makoto Hiroi, Hideaki Enzan, Saburo Onishi.2003.Pitavastatin ameliorates severe hepatic steatosis in aromatase-deficient (Ar^{-/-}) mice.Lipids Volume 38, Issue 5, pp 519-523"

Elahi M, Matata BM.2006. Free radicals in blood: evolving concepts in the mechanism of ischemic heart disease. Arch BiochemBiophys. ;450:78-88.

Fernandez, N.,Carvajal, M. y Olmos, E. 2004.Graff union formation in tomato plants:peroxidasa and acatalsa involvement.Annals of Botany. Vol. 93 :53-60

Ferré Natàlia, Mònica Tous, Jordi Camps, Francesc Riu, Jorge Joven.2005.Feeding apolipoprotein E-knockout mice with cholesterol and fat enriched diets may be a model of non-alcoholic steatohepatitis..Molecular and Cellular Biochemistry;Volume 268, Issue 1-2, pp 53-58

García R.J,C 2004. Glutation S- tranferasa como sistema protector en los procesos degerativos.Ciencias biologicas.Vol. 35:56-58.

Gonzales M C. Bentacour M. y Ortiz2000. Daño oxidativo y antioxidatanes. Bioquimica.Vol. 25:3-9.

Goñi León ,Avelina Caridad,Blanco Diuris,Peña Amelia,Ronda Marisel,González Bárbara O., Arteaga María E., Bada Ana M. ,

González Yana,Mancebo Axel.Valores hematológicos y bioquímicos de las ratas Sprague Dawley producidas en CENPALAB, Cenp: SPRD(2011). Revista electrónica de Veterinaria - ISSN 1695-7504.Volumen 12 N° 11"

Guyton y Hall, 2011 Tratado de la fisiologia medica. Edicion 12.

Habig William H. , Michael J. Pabst and William B. Jakoby.1974 .Glutathione S-Transferases.The first enzymatic step in mercapturic acid formation. Journal of Biological Chemistry, 249, 7130-7139."

Haddad Yara , Diane Vallerand, Antoine Brault, and Pierre S. Haddad. 2011. Antioxidant and Hepatoprotective Effects of Silibinin in a Rat Model of Nonalcoholic Steatohepatitis. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Volume 2011, Article ID 647903, 10 pages."

Hardwick James P. Douglas Osei-Hyiaman, Homer Wiland, Mohamed A. Abdelmegeed, and Byoung-Joon Song. 2009

Hikman I., Jonsson J., Prins J., Ash S., Purdie D., Clouston A., 2004. Modest weight loss and physical activity in overweight patients with chronic liver disease results in sustained improvements in alanine aminotransferase, fasting insulin, and quality of life. Gut 53: 413–419

Ilmu Bagian Penyakit Dalam, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. 2007. peran kolesterol dan diet lemak tinggi terhadap profil lipid pada tikus sp rague dawley. Sain Vet. Vol.25 No.2

Ji Guiyuan , Xihong Zhao, Liang Leng¹, Peiyi Liu, Zhuoqin Jiang. Comparison of Dietary Control and Atorvastatin on High Fat Diet Induced Hepatic Steatosis and Hyperlipidemia in Rats. 2011. Ji et al. Lipids in Health and Disease 2011, 10:23

Kanuri Giridhar and Bergheim Ina. In Vitro and in Vivo Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). Int. J. Mol. Sci. 14, 11963-11980.

Kitamori Kazuya , Hisao Naito, Hazuki Tamada, Miya Kobayashi , Daisuke Miyazawa , Yuko Yasui, Kunihiro Sonoda , Satoru Tsuchikura , Naomi Yasui , Katsumi Ikeda , Takashi Moriya, Yukio Yamori, Tamie Nakajima. 2012. Development of novel rat model for high-fat and high-cholesterol diet-induced steatohepatitis and severe fibrosis progression in SHRSP5/Dmcr. 2011. Environ Health Prev Med DOI 10.1007/s12199-011-0235-9

Lee SJ, Choi SK, Seo JS. 2005. Grape skin improves antioxidant capacity in rats fed a high fat diet. Nutr Res Pract. Winter;3(4):279-85.

Lieber Charles S, Maria A Leo, Ki M Mak, Youqing Xu, Qi Cao, Chaoling Ren, Anatoly Ponomarenko, and Leonore M DeCarli. 2004, Model of nonalcoholic steatohepatitis. Am J Clin Nutr ;79:502–9.

Limaye Pallavi V., Nandula Raghuram, S. Sivakami.2003.Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats.Molecular and Cellular Biochemistry Volume 243, Issue 1-2, pp 147-152

Maritim A. C., R. A. Sanders andJ. B. Watkins .2003.Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review..Journal of Biochemical and Molecular Toxicology Volume 17, Issue 1, pages 24–38.

Mathews C.K., Van Holde, K. E. y Ahern, K. G. 2002. Bioquímica. 3ra. Ed., Pearson Educacion, Madrid:1290

Matsuzawa-Nagataa Naoto , Toshinari Takamura,Hitoshi Andob, Seiji Nakamuraa,Seiichiro Kuritab, Hirofumi Misub, Tsuguhito Otab, Masayoshi Yokoyamab, Masao Hondab, Ken-ichi Miyamotoa, Shuichi Kaneko.

Melega S. , D. Canistro¹, G. R. De Nicola, L. Lazzeri, A. Sapone and M. Paolini.2013.Protective effect of Tuscan black cabbage sprout extract against serum lipid increase and perturbations of liver antioxidant and detoxifying enzymes in rats fed a high-fat diet. .British Journal of Nutrition, page 1 of 10

Navarro Virginia Santamaría, Amaia Zabala Letona, Saioa Gómez Zorita, María del Puy Portillo Baquedano.2009.Metabolismo del colesterol: bases actualizadas. Revista Española de Obesidad • Vol. 7 • Núm. 6"

Neuschwander-Tetri Brent A. and Stephen H. Caldwell, 2003,Nonalcoholic Steatohepatitis: Summary of an AASLD Single Topic Conference. HEPATOLOGY, Vol. 37, No. 5

Noeman Saad A *, Hala E Hamooda and Amal A Baalash. 2011. Biochemical Study of Oxidative Stress Markers in the Liver, Kidney and Heart of High Fat Diet Induced Obesity in Rats. Noeman et al. Diabetology & Metabolic Syndrome, 3:17

Novo Erica, Maurizio Parola.2012.The role of redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis.2010.Fibrogenesis & Tissue Repair , 5(Suppl 1):S4 Okada Y, Yamaguchi K, Nakajima T, Nishikawa T, Jo M, Mitsumoto Y, Kimura H, Nishimura T, Tochiki N, Yasui K, Mitsuyoshi H, Minami M, Kagawa K, Okanoue T, Itoh Y.2013..Rosuvastatin ameliorates high-fat and high-cholesterol diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in rats.Liver Int. 2013 Feb;33(2):301-11. doi: 10.1111/liv.12033.

Pacher P, Szabo C. 2008. Role of the peroxynitritepoly (ADP-ribose) polymerase pathway in human disease. Am J Pathol.; 173:2-13.

Panchal Sunil K. y Brown Lindsay.2011,. RodentModels forMetabolic Syndrome Research Journal of Biomedicine and Biotechnology Volumen Article ID 351982, 14 pages

Paschos P and Paletas K .2009.Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome..Hippokratia. 2009 Jan-Mar; 13(1): 9–19

Perlemuter G, Davit-Spraul A, Cosson C, Conti M, Bigorgne A, Paradis V, Corre M-P, Prat L, Kuoch V, Basdevant A, Pelletier G, Oppert J-M, Buffet 2005. C. Increase in liver antioxidant enzyme activities in non-alcoholic fatty liver disease..Liver International : 25: 946–953. r Blackwell Munksgaard 2005"

Qui-Zapata, J.A., Peña-Rodríguez, L. M., Castro-Concha, L. A. y Miranda-Ham, M.L. 2010. Peroxidación Lipídica como.Marcador de Muerte Celular en Cultivos Celulares de Cemapasúchil (Tagetes erecta L.).2010. Revista Mexicana de Fitopatología 28:165-167.

Ramesh E., Jayakumar T., Elanchezhian R., Sakthivel M., Geraldine P., Thomas P.A.. Green tea catechins, alleviate hepatic lipidemic-oxidative injury in Wistar rats fed an atherogenic diet. (2009). Chemic-Biological Interactions 180-10–19

Reid andrea e. Nonalcoholic Steatohepatitis.2001.Gastrointestinal Unit, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts.GASTROENTEROLOGY ;121:710–723

Rivera, Chantal A.Agosto de 2008. Risk factors and Mechanisms of Non-alcoholic Steatohepatitis. NIH Public Access, 15(2)(109–114).

Shelby Sullivan..2010 Implications of Diet on Nonalcoholic Fatty Liver Disease.Curr Opin Gastroenterol. 2010 March ; 26(2): 160–164

Suzuki A., Lindor K., St Saver J., Lymp J., Mendes F., Muto A., et al. 2005 Effect of changes on body weight and lifestyle in nonalcoholic fatty liver disease. J Hepatol 43: 1060–1066

Takahashi Yoshihisa , Yurie Soejima, Toshio Fukusato2012 ..Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/ nonalcoholic steatohepatitis. World J Gastroenterol ; 18(19): 2300-2308

Tamura Y., Tanaka Y., Sato F., Choi J., Watada H., Niwa M..2005 Effects of diet and exercise on muscle and liver intracellular lipid contents and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. J Clin Endocrinol Metab 90: 3191–3196

Tanaka Yuji, Aleksunes Lauren M., Yeager Ronnie L., Gyamfi Maxwell A., Esterly Noriko, Guo Grace L., and Klaassen Curtis D. 2008.NF-E2-Related Factor 2 Inhibits Lipid Accumulation and Oxidative Stress in Mice Fed a High-Fat Diet. The journal of pharmacology and experimental therapeutics. Vol. 325, No. 2. .

Tariq Zoon , Charlotte J. Green and Leanne Hodson..2014.Are oxidative stress mechanisms the common denominator in the progression fromhepatic steatosis towards non-alcoholic steatohepatitis (NASH)?.Liver Int. 34: e180–e190"

Venereo Gutiérrez Justo R.Daño.2002. Oxidativo, radicales libres y antioxidantes..Rev Cub Med Mil v.31 n.2 Ciudad de la Habana a

Venkateswaran S, Parí L.,2003. Effect of Coccinia indica leaves on antioxidant status in streptozotocin-induced diabetic rats.Journal of Ethnopharmacology.Volume 84, Issues 2–3.Pages 163–168

Videla Luis A. , Ram´On Rodrigo, Myriam Orellana, Virginia Fernandez, Gladys Tapia, Luis Qui ~ Nones, Nelson Varela, Jorge Contreras, Ra´ UI Lazarte, Attila Csendes, Jorge Rojas, Fernando Maluenda, Patricio Burdiles, Juan C. Diaz, Gladys Smok§, Lilian Thielemann And Jaime Poniachik.2004.Oxidative Stress-Related Parameters In The Liver of non-alcoholic fatty liver disease patients.. Clinical Science. 106, 261–268"

Videla Luis A.2009 Oxidative stress signaling underlying liver disease and hepatoprotective mechanisms. .World J Hepatol . 1(1): 72-78

Wang Xin , Yuzhen Cao, Yunwei Fu, Guifang Guo and Xiuying Zhang.2011.Liver fatty acid composition in mice with or without nonalcoholic fatty liver disease. *Lipids in Health and Disease* , 10:234"

Yang Xi , Laura K. Schnackenberg, Qiang Shi, and William F. Salminen,2014.Biomarkers in Toxicology. Elsevier. ISBN: 978-0-12-404630-6

Zhang Hongqiao And Henry Jay Forman.Redox Regulation Of G-Glutamyl Transpeptidase. 2009.American Journal Of Respiratory Cell And Molecular Biology Vol 41