



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“Efecto farmacológico del esteviósido en un modelo experimental
novedoso de hígado graso no alcohólico y caracterización de un
nuevo modelo de esteatohepatitis no alcohólica”**

T E S I S

Que presenta

QFI. IRINA CARDOSO LEZAMA

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

FARMACOLOGÍA

Director de la Tesis:

Dr. Pablo Muriel de la Torre

Ciudad de México

Diciembre, 2019

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Hepatología Experimental del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la asesoría del Dr. Pablo Muriel de la Torre.

Se contó con la beca del CONACYT para estudios de posgrado con clave de registro: **827244**.

Índice

	Página
Resumen	i
Abstract	iii
1 El hígado a través del tiempo	1
2 Anatomía del hígado	2
2.1 Células hepáticas	2
2.2 Funciones metabólicas	3
2.3 Patogénesis de la esteatohepatitis no alcohólica	4
2.4 Modelos de esteatohepatitis no alcohólica	9
2.4.1 Modelos genéticos	10
2.4.2 Modelos dietarios	11
2.4.3 Combinación de modelos	11
2.5 Las plantas medicinales	12
2.6 La <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	13
2.7 El esteviósido	14
2.7.1 Efecto anti-hiperglicémico	16
2.7.2 Actividad antioxidante	17
3 Justificación	18
4 Hipótesis	18
5 Objetivos	19
5.1 Objetivo general	19
5.2 Objetivos particulares	19
6 Metodología	19
6.1 Animales de experimentación	19

Índice

	Página	
6.2	Reactivos y materiales	20
6.3	Modelo de hígado graso no alcohólico	20
6.4	Análisis de la esteatosis	21
6.5	Determinación demarcadores de daño hepático	21
6.6	Análisis estadístico	22
6.6.1	Determinación de la actividad de la alanina aminotransferasa	23
6.6.2	Curva de calibración de alanina aminotransferasa	25
6.6.3	Determinación de la actividad de fosfatasa alcalina	26
6.6.4	Curva estándar de fosfatasa alcalina	27
6.6.5	Determinación de la actividad de gamma-glutamil transpeptidasa	28
6.6.6	Curva de calibración de p-nitroanilina	29
6.6.7	Determinación del glucógeno hepático	30
6.6.8	Determinación de proteínas	32
6.6.9	Curva de calibración para proteínas	33
6.7	Determinación del glutatión reducido	34
6.7.1	Curva estándar de glutatión reducido-colorimétrico	36
6.7.2	Determinación del grado de peroxidación lipídica	37
6.7.3	Determinación de colágena	38
6.7.4	Curva estándar de hidroxiprolina	41
6.7.5	Zimografía	42
7	Histologías	43
7.1	Tinción de hematoxilina y eosina	43
7.2	Tinción tricrómica de Masson	44
7.3	Tinción de rojo oleoso O	45
8	Resultados	46
8.1	Efecto del esteviósido sobre el peso corporal	46
8.2	Efecto del esteviósido sobre el peso de los hígados	47

	Índice	Página
8.3	Efecto del esteviósido sobre la esteatosis hepática	48
8.4	Actividad enzimática de la alanino aminotransferasa, fosfatasa alcalina y γ -glutamil transpeptidasa	50
8.4.1	Actividad enzimática de la alanino aminotransferasa	50
8.4.2	Actividad enzimática de la fosfatasa alcalina	51
8.4.3	Actividad enzimática de la γ -glutamil transpeptidasa	52
8.5	Determinación del glutatión reducido hepático	53
8.5.1	Contenido del glucógeno hepático	54
9	Nuevo modelo para inducción de esteatohepatitis no alcohólica	56
10	Resultados	58
10.1	Efecto del tratamiento sobre la esteatosis hepática	58
10.2	Efecto del tratamiento sobre el peso corporal de las ratas	60
10.3	Efecto del tratamiento sobre el peso de los hígados	61
10.4	Relación peso del hígado/peso corporal	62
10.5	Actividad enzimática de la alanino aminotransferasa, fosfatasa alcalina y γ -glutamil transpeptidasa	63
10.5.1	Actividad enzimática de la alanino aminotransferasa	63
10.5.2	Actividad enzimática de la fosfatasa alcalina	64
10.5.3	Actividad enzimática de la γ -glutamil transpeptidasa	65
10.6	Determinación del glutatión reducido hepático	66
10.6.1	Efecto del tratamiento sobre la capacidad biosintética del hígado	67
10.6.2	Efecto del tratamiento sobre el estrés oxidante	68
10.6.3	Efecto del tratamiento sobre la cantidad de lípidos en el hígado	69
10.6.4	Efecto del modelo sobre el colesterol total	71
10.6.5	Efecto del modelo sobre el colesterol LDL	72
10.6.6	Efecto del modelo sobre el colesterol HDL	73

	Índice	Página
10.6.7	Efecto del modelo sobre los triglicéridos	74
10.6.8	El tratamiento favoreció la síntesis de la colágena	75
10.6.9	Efecto del tratamiento sobre la remodelación de la matriz extracelular	77
10.7	Efecto del tratamiento sobre la estructura hepática	78
11	Discusión	79
12	Conclusiones	90
13	Perspectivas	91
14	Bibliografía	92
15	Anexos	102
15.1	Curva de calibración de la ALT	102
15.2	Curva de calibración de la FA	103
15.3	Curva de calibración de la γ -GTP	104
15.4	Curva de calibración de las proteínas	105
15.5	Curva de calibración de GSH	106
15.6	Curva de calibración de HP	107

Índice de figuras

Figura		Página
1	Modelo sumerio del hígado	1
2	Estructuras del hígado	3
3	Patogénesis de la esteatohepatitis no alcohólica	5
4	Representación histológica del desarrollo de la esteatohepatitis no alcohólica	6
5	Lipogénesis en hígado	8
6	Desarrollo de la esteatohepatitis no alcohólica	9
7	Documentos que respaldan el uso de plantas medicinales para el tratamiento de diversos síntomas	12
8	Esquema de la <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	14
9	Transglicosilación del esteviol para dar lugar a esteviolmonósido, esteviolbiósido, esteviósido y rebaudiósido A	15
10	Estructura del esteviósido	15
11	Obtención de la 2,4-dinitrofenilhidrazona a partir de la reacción del piruvato y la 2,4-DNHP	23
12	Formación de p-nitrofenol a partir del p-nitrofenilfosfato	26
13	Reacción catalizada por la γ -GTP para formar p-nitroanilina	28
14	Reacción entre el furfural y la antrona	30
15	Reacción colorida del reactivo de Ellman con el GSH	34
16	Reacción entre el malondialdehído y ácido tiobarbitúrico	37
17	Reacciones de oxidación y descarboxilación que sufre la hidroxiprolina	38
18	La administración del esteviósido aparentemente tiene un efecto antiesteatótico	49
19	La administración de la dieta aparentemente favorece la acumulación de lípidos en los hepatocitos	58

Índice de figuras

Figura		Página
20	La administración de la dieta favoreció la acumulación de lípidos en los hepatocitos y se potencia con la administración concomitante del CCl ₄ .	70
21	Efecto del tratamiento sobre la deposición de matriz extracelular en el parénquima hepático	76
22	Determinación de la actividad de las metaloproteinasas 9 y 2 en muestras de tejido hepático, mediante la técnica de zimografía	77
23	Imagen estructural en donde se observa la conservación de la arquitectura del parénquima hepático	78

Índice de tablas

Tabla		Página
1	Efectos benéficos del esteviósido	16
2	Composición de la dieta líquida aterogénica	21
3	Curva de calibración de la ALT	25
4	Curva estándar para la fosfatasa alcalina	27
5	Curva de calibración de la γ -GTP	29
6	Curva de calibración para proteínas	33
7	Curva de calibración para GSH	36
8	Curva estándar de HP	41

Índice de gráficas

Gráfica		Página
1	Efecto del esteviósido sobre el peso de las ratas a lo largo del periodo de estudio	46
2	Efecto del esteviósido sobre el peso de los hígados de rata a lo largo del periodo de estudio	47
3	Actividad de la enzima alanino aminotransferasa (ALT) en suero de ratas	50
4	Actividad de la enzima fosfatasa alcalina (FA) en suero de ratas	51
5	Actividad de la enzima gamma-glutamil transpeptidasa (γ -GTP) en suero de ratas	52
6	Determinación de glutatión reducido en el hígado de ratas	53
7	Contenido de glucógeno hepático de ratas	54
8	Efecto de la dieta sobre el peso de las ratas a lo largo del periodo de estudio	60
9	Efecto de la dieta sobre el peso de los hígados de rata a lo largo del periodo de estudio	61
10	Relación peso del hígado/peso corporal de las ratas al final del periodo de estudio	62
11	Actividad de la enzima alanino aminotransferasa (ALT) en suero de ratas	63
12	Actividad de la enzima fosfatasa alcalina (FA) en suero de ratas	64
13	Actividad de la enzima γ -glutamil transpeptidasa en suero de ratas	65
14	Determinación de glutatión reducido en el hígado de ratas	66
15	Contenido de glucógeno hepático de ratas	67
16	Determinación de la peroxidación lipídica en el hígado de rata	68

Índice de gráficas

Gráfica		Página
17	Determinación del colesterol total en suero de ratas	71
18	Determinación de colesterol LDL mediante la fórmula de Friedewalld en suero de ratas	72
19	Determinación de colesterol HDL en suero de ratas	73
20	Efecto del tratamiento sobre los niveles séricos de triglicéridos de ratas	74

Abreviaturas

γ -GTP: gamma-glutamil transpeptidasa

ACC: acetil-coenzima A carboxilasa

ALT: alanino aminotransferasa

ANOVA: análisis de varianza

CAT: catalasa

CCl₄: tetracloruro de carbono

ChREBP: proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos

DAG: diacilglicerol

FA: fosfatasa alcalina

FAS: sintasa de ácidos grasos

FOXO1: proteína O1 de la caja de forkhead

G6pc: glucosa 6 fosfatasa

Gpx: glutatión peroxidasa

GSH: glutatión reducido

HCC: carcinoma hepatocelular

HSC: células estelares hepáticas

IL: interleucina

Insr: receptor de insulina

Irs2: substrato para el receptor de insulina 2

KC: células de Kupffer

LDL: lipoproteína de baja densidad

LPS: lipopolisacárido

LSEC: células endoteliales del sinusoides hepático

LXR: receptor hepático X

MEC: matriz extracelular

mTor: blanco del complejo 1 de rapamicina en mamíferos

NASH: esteatohepatitis no alcohólica

NK: natural killer

Nrf2: factor nuclear relacionado al eritroide 2

OMS: organización mundial de la salud

PMN: polimorfonuclear

PNPLA3: gen 3 que contiene el dominio fosfolipasa de tipo patatina

PPAR- γ : receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma

RI: resistencia a la insulina

SCD-1: estearoil-coenzima A desaturasa

SOD: superóxido dismutasa

SREBP-1c: proteína 1c de unión al elemento regulador de esteroides

STAM: molécula adaptadora para transducción de señales

STV: esteviósido

TAG: triacilglicerol

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

TLR: receptor tipo Toll

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

Treg: linfocito T regulador

UPEAL: unidad de producción y experimentación de animales de laboratorio

VLDL: lipoproteína de muy baja densidad

Z1: zona 1

Z2: zona 2

Agradecimientos

A mi asesor, el **Dr. Pablo Muriel de la Torre**, en primer lugar, por su paciencia y amistad, así como por guiarme en esta etapa de mi vida académica y sobre todo por forjar mi camino como futura investigadora.

A mis asesores la **Dra. María del Carmen García García** y el **Dr. Víctor Katsutoshi Tsutsumi Fujiyoshi** por el tiempo que le dedicaron a la revisión de este trabajo y por sus comentarios tan acertados que permitieron enriquecerlo aún más.

A todos los miembros del laboratorio 15 de hepatología experimental a **Lic. Enfría. Rosa Elena Flores Beltrán**, a la **Dra. Erika Ramos Tovar**, al **Dr. Sael Casas Grajales, Biól. Exp. José Manuel Alonso Mora, A.Q.B. María del Consuelo Acero Hernández** y a don **Benjamín Salinas Hernández** por sus consejos y su amistad, por su valiosa ayuda en el trabajo experimental, así como por hacer más ameno el día a día en el laboratorio.

Con especial agradecimiento al **M en C. Eduardo Enrique Vargas Pozada** y **Lic. Enfría. Laura Dayana Buendía Montaña**, ya que la ayuda de ambos facilitó la culminación de mi tesis, ¡muchas gracias!

A la **Q.F.B. Silvia Galindo Gómez** y a **M. en C. Karla Montserrat Gil Becerril** por su ayuda en la toma de datos histológicos, por enseñarme cosas nuevas y ser pacientes en mi proceso de aprendizaje, por compartir sus conocimientos para complementar esta tesis.

Y, por último, al personal de la UPEAL, **M.V.Z Ricardo Gaxiola Centeno, M.V.Z Rafael Leyva Muñoz** y **M.V.Z Benjamín E. Chávez Álvarez** y **Téc. René Pánfilo Morales**, por haber facilitado el mantenimiento y cuidado de los animales que se utilizaron en este trabajo, muchas gracias.

Dedicatorias

A mis amigos y compañeros: QFB. Tania Smith, QFB. Alejandra Sánchez y Biól. Raúl Vega, por brindarme su amistad, por sus enseñanzas y hacer el camino más fácil.

A mis otros amigos, Cindy, Crys, Elena, Beto, Iván, por estar siempre ahí dándome apoyo moral y sobre todo por creer que lo lograría, los quiero.

A mi familia por enseñarme a ser la persona que soy hoy, por estar orgullosos de mi como yo lo estoy de ustedes.

A la señora Xóchitl, por apoyarme siempre y alentar a superarme cada día, estoy en deuda con usted, ¡muchas gracias!

A mi mamá, por ser mi amiga y confidente, por enseñarme que con trabajo y constancia puedes lograr lo que te propongas, por todo el esfuerzo y amor que impulsaron mi camino, ¡gracias, mamá!

A Miguel por creer en mi capacidad y por apoyarme a cumplir mis sueños, por estar a mi lado y ser mi mano derecha, por toda la ayuda que me has brindado, por tu cariño y sacrificios.

Por último, a mis hijos, Erin y Edahí, gracias por ser mi principal motivación, espero ser un buen ejemplo para ustedes, los amo.

Resumen

La esteatohepatitis no alcohólica (NASH por sus siglas en inglés) está estrechamente relacionada con el síndrome metabólico (SM) y la obesidad, por lo que su prevalencia ha aumentado en la última década debido a la falta de una buena alimentación por parte de la población mundial. La NASH se caracteriza por la acumulación de lípidos en el hígado, la degeneración de los hepatocitos e inflamación lobular, los pacientes que padecen NASH tienen una mayor probabilidad de desarrollar fibrosis que los pacientes que únicamente padecen de hígado graso no alcohólico.

Por otra parte, diversos grupos de trabajo han desarrollado modelos experimentales dietarios para producir NASH, que se asemejan al desarrollo de la enfermedad en el ser humano, sin embargo, los costos de estas dietas son demasiado elevados y el tiempo para inducir la enfermedad se extiende a meses de tratamiento, por lo que muchas veces resulta complicado el usar este tipo de modelos.

Algunos estudios han demostrado que las dietas aterogénicas, que contienen altos porcentajes de colesterol, grasas y carbohidratos como la sacarosa, facilitan el desarrollo de NASH en roedores y se ha propuesto la utilización de inductores químicos que a dosis bajas podrían disminuir el tiempo de aparición de la enfermedad.

Es de suma importancia contar con un modelo que tenga similitud con lo que pasa en el ser humano, para posteriormente probar posibles tratamientos para NASH, una posibilidad serían los productos naturales, los cuales han ganado popularidad en los últimos años. El esteviósido es un glucósido diterpenoide que se encuentra presente en las hojas de la *Stevia rebaudiana* Bertoni, con reportes de actividad hipoglucemiante, antioxidante, antiinflamatoria, antifibrótica y anticancerígena, lo cual lo hace un candidato idóneo para probarse en un modelo de NASH.

El objetivo principal de este trabajo fue desarrollar un nuevo modelo de esteatohepatitis no alcohólica. Se probaron dos modelos, el primer modelo se caracterizó por una dieta líquida alta en grasas saturadas, fructosa y colesterol

utilizando al CCl_4 como inductor químico, donde se probó el posible efecto hepatoprotector del esteviósido, sin embargo, no se logró causar NASH en los animales, pero se observó un efecto antiesteatósico por parte del glucósido.

El segundo modelo se compuso de una dieta aterogénica, con alto contenido en colesterol, sacarosa, grasas y colato de sodio, utilizando nuevamente al CCl_4 como inductor químico, teniendo como resultado hepatomegalia, aumento en los marcadores de daño hepático, presencia de macrovesículas, degeneración de los hepatocitos, fibrosis incipiente, aumento de colesterol total y LDL y una elevación de la actividad de las metaloproteasas 2 y 9, lo que indica el desarrollo de NASH.

En conclusión, hemos desarrollado un nuevo modelo que reproduce NASH en ratas con características similares a la enfermedad en humanos, por lo que este modelo pudiera ser útil para evaluar distintos fármacos y entender con mayor claridad el desarrollo de NASH.

Abstract

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is closely related to metabolic syndrome and obesity, and its prevalence has increased in the last decade due to the lack of good nutrition. NASH is characterized by lipid accumulation in the liver, hepatocyte degeneration and lobular inflammation. Patients with NASH are more likely to develop fibrosis than patients with only non-alcoholic fatty liver.

On the other hand, various groups have developed experimental dietary models to produce NASH, which resemble the development of disease in humans, however, the costs of these diets are too high and the time to induce the disease extends to months of treatment, so it is often difficult to use such models.

Some studies have shown that atherogenic diets, which contain high percentages of cholesterol, fats, and carbohydrates such as sucrose, facilitate the development of NASH in rodents and the use of low doses of chemical inducers has been proposed to decrease the time of the onset of the disease.

It is very important to have a model that shares similar pathophysiology with humans NASH, to test possible treatments for NASH. Suitable treatment is the use of natural products, which have gained popularity in recent years. Stevioside is a diterpenoid glycoside that is present in the leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni, with reports of hypoglycemic, antioxidant, anti-inflammatory, anti-fibrotic and anti-cancer activity, which makes it an ideal candidate to be tested in a NASH model.

The main objective of this work was to develop a new model of non-alcoholic steatohepatitis. Two models were tested, the first model was characterized by a liquid diet high in saturated fats, fructose and cholesterol using CCl_4 as a chemical inducer, where the possible hepatoprotective effect of stevioside was tested, however, it was not possible to cause NASH in animals, but an antisteatotic effect was observed by the glycoside.

The second model was composed of an atherogenic diet, high in cholesterol, sucrose, fats and sodium cholate, using CCl_4 as a chemical inducer, resulting in hepatomegaly, increased markers of liver damage, presence of macrovesicles,

degeneration of the hepatocytes, incipient fibrosis, increase in total cholesterol and LDL and increase in the activity of metalloproteases 2 and 9, indicating the development of NASH.

In conclusion, we have developed a new model that reproduces NASH in rats with similar characteristics to the disease in humans, so this model could be useful to evaluate different drugs and to better understand the pathophysiology of NASH.

1 El hígado a través del tiempo

A través del tiempo, el hígado ha tenido diferentes significados para muchas civilizaciones ya sean místicos, religiosos y/o relacionados a pensamientos especulativos, todo esto resultado de la observación del cuerpo humano¹.

Nuestros ancestros primitivos consideraban al hígado como uno de los órganos más poderosos y ricos en sangre del cuerpo de los animales.

Entre los babilonios y los sumerios era muy común el analizar los cuerpos post-mortem, principalmente para poder tener una idea de lo que pudo haber acabado con la vida de la persona, mientras que los sacerdotes originarios de Mesopotamia adquirieron un amplio conocimiento en cuanto al color, tamaño y la estructura externa del órgano, principalmente de las ovejas, ya que eran los animales que comúnmente sacrificaban¹.

Los sumerios trataron de ejemplificar al hígado con figuras hechas de arcilla, además de que tenían artefactos para poder realizar hepatoscopías. En diversas excavaciones se encontraron estructuras cuneiformes con múltiples inscripciones que trataban de explicar tanto la anatomía como la morfología del hígado¹.



Figura 1. Modelo sumerio del hígado, 1700-1600 AC¹.

2 Anatomía del hígado

El hígado es un órgano que se encuentra dentro de la cavidad abdominal por debajo del diafragma, su color característico es café-rojizo y su peso es alrededor de 1.5 kg en los adultos, consta de 4 lóbulos de los que destacan principalmente el lóbulo derecho e izquierdo los cuales están divididos por el ligamento falciforme.

Este órgano es considerado como una glándula puesto que se encarga de sintetizar sustancias que son liberadas hacia el torrente sanguíneo por medio de la vena hepática².

El hígado se encuentra irrigado por dos principales vasos sanguíneos: la arteria hepática y la vena portal, mientras la arteria hepática aporta el oxígeno necesario a las células del órgano, la vena central se encarga de brindar los nutrientes para el correcto funcionamiento.

Por otra parte, la arteria hepática y la vena central no son las únicas estructuras presentes, junto con el ducto biliar forman la llamada triada portal, la síntesis de la bilis es llevada a cabo por los hepatocitos y posteriormente es depositada al tracto gastrointestinal por medio de estos tubos (Fig. 1).

2.1 Células hepáticas

Para poder realizar todas las funciones que lleva a cabo el hígado este se ayuda de diferentes células que conjuntamente trabajan para poder lograr la síntesis de proteínas, hormonas y se encargan del metabolismo de los nutrientes, xenobióticos, lípidos, así como también almacenar la glucosa en forma de glucógeno para su posterior aprovechamiento².

Las células que se encuentran en el hígado se dividen en dos principales grupos: las células parenquimatosas y las células no parenquimatosas, en el primer grupo se incluyen a los hepatocitos mientras que el segundo grupo está conformado por células endoteliales del sinusoides hepático (LSEC), células de Kupffer (KC), natural killer (NK) y las células estelares hepáticas (HSC).

Una manera de clasificar metabólicamente las estructuras internas del hígado es por medio del acino hepático que se caracteriza por su forma romboidal con una vena central en los extremos y una triada portal en el centro de la estructura.

La clasificación de las 3 principales zonas del acino hepático se lleva a cabo de acuerdo con la concentración de oxígeno y nutrientes. El gradiente de concentración mayor se encuentra en la zona 1 (Z1), que es la más cercana a la triada portal y seguida de la zona dos (Z2) donde disminuye la concentración y por último la zona 3 (Z3) con el menor gradiente de concentración (Fig. 1).

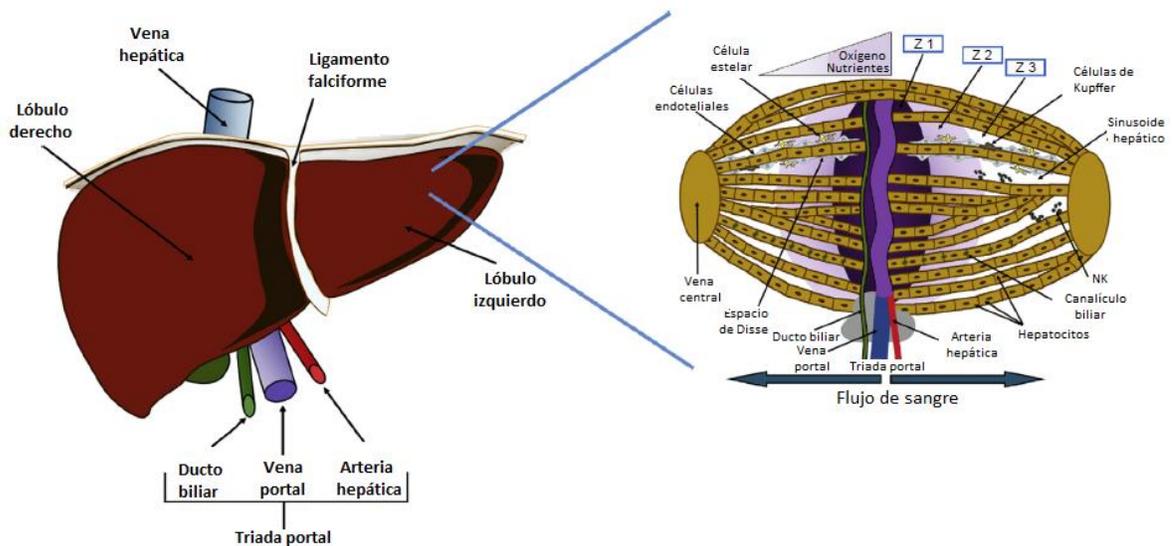


Figura 2. Estructuras del hígado (derecha), esquema del acino hepático (izquierda)².

2.2 Funciones metabólicas

Entre las funciones que lleva a cabo el hígado, destacan el metabolismo de los carbohidratos, aminoácidos y lípidos, así como la biosíntesis de colesterol y la regulación de éste, así como de proteínas que participan en la cascada de coagulación.

La glucosa que es ingerida en la dieta es almacenada en el hígado en forma de glucógeno, así cuando es requerida se puede aprovechar como energía. Por otra parte, en el hígado se lleva a cabo la reesterificación de los ácidos grasos libres lo cual da lugar a los triglicéridos que son transportados a través de las lipoproteínas hacia el resto del cuerpo, además el hígado se encarga de transformar a los aminoácidos para balancear las cantidades de nitrógeno en el organismo.

2.3 Patogénesis de la esteatohepatitis no alcohólica

El hígado puede ser dañado de diversas maneras, ya sea por medio del abuso en el consumo de etanol o por ciertos virus como el de la hepatitis. Sin embargo, recientemente ha surgido una epidemia de obesidad que a su vez vuelve más propensos a quienes la padecen a sufrir diversos padecimientos como la hipertensión arterial, diabetes mellitus y dislipidemias, favoreciendo el incremento de enfermedades relacionadas con el metabolismo, un ejemplo de esto es la esteatohepatitis no alcohólica (NASH por sus siglas en inglés), la cual es la forma severa de la esteatosis hepática³.

En 1981, Ludwig y colaboradores⁴ analizaron biopsias hepáticas de pacientes cuyo consumo de alcohol era nulo y los resultados arrojaban que tenían una enfermedad muy similar a la hepatitis alcohólica, por lo que decidieron nombrar a la enfermedad como NASH.

Takaki y colaboradores definen a NASH como la forma severa del hígado graso que se caracteriza por la presencia de esteatosis con inflamación y fibrosis progresiva, la cual, si no es tratada, puede conducir a cirrosis y/o a carcinoma hepatocelular³.

Han surgido diversas teorías para describir la progresión de NASH, una de ellas es la teoría del primer y segundo hit, la cual involucra primeramente a la esteatosis que es causada por la acumulación de triglicéridos en el hígado y posteriormente múltiples estímulos provocan la aparición de radicales libres produciendo un daño celular³.

Sin embargo, a pesar de que la teoría del primer hit y segundo hit es aceptada, diversos autores concuerdan que la teoría no es suficiente para explicar el desarrollo de NASH y que se deben englobar mecanismos metabólicos, inmunológicos, endócrinos y genéticos (Fig. 2)⁵.

Las diferentes teorías que tratan de explicar el desarrollo de NASH concuerdan en que los ácidos grasos libres son primordiales. Estos ácidos grasos libres son productos de la lipólisis de los triglicéridos que son liberados desde el tejido adiposo a través de la circulación sanguínea hacia el hígado⁶.

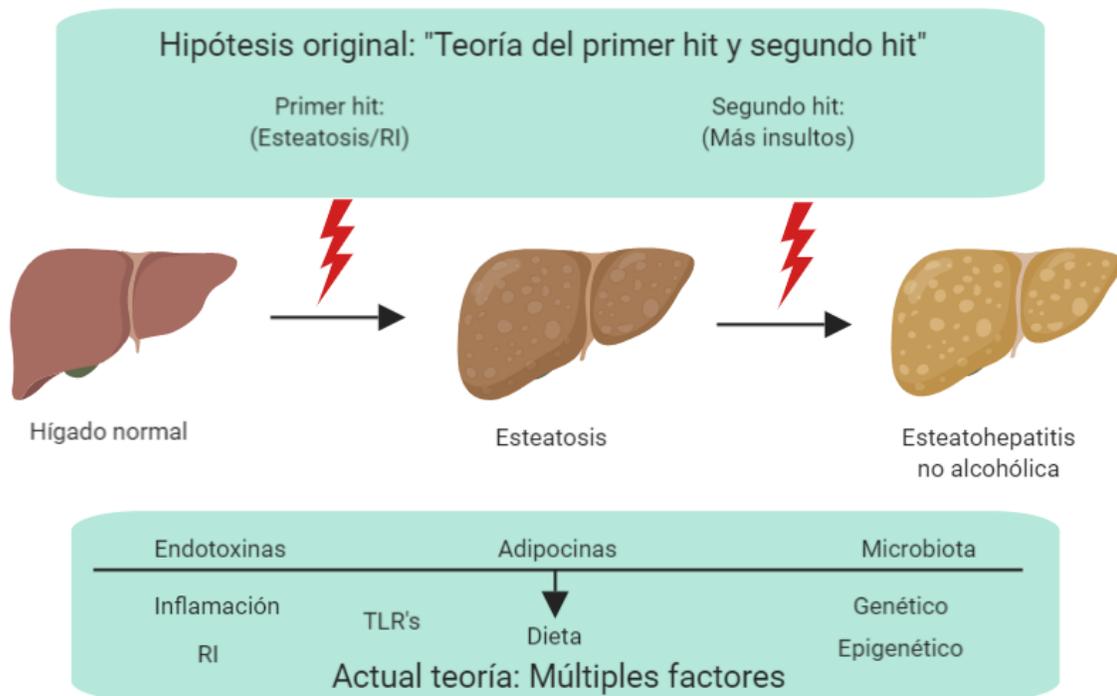


Figura 3. Patogénesis de la esteatohepatitis no alcohólica: de la teoría del primer y segundo hit a la teoría de múltiples factores⁷. RI: Resistencia a la insulina; TLR: Receptor tipo Toll.

La manera de diagnosticar NASH es por medio de una biopsia hepática, donde se realiza una evaluación histológica.

De acuerdo con los criterios establecidos por la Asociación Americana para el Estudio de Enfermedades del Hígado, se dice que el paciente tiene NASH si cumple con los siguientes puntos: 1: esteatosis macrovesicular con mayor presencia de las vesículas en la zona 3; 2: degeneración de los hepatocitos (hepatocitos en forma de balón); 3: infiltrado inflamatorio y cuerpos de Mallory-Denk; 4: fibrosis perisinusoidal y pericelular (Fig. 3)⁸.

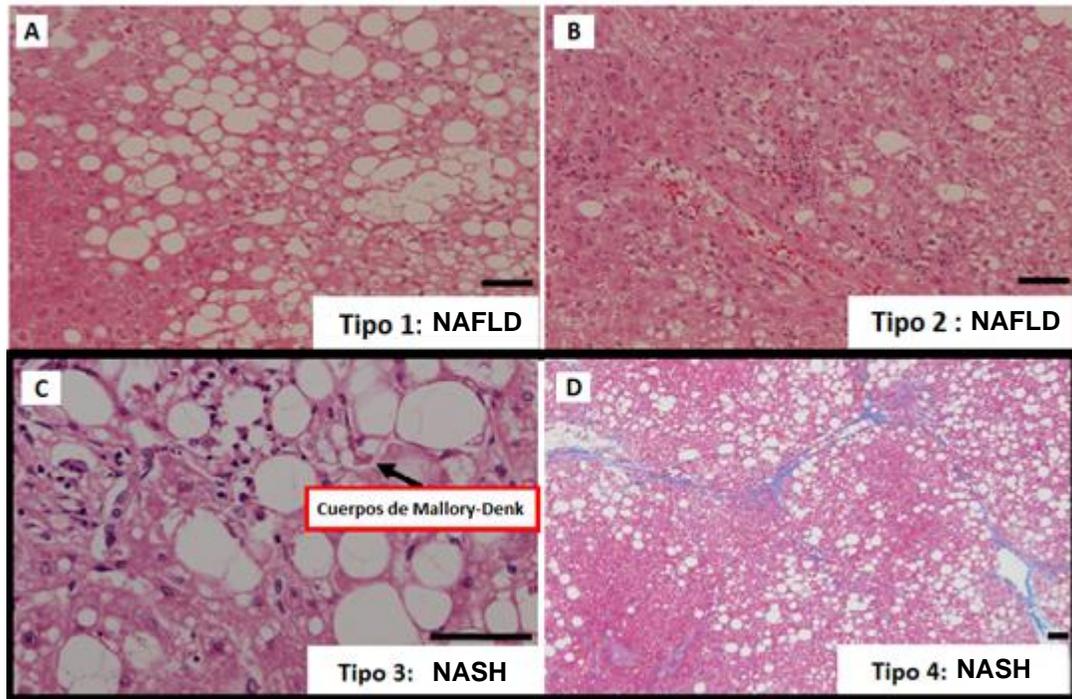


Figura 4. Representación histológica del desarrollo de la esteatohepatitis no alcohólica⁹. A. Tipo 1: Esteatosis; B. Tipo 2: Esteatosis con inflamación lobular; C. Tipo 3: Esteatosis con hepatocitos en forma de globo y cuerpos de Mallory-Denk; D. Tipo 4: Similar al tipo 3 con fibrosis. H&E. NAFLD: Hígado graso no alcohólico; NASH: Esteatohepatitis no alcohólica.

Un factor que comparten el hígado graso y NASH son los sustratos que se requieren para el metabolismo energético, en especial de los carbohidratos y los ácidos grasos, cuando estos sustratos se encuentran en cantidades exageradas se favorece la acumulación de lípidos tóxicos⁶.

Cuando la β -oxidación y la formación de triglicéridos no es suficiente para la eliminación de los ácidos grasos libres que se encuentran dentro del hepatocito, se favorece la aparición de lípidos tóxicos, principalmente derivados del diacilglicerol y las ceramidas. Esto causa una inestabilidad en el hígado favoreciendo el estrés en el retículo endoplásmico, estrés oxidante y la activación del inflammasoma⁶.

Por otra parte, la resistencia a la insulina es un factor de riesgo para el desarrollo de NASH ya que cuando esta se presenta existe un desbalance en la lipólisis y se liberan en exceso ácidos grasos en el hígado⁶.

La patogénesis de NASH comienza cuando los triglicéridos son transportados del torrente sanguíneo hacia el hígado dónde posteriormente sufren una reacción de lipólisis en el tejido adiposo hepático, favoreciendo la aparición y el ingreso de ácidos grasos libres a los hepatocitos.

Por otra parte, se aumenta la síntesis de ácidos grasos a partir de glucosa y fructosa por medio de la lipogénesis, que tiene como principal objetivo el producir lípidos para su almacenamiento ya que estos proveen de mayor energía al organismo que los mismos carbohidratos¹⁰.

Por otra parte, existen diversos factores de transcripción involucrados en la lipogénesis, donde prevalece una disminución en la expresión de la proteína 1c de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP-1c) y la actividad de la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP)¹⁰.

La lipogénesis que se lleva a cabo en el hígado es inducida por la insulina y la glucosa ya que activan a SREBP-1c y a ChREBP, dentro de esta vía existe un receptor muy importante, el receptor hepático X (LXR), el cual promueve la síntesis de ácidos grasos gracias a la inducción de SREBP-1c.

Por otra parte, los genes ACC (acetil-CoA carboxilasa), SCD-1 (estearoil-CoA desaturasa) y FAS (sintasa de ácidos grasos), son activados por los factores de transcripción anteriormente mencionados, mientras que PPAR- γ (receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma) contribuye mediante la expresión de genes que se encuentran en adipocitos como la adiposina y la adiponectina¹⁰ (Fig. 4).

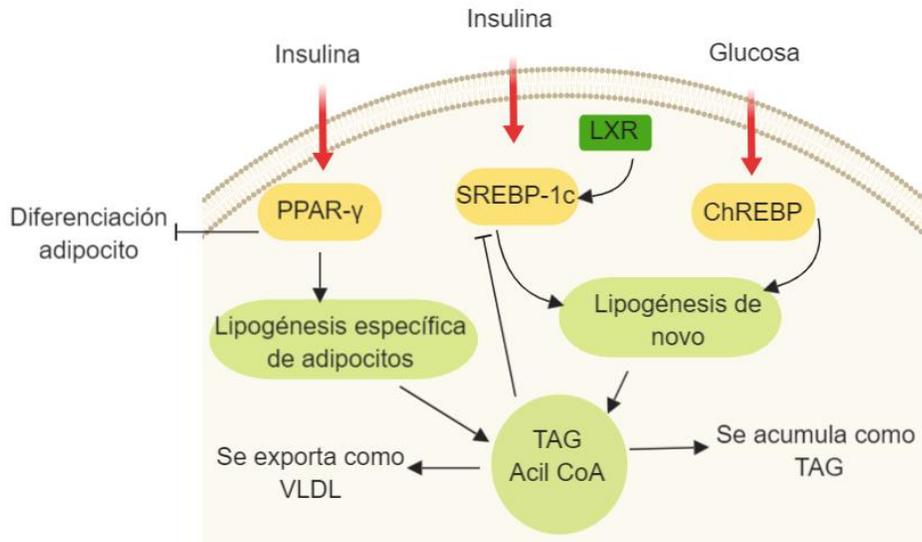


Figura 5. Lipogénesis *de novo* en hígado¹⁰. LXR: Receptor hepático X, PPAR- γ : Receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma, SREBP-1c: proteína 1c de unión al elemento regulador de esteroides, ChREBP: proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos, TAG: Triacilglicerol, VLDL: Lipoproteína de muy baja densidad.

Una vez que los ácidos grasos se encuentran dentro del hepatocito estos pueden seguir diversos caminos. Uno es que participen en la β - oxidación, tanto en las mitocondrias como en los peroxisomas, otro camino es el generar lípidos tóxicos como el diacilglicerol, derivados de la lisofostatidilcolina o las ceramidas. Por último, una ruta alterna es que los ácidos grasos libres se reesterifiquen para transformarse nuevamente en triglicéridos y ser almacenados, ya sea en gotas lipídicas dentro de los hepatocitos o ser transportados hacia la circulación sanguínea por medio de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL).

Es importante hacer énfasis en los lípidos tóxicos ya que son capaces de causar estrés en el retículo endoplásmico, formar radicales libres que a su vez generan estrés oxidante y la activación de una plataforma involucrada en la formación de interleucinas mejor conocida como inflammasoma.

Estos radicales libres finalmente provocan apoptosis o necrosis en los hepatocitos y a su vez favorecen la secreción de citocinas proinflamatorias como las interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF- α y TGF- β , las cuales se ha reportado que son capaces de activar a las HSCs (células estelares) cambiando su fenotipo y siendo

capaces de sintetizar MEC (matriz extracelular) que es un mecanismo importante en el desarrollo de la fibrosis hepática.

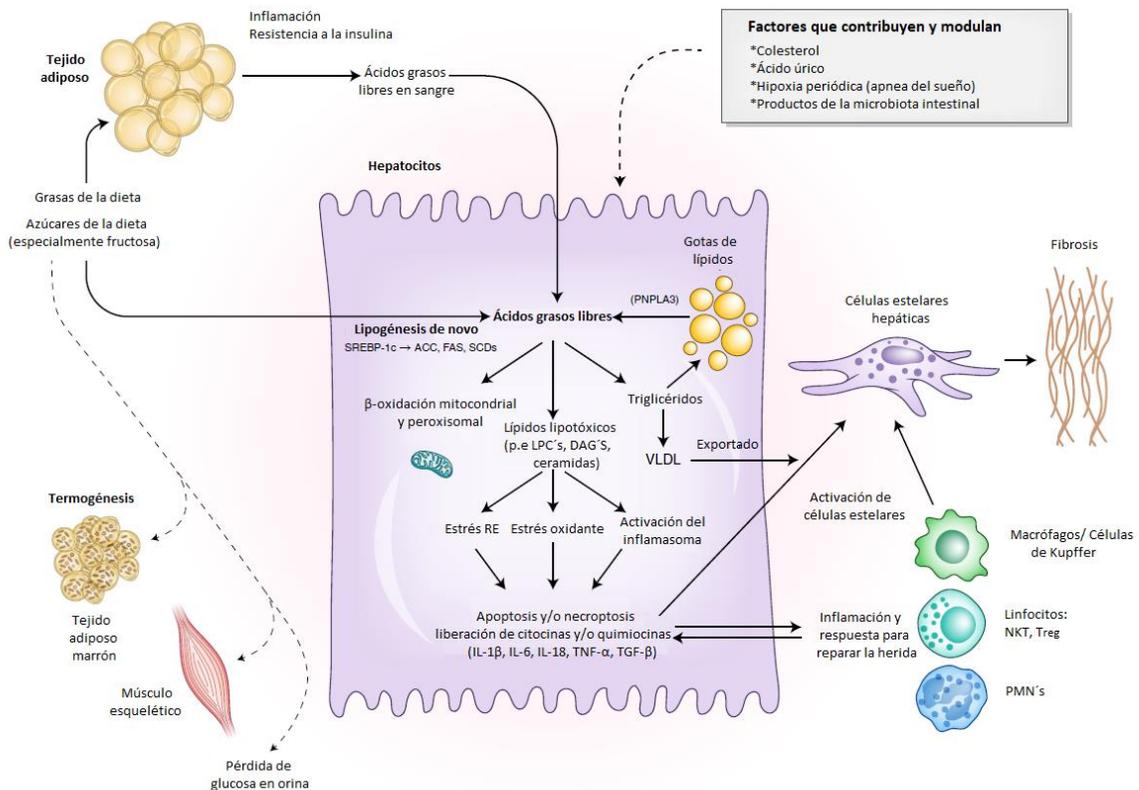


Figura 6. Desarrollo de la esteatohepatitis no alcohólica⁶. SREBP-1c: proteína 1c de unión al elemento regulador de esteroides; ACC: acetil CoA carboxilasa; FAS: sintasa de ácidos grasos; SCDs: Esteroil CoA desaturasa; PNPLA3: gen 3 que contiene el dominio fosfolipasa de tipo patatina; LPC's: lipopolisacáridos; DAG's: diacilglicérolos; VLDL: lipoproteína de muy baja densidad; IL-1 β : interleucina 1 beta; IL-6: interleucina 6; TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa; TGF- β : factor de crecimiento transformante beta; NKT: célula T natural killer; Treg: linfocito T regulador; PMN's: polimorfonucleares.

2.4 Modelos de esteatohepatitis no alcohólica

En la actualidad hay diversos tipos de modelos para causar NASH, pero entre las desventajas que tienen es por ejemplo el tiempo de tratamiento de los animales es extenso, lo cual conlleva a que sean modelos altamente costosos.

Se dice que existen dos tipos de modelos para producir NASH, los modelos *in vitro* y los modelos *in vivo*, los primeros utilizan hepatocitos a los cuales se les adiciona

ácido palmítico, este tipo de modelo se utiliza principalmente para evaluar la toxicidad de posibles fármacos, así como para analizar el transcriptoma.

Una de las desventajas que presenta el modelo *in vitro* es que únicamente se obtienen resultados del microambiente al que están expuestos los grupos de células, pero no muestra realmente lo que puede pasar en todo el organismo¹¹.

A pesar de que los modelos celulares están aprobados es recomendable utilizar un modelo animal lo más similar al humano, sobre todo, que la patogenia de la enfermedad en los animales tenga las mismas etapas y características que en el humano.

A su vez, los modelos *in vivo* se pueden dividir en tres importantes campos: modelos genéticos, modelos dietarios y la combinación de ambos.

2.4.1 Modelos genéticos

En cuanto a los modelos genéticos, los más comunes son los ratones *ob/ob*, que presentan una deficiencia de leptina, estos desarrollan resistencia a la insulina y una esteatosis hepática importante, sin embargo, no desarrollan fibrosis, por lo tanto, es necesario un segundo insulto para la progresión de la enfermedad, por ejemplo, el LPS (lipopolisacárido)¹².

Otro tipo de modelo genético es el de los ratones deficientes del receptor de la leptina, denominados *db/db*, los animales desarrollan intolerancia a la glucosa, obesidad y acumulación de lípidos en el hígado, pero al igual que el modelo anterior necesita de un segundo insulto para desarrollar fibrosis, en este caso se usan dietas altas en azúcares y grasas¹³.

Las ratas Zucker (*fa/fa*) son un tipo de animales genéticamente obesos, por lo cual no es necesario el uso de dietas para producir la obesidad, sin embargo, a pesar de que desarrollan resistencia a la insulina y esteatosis no presentan una fibrosis severa¹⁴.

El último ejemplo de los modelos genéticos son los animales con una alteración en SREBP-1c, una proteína que se sobre expresa específicamente en los hepatocitos, dando lugar a la resistencia a la insulina, esteatosis hepática y esteatohepatitis con estrés oxidante después de 30 semanas¹⁵.

2.4.2 Modelos dietarios

Como se mencionó anteriormente, los modelos dietarios forman parte de la subdivisión de los tres tipos de modelos para desarrollar experimentalmente NASH, a continuación, se mencionan algunos ejemplos.

Las dietas deficientes de metionina y colina se caracterizan por tener un aumento significativo en el contenido de grasas y sacarosa, además como su nombre lo indica tienen deficiencia en metionina y colina. El objetivo de esta dieta es provocar NASH en un tiempo no mayor a 4 semanas, sin embargo, ha sido muy criticada ya que los animales no presentan resistencia a la insulina, el cual es un signo característico en los humanos que padecen NASH, por otra parte, se asemeja a la condición en que se encuentran las mujeres embarazadas¹⁶.

Otro tipo de dieta es la denominada dieta alta en grasas, fructosa y colesterol, que tiene una composición de 40% de grasas (de las cuales el 18% son grasas trans), 22% de fructosa y 2% de colesterol, esta dieta es administrada durante 30 semanas para que se puedan observar histológicamente las etapas de NASH¹⁷.

2.4.3 Combinación de modelos

Actualmente, con la finalidad de disminuir el tiempo de inducción de NASH, se ha optado por la combinación de modelos genéticos y dietarios⁶. Por otra parte, a pesar de disminuir drásticamente el número de semanas para desarrollar la enfermedad en diferentes especies de animales, los gastos siguen siendo elevados, provocando que no todos los grupos de investigación los tomen como una opción, a continuación, se describen ejemplos de la combinación de modelos.

El modelo STAM se caracteriza por la administración de estreptozotocina en conjunto con una dieta alta en grasas, se describe que a las 20 semanas los animales desarrollan NASH con una fibrosis media y en algunas ocasiones desarrollan HCC (carcinoma hepatocelular)¹⁸.

En el año 2018, Tsuchida y colaboradores¹¹ describieron un nuevo modelo donde administraron la dieta tipo western la cual contiene una gran cantidad de grasas, fructosa y colesterol además de administrar una dosis baja de tetracloruro de

carbono una vez por semana, se reportó que a la semana 12 los animales desarrollaron cirrosis y a las 24 semanas HCC.

Es de suma importancia el contar con un modelo que induzca NASH en un corto periodo y que sea rentable, para poder entender completamente como se lleva a cabo el desarrollo de este padecimiento y probar los posibles fármacos que puedan ayudar al tratamiento de esta enfermedad.

2.5 Las plantas medicinales

México se ha caracterizado por el uso de plantas medicinales desde mucho tiempo antes de la conquista española, las culturas que practicaban esta costumbre eran, por mencionar a algunas, los mayas, los aztecas e inclusive culturas centroamericanas como los incas. Por fortuna, estas prácticas se fueron transmitiendo a las siguientes generaciones, las cuales conocían desde cómo curar un simple dolor de cabeza hasta la fiebre o la inflamación como lo indica el códice Badiano (Fig. 7)¹⁹.

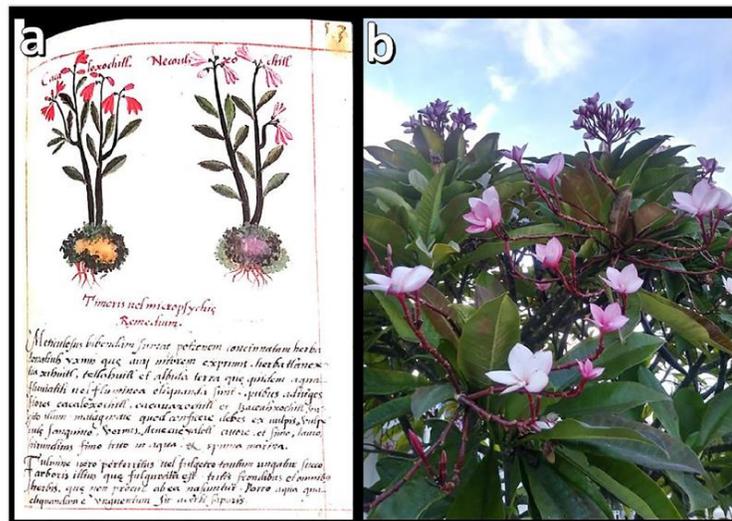


Figura 7. Documentos que respaldan el uso de plantas medicinales para el tratamiento de diversos síntomas. a) Página 53 del códice Badiano, ilustrando la planta conocida como “Cacaloxochitl”, b) *Plumeria rubra* L. (Apocynaceae)²⁰.

A pesar de la controversia en el uso de plantas medicinales como tratamiento para diversas enfermedades, se ha demostrado que los metabolitos secundarios poseen tanto efectos benéficos como efectos adversos y algunos han contribuido al desarrollo de medicamentos²¹.

Por otra parte, es necesario que se estudien con mayor profundidad los efectos secundarios de las plantas medicinales, ya que es muy común que algunas personas presenten algún tipo de toxicidad por lo cual se prefiere la identificación del compuesto activo para su posterior aislamiento y utilización en su forma pura.

La *Stevia rebaudiana* Bertoni es un ejemplo de planta medicinal, la cual se sabe que posee diversos efectos favorables para la salud por su actividad hiperglucemiante, antihipertensiva, antimicrobiana, antiinflamatoria entre otras, la cual la hace una candidata para poder tratar enfermedades relacionadas con el metabolismo.

2.6 La *Stevia rebaudiana* Bertoni

La *Stevia rebaudiana* Bertoni es una planta perenne perteneciente a la familia *Asteraceae*, originaria de Paraguay, sus hojas fueron utilizadas tradicionalmente por los nativos para endulzar sus bebidas²².

La estevia fue descrita botánicamente por Moisés Santiago Bertoni en 1899, inicialmente fue llamada *Eupatorium rebaudianum* y en 1905 se renombró como *Stevia rebaudiana* (Bertoni)²³.

Esta planta crece alrededor de 1 metro de altura, sus hojas tienen una longitud alrededor de 3-4 cm, sus flores son pequeñas y blancas con tonos púrpuras²³ (Fig 8).



Figura 8. Esquema de la *Stevia rebaudiana* Bertoni²³.

A pesar de ser una planta originaria de Sudamérica su cultivo ha ganado terreno en México, esta planta es conocida por sus propiedades hipoglucémicas que ayudan al control de la glucosa en pacientes diabéticos.

La especie *rebaudiana* es una de las especies que producen glicósidos del esteviol y uno de los 154 miembros que pertenecen al género *Stevia*, se ha reportado que en sus hojas se encuentran diversos metabolitos secundarios como flavonoides, alcaloides, ácido hidrocínámico, ácido cafeico y ácido clorogénico, taninos y glicósidos de esteviol como lo son el esteviósido y el rebaudiósido²².

2.7 El esteviósido

Entre los metabolitos secundarios que posee esta planta se encuentra el esteviósido, que según la definición dada por la OMS en el año 2000, “el esteviósido es un glicósido diterpenoide derivado del esteviol (ácido ent-1,3-hidroxikaur-1,6-en-19, oico)” (Fig. 9).

Este metabolito es altamente hidrosoluble y en su estructura contiene esteviol con tres moléculas de glucosa unidas a este anillo (Fig. 10), existen múltiples reportes de los beneficios que confiere el consumo de este metabolito (Tabla 1).

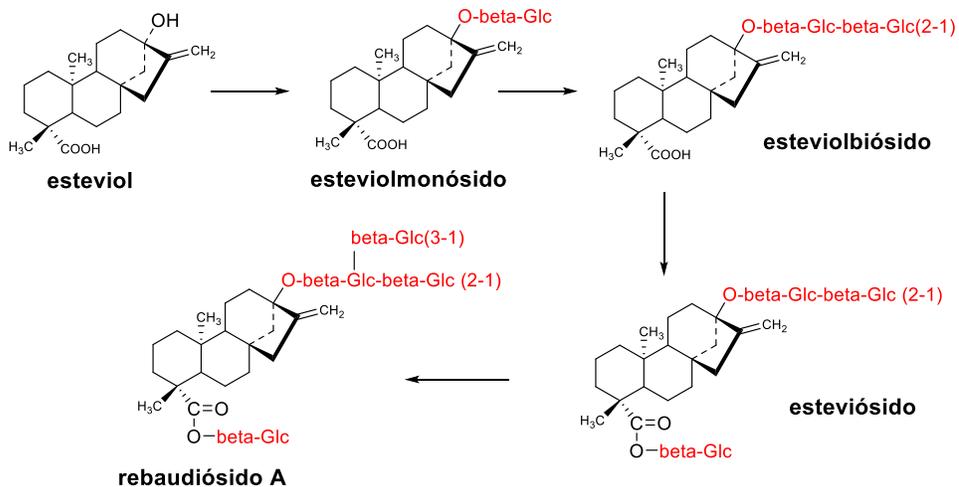


Figura 9. Transglicosilación del esteviol para dar lugar a esteviolmonósido, esteviolbiósido, esteviósido y rebaudiósido A. En rojo se muestran los grupos funcionales que cambian durante la biosíntesis²⁴.

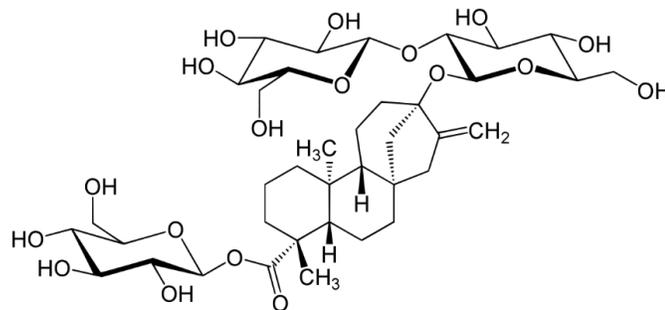


Figura 10. Estructura del esteviósido.

Una característica muy interesante del esteviósido es que es 300 veces más dulce que la sacarosa, no sufre fermentación y es estable a los cambios de pH. El consumo de esta molécula no induce la respuesta glucémica, es decir no aumenta los niveles de glucosa en la sangre, por lo cual lo hace un excelente candidato para endulzar las bebidas de personas que padecen diabetes mellitus.

Tabla 1. Efectos benéficos del esteviósido²⁵.

Efectos	Referencia
Efecto antihiperглиcémico (disminución de los niveles de la glucosa en la sangre)	26
Efecto antidiarreico	27; 28
Efecto antiinflamatorio	29
Propiedades vasodilatadoras	30; 31; 32
Favorece la disminución de colesterol, triglicéridos y lipoproteínas de baja densidad	33; 34
Antioxidante natural	35
Potencia el metabolismo de la glucosa	36

Por otra parte, según los datos ya reportados, el esteviósido tiene una baja absorción en el intestino, es completamente degradado por la microflora intestinal y la distribución se da una vez que la molécula ha sido hidrolizada, la acumulación es máxima en el hígado, los riñones y el intestino³⁷.

El metabolismo del esteviósido ocurre principalmente en el hígado, la fase I involucra al citocromo P450 y en la fase dos ocurre la conjugación del esteviósido con el glucorónido³⁸.

2.7.1 Efecto antihiperглиcémico

La diabetes se ha descrito como una enfermedad metabólica de tipo crónico, esta enfermedad ocurre debido a ciertas anomalías en la insulina, desde su secreción de las células β pancreáticas hasta la insensibilidad por parte de los receptores. Por otra parte, se ha propuesto tanto al esteviósido, así como a los

extractos de la estevia como posibles tratamientos para los pacientes diabéticos por su actividad sobre los niveles de glucosa en la sangre³⁹.

El mecanismo de acción por el cual se ha descrito la actividad del esteviósido es por la estimulación de las células β del páncreas, así como el aumento de la sensibilidad a la insulina únicamente en niveles elevados de glucosa²⁶.

Otros reportes indican que el esteviósido favorece la expresión de ciertas proteínas como PPAR γ , esteroil-CoA desaturasa y la carnitina palmitoiltransferasa, las cuales tienen efecto sobre el glucagón, es decir disminuyen la liberación de glucagón que a su vez disminuye la producción de glucosa por parte del hígado⁴⁰.

2.7.2 Actividad antioxidante

El mecanismo de daño por radicales libres es uno de los mecanismos moleculares implicados en diversos procesos patológicos y por los cuales las células pueden sufrir apoptosis⁴¹.

Se define a un radical libre como una especie química, la cual es altamente reactiva por tener un único electrón en su orbital externo, lo cual lo hace inestable y susceptible a reaccionar con moléculas de naturaleza orgánica o inorgánica para poder estabilizarse⁴².

Los radicales libres están altamente implicados en procesos inflamatorios, ya que atacan principalmente a las membranas de los hepatocitos. Cuando hay estrés oxidante se favorece la secreción de citocinas por parte de las células inmunitarias presentes en el hígado, que posteriormente activan a las células estelares y comienzan los procesos fibrogénicos con la síntesis de matriz extracelular, un punto importante en el desarrollo de fibrosis hepática⁴³.

Los macrófagos activados son los encargados de seguir produciendo radicales libres como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el óxido nítrico (NO) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2)⁴³.

La actividad antioxidante del esteviósido va más allá de la capacidad resonante en su estructura química, favoreciendo al equilibrio redox en el organismo debido a la actividad sobre el Nrf2 (factor nuclear relacionado al eritroide 2), es decir, favorece

la síntesis de moléculas antioxidantes como el glutatión, la SOD (superóxido dismutasa), la CAT (catalasa), la GPx (glutatión peroxidasa) entre otras⁴³.

3. Justificación

Actualmente México ocupa uno de los primeros lugares en obesidad a nivel mundial debido al estilo de vida sedentario y a la alimentación desbalanceada, lo que aumenta el riesgo de padecer enfermedades hepáticas como la esteatohepatitis no alcohólica.

Debido a que no existe un tratamiento específico para las hepatopatías causadas por la mala alimentación se pretende evaluar al esteviósido como posible tratamiento para el daño hepático inducido con una dieta alta en grasas, colesterol y fructosa teniendo como potenciador al CCl₄.

4. Hipótesis

Si se sabe que el esteviósido tiene actividad antiinflamatoria, hipoglucemiante y antioxidante se espera que la administración de este glucósido disminuya el estrés oxidante y la inflamación, fungiendo como un agente hepatoprotector en un modelo experimental de esteatohepatitis no alcohólica.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Desarrollar un nuevo modelo experimental de hígado graso no alcohólico inducido con una dieta aterogénica líquida y un nuevo modelo de esteatohepatitis no alcohólica inducida con una dieta aterogénica, en ambos casos utilizando al CCl₄ como potenciador químico y probar el posible efecto farmacológico del esteviósido.

5.2 Objetivos particulares

- Desarrollar un nuevo modelo de hígado graso no alcohólico inducido con una dieta alta en grasas saturadas, colesterol, fructosa y CCl₄.
- Evaluar los efectos benéficos del esteviósido en el nuevo modelo de hígado graso no alcohólico.
- Desarrollar un modelo de esteatohepatitis no alcohólica inducida con una dieta aterogénica y CCl₄ y caracterizarlo.

6. Metodología

6.1 Animales de experimentación

Se utilizaron ratas Wistar macho para el modelo de esteatohepatitis no alcohólica, éstas fueron proporcionadas por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN).

Los animales tenían un peso inicial de 100 ± 20 g, se mantuvieron en jaulas con libre acceso al agua y alimento, así como con condiciones controladas (22 ± 2 °C, con una humedad relativa del 50-60% y ciclos de luz-oscuridad de 12 h). Todas las ratas en la semana de adecuamiento fueron alimentadas con LABDIET® y agua *ad libitum*.

Todos los experimentos se realizaron siguiendo los lineamientos éticos para la investigación en animales de experimentación, en cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana “Especificaciones Técnicas para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio” NOM-062-ZOO-1999⁴⁴.

6.2 Reactivos y materiales

El esteviósido (STV), la hematoxilina, la BSA, la cloramina-T, el ácido tiobarbitúrico, la L- γ -glutamil-p-nitroanilina, el p-dimetilaminobenzaldehído y el p-nitrofenilfosfato fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Se utilizó CCl₄ de la marca J.T Baker (Ciudad de México, México), por último, el petrolato usado como vehículo fue de la marca High Purity (Ciudad de México, México).

Para la dieta líquida aterogénica, las grasas saturadas fueron proporcionadas por el aceite de coco de la marca LouAna, por otra parte, la fructosa de la marca “Savien” fue utilizada para hacer la solución de fructosa al 40%.

Por otra parte, para el modelo de NASH, se utilizó colato de sodio hidratado y colesterol (>92.5% de pureza) de la marca Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), la sacarosa fue adquirida de la marca Zulka®, la mantequilla utilizada en este estudio fue de la marca Gloria® y, por último, la caseína fue adquirida de la marca Rennet.

6.3 Modelo de hígado graso no alcohólico

Este experimento se llevó a cabo en un cuarto aislado del ruido a temperatura ambiente. Se formaron cuatro grupos de animales con una n de ocho cada uno distribuidos aleatoriamente. Los grupos formados se colocaron en 16 jaulas, las cuales contenían tres ratas cada una, los animales en cuestión tuvieron un periodo de adaptación de una semana antes de iniciarse el experimento.

Una vez transcurrido el tiempo de adaptación, las ratas se pesaron y se registró su peso inicial y se procedieron a administrar como se indica a continuación.

La dieta líquida aterogénica se realizó según diversos reportes y se resume en la tabla 2, la dieta se utilizó para alimentar intragástricamente a los grupos denominados “Dieta”, “Dieta + CCl₄” y “Dieta + CCl₄ + STV”, además de la administración de una dosis semanal de 400 mg/kg de CCl₄ durante 16 semanas al grupo de “Dieta + CCl₄” y al control de CCl₄, el efecto farmacológico del esteviósido se probó con la administración de una dosis de 20 mg/kg cada 12 h a los grupos “Dieta + CCl₄ + STV” y “STV”, mientras que al grupo denominado como “control” fue administrado únicamente con petrolato.

Tabla 2. Composición de la dieta líquida aterogénica.

Contenido	Porcentaje (100 g)
Grasas saturadas	58.7
Fructosa	20
Colesterol	1.3
Proteínas	20

Una vez concluidas las 16 semanas de experimentación, los animales fueron sacrificados por medio de una mezcla de xilacina (100 mg/Kg) / ketamina (8 mg/Kg) administrada por vía intraperitoneal.

Se recolectó sangre por punción intracardiaca, se extirpó el hígado y se mantuvo a una temperatura de -70°C para posteriores estudios.

6.4 Análisis de la esteatosis

Posterior a la eutanasia de los animales, se recolectó el hígado y se pesó, las muestras de hígado se cortaron y se fijaron en formaldehído, se procesó rutinariamente para la incrustación con parafina, en cortes de 50 y 100 μm , se tiñeron con hematoxilina-eosina y se examinaron por microscopía óptica estándar, para verificar si existía algún cambio en el parénquima hepático, mientras que para medir la cantidad de lípidos almacenados en vesículas se utilizó la tinción de rojo oleoso, las histologías posteriormente se analizaron con Image J para graficar la cantidad de color y número de micro y macro vesículas que se encuentra en cada imagen.

6.5 Determinación de marcadores de daño hepático

Al momento de realizar la eutanasia a las ratas se sustrajo el hígado y se tomaron muestras de sangre por punción cardiaca.

De las muestras sanguíneas se obtuvo suero para medir las siguientes enzimas: fosfatasa alcalina (FA), gamma-glutamil transpeptidasa (γ -GTP) y alanina

aminotransferasa (ALT), mientras que las muestras de hígado se emplearon para cuantificar glutatión reducido (GSH), el glucógeno, la peroxidación lipídica, actividad de proteasas, así como histologías con diferentes técnicas de tinción.

Para cada determinación se realizó una curva de calibración, las reacciones se llevaron a cabo por duplicado.

6.6 Análisis estadístico

Todas las pruebas se realizaron por duplicado con una n de ocho para las pruebas bioquímicas y actividad enzimática, mientras que para el análisis histológico se consideró una n de tres, todos los resultados obtenidos al término del experimento se expresaron como el promedio \pm el error estándar.

Los valores correspondientes al peso corporal en función del tiempo se les realizó un análisis estadístico ANOVA bifactorial de medidas repetidas, seguida de una prueba de confianza de Tukey indicando una diferencia significativa cuando $p \leq 0.05$.

Mientras que a los valores de marcadores de daño hepático y dislipidemias se les realizó un ANOVA unifactorial con una prueba de confianza de Tukey considerando una diferencia significativa cuando $p \leq 0.05$.

6.6.1 Determinación de la actividad de la alanina aminotransferasa

Cuando el organismo está funcionando adecuadamente la enzima ALT se encuentra localizada en el citoplasma de los hepatocitos, aunque se puede encontrar en menor cantidad tanto en los riñones, corazón, así como en los músculos.

Cuando se produce muerte celular como en el caso de los hepatocitos, la ALT se encuentra en mayor cantidad en el sistema circulatorio, es por eso que nos permite medir la posible ruptura celular o la permeabilidad de la membrana.

La actividad de la enzima alanina aminotransferasa se determinó por el método de Reitman y Frankel⁴⁵, el cual consiste en medir el complejo colorido que se forma al ponerse en contacto el piruvato y la 2,4 dinitrofenilhidrazina (2,4 DNPH), este complejo se lee a 515 nm. El fundamento del presente método consiste en la transferencia del grupo amino de la alanina al α -cetoglutarato, al finalizar la reacción los productos generados son L-glutamato y piruvato, estos compuestos en presencia de 2,4 dinitrofenilhidrazina forman 2,4 fenilhidrazona un derivado colorido el cual su concentración es proporcional a la actividad de la ALT y se cuantifica espectrofotométricamente a 515 nm.

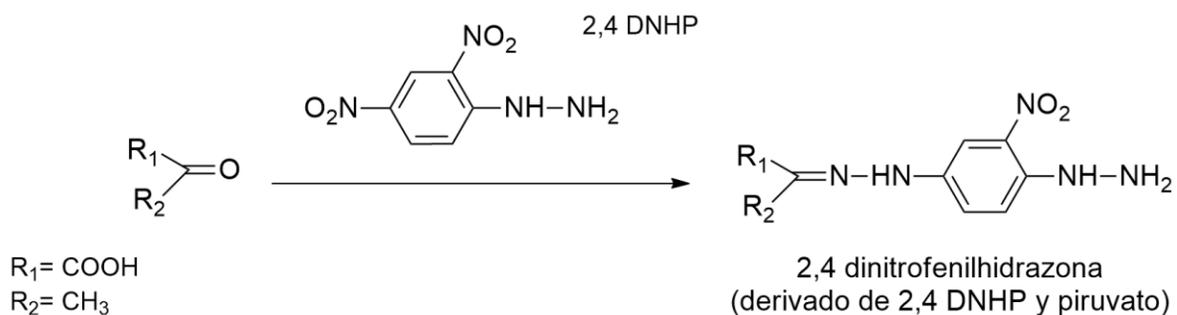


Figura 11. Obtención de la 2,4-dinitrofenilhidrazona a partir de la reacción del piruvato y la 2,4-DNHP.

Se realizó de la siguiente manera de acuerdo con la siguiente tabla, en tubos de ensaye previamente etiquetados:

	Blanco (mL)	Muestra (mL)
1.- Solución de sustrato	0.25	0.25
2.- Suero problema	---	0.05
3.- Se mezcló y agitó suavemente, se incubó a 37°C durante 60 min		
4.- Reactivo cromógeno	0.25	0.25
5.- Suero problema	0.05	---
6.- Se incubó a 37 °C durante 15 min		
7.- NaOH 0.4 N	2.5	2.5
8.- Se leyeron a 515 nm		

6.6.2 Curva de calibración de la alanina aminotransferasa

Tabla 3. Curva de calibración de la ALT

Reactivos	Tubo No.						
	1	2	3	4	5	6	7
Sol. Sustrato (μl)	250	225	200	175	150	125	100
Sol. estándar de piruvato (μl)	---	25	50	75	100	125	150
Buffer de fosfatos (μl)	50	50	50	50	50	50	50
Reactivo cromógeno (μl)	250	250	250	250	250	250	250
NaOH (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
$\mu\text{moles de piruvato}$	---	0.025	0.05	0.075	0.1	0.125	0.150

Reactivos:

Buffer de fosfatos 0.1 M, pH 7.4: Mezclar 840 ml de solución 0.1 M de fosfato disódico con 160 ml de solución 0.1 M de fosfato monopotásico.

Solución de sustrato: Disolver 1.78 g de D/l alanina y 30 mg de ácido α -oxoglutarico en solución buffer, añadir 0.5 ml de NaOH (1 N) y completar hasta 100 ml con solución buffer. Conservar a 4°C.

Reactivo cromógeno: Disolver 200 mg de 2,4-dinitrofenilhidrazina en ácido HCl (1 N) caliente y completar hasta un litro con HCl 1N, para obtener una solución 1mM.

Solución estándar de piruvato: (1 $\mu\text{mol/ml}$) Disolver 11 mg de piruvato sódico en 100 ml de solución buffer. Se prepara el mismo día que se utiliza.

Leer a 515 nm.

6.6.3 Determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina

Procedimiento:

1. 0.25 ml de buffer de glicina 0.1 M-MgCl₂ 1 mM, pH 10.5.
2. 0.25 ml de sustrato p-nitrofenilfosfato.
3. Colocar en baño maría a 37°C por 5 minutos.
4. Añadir 50 µl de la muestra, mezclar suavemente.
5. Incubar 30 minutos a 37° C.
6. Para la reacción con 5 ml de NaOH 0.02 N, agitar por inversión.
7. Leer absorbancia a 410 nm.

Nota: El blanco es idéntico, pero colocar 50 µl de agua en lugar de muestra.

Preparación del sustrato: 100 mg de p-nitrofenilfosfato disódico en 25 ml de agua (es estable durante 4 semanas en congelación).

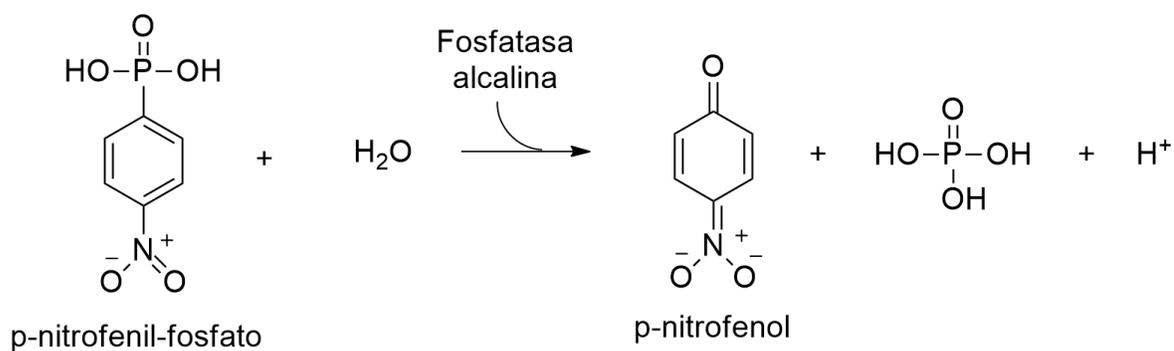


Figura 12. Formación de p-nitrofenol a partir del p-nitrofenilfosfato.

6.6.4 Curva estándar de la fosfatasa alcalina

Tabla 4. Curva estándar para la fosfatasa alcalina

Curva estándar para la fosfatasa alcalina			
Tubo	Solución 2 (ml)	Solución 3 (ml)	Sustrato hidrolizado (μmoles)
1	0.5	5	0.025
2	1.0	4.5	0.050
3	2.0	3.5	0.10
4	3.0	2.5	0.15
5	4.0	1.5	0.20
6	5.0	0.5	0.25
Los tubos se leen a 410 nm.			

Soluciones:

1. p-nitrofenol solución estándar de 10 μ moles/ml
2. 0.5 ml de **solución 1**, estándar de p-nitrofenol llevado a 100 ml con NaOH 0.02 N.
3. NaOH 0.02 N.

Nota: el blanco se hace 5.5 ml de la solución 3 y leer a 410 nm.

6.6.5 Determinación de la actividad de la gamma-glutamyl transpeptidasa

La γ -GTP es una enzima localizada en la membrana canalicular del hepatocito, se destaca su presencia en el organismo principalmente en las vesículas seminales y el cerebro, cuando hay una obstrucción de las vías biliares esta puede aumentar significativamente, así como en casos de pancreatitis, sin embargo, está más relacionada con las vías biliares.

La producción de p-nitroanilina a partir de γ -glutamyl-nitroanilida es el fundamento de la técnica utilizada⁴⁶, en medio alcalino con un pH aproximado a 8.2 y en presencia de Mg^{2+} la reacción es catalizada por la γ -GTP, dónde se favorece la transferencia del grupo γ -1-glutamyl a la glicil-glicina así se obtiene p-nitroanilina donde se mide la absorbancia por espectrofotometría a una longitud de 410 nm.

La prueba se determinó de la siguiente manera, etiquetando anticipadamente tubos de ensayo de 13 x 100 mm agregando los siguientes reactivos con el orden indicado:

- ❖ 400 μ L de Tris-Cl 200 mM con un de pH 8.2
- ❖ 100 μ L de $MgCl_2$ 200 mM
- ❖ 100 μ L de Glicil-glicina 40 mM con un pH de 8.2
- ❖ Se incubó la mezcla anterior por 10 minutos a 37 °C, la reacción se inició al agregar 200 μ L de suero sanguíneo.
- ❖ Una vez agregado el suero se incubó nuevamente a 37°C durante 30 min, la reacción se detuvo al adicionar 2 mL de ácido acético 1.5 M
- ❖ Se leyó a 410 nm en el espectrofotómetro
- ❖ El blanco se realizó sustituyendo el suero por agua destilada

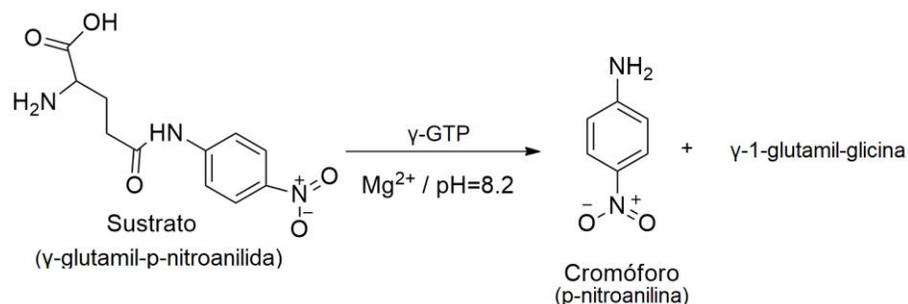


Figura 13. Reacción catalizada por la γ -GTP para formar p-nitroanilina.

6.6.6 Curva de calibración de p-nitroanilina

Solución 1: Pesar 13.81 mg de p-nitroanilina y llevarlos a 250 ml de ácido acético 1.5 M.

Tabla 5. Curva de calibración de la γ -GTP

Tubo No.	Solución 1 (μl)	H₂O (μl)	nmoles/ml	μmoles/ml
1	50	1950	10	0.01
2	100	1900	20	0.02
3	150	1850	30	0.03
4	250	1750	50	0.05
5	375	1625	75	0.075
6	500	1500	100	0.1
7	750	1250	150	0.15
8	1000	1000	200	0.20
Calibrar, no requiere blanco Leer absorbancia a 410 nm.				

6.6.7 Determinación del glucógeno hepático

El organismo utiliza múltiples fuentes de energía para funcionar un ejemplo de esto es el glucógeno, el cual es la principal forma de almacenar glucosa, el glucógeno se almacena principalmente en el hígado y en el músculo esquelético, cuando el hígado se ve afectado por diferentes enfermedades, el almacenamiento de este azúcar se ve seriamente afectado disminuyendo los niveles normales.

La determinación del glucógeno hepático se lleva a cabo por la técnica de la antrona⁴⁷, donde muestras de tejido hepático hidrolizadas en medio alcalino se hacen reaccionar con una disolución ácida de antrona. El ácido sulfúrico provoca la deshidratación de los azúcares generados en la hidrólisis, convirtiéndolos en sus derivados tipo furfural, estos se condensan con la antrona produciendo un compuesto colorido que se lee a 620 nm.

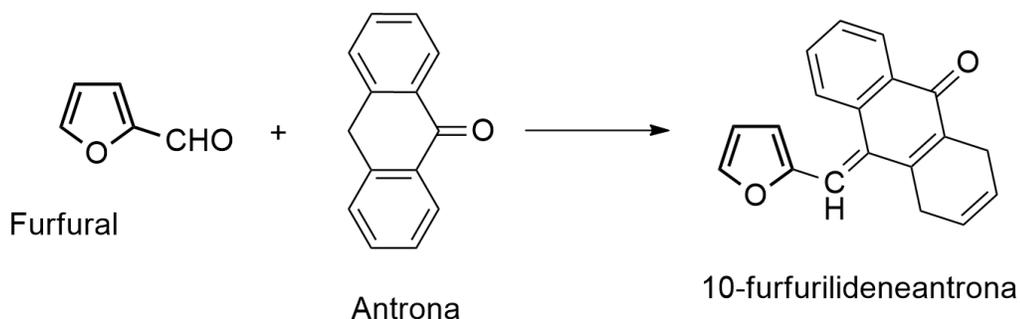


Figura 14. Reacción entre el furfural y la antrona.

El procedimiento realizado se describe a continuación:

- ❖ Se pesaron 0.5 g de hígado en tubos con tapón esmerilado, se adicionó 1.5 mL de KOH al 30%, se taparon y se hirvieron en baño de agua durante 30 min
- ❖ Se dejaron enfriar los tubos para posteriormente verter la solución a un matraz volumétrico de 25 mL y se aforaron con agua
- ❖ Se tomaron de 40 μ L de la solución anterior pasándolos a tubos esmerilados y se aforaron a 1 mL, se preparó un blanco con un mL de agua y dos estándares con 20 μ L de una solución estándar de glucosa de 1 mg/mL y se llevó a 1 mL con agua

- ❖ Se preparó una solución de antrona al 0.2% en H₂SO₄ concentrado. Se agregaron 2 mL de la solución anterior a cada tubo con la ayuda de una bureta enfriada previamente sobre hielo y se agitaron suavemente los tubos
- ❖ Los tubos se taparon y se pusieron a baño maría por 15 min
- ❖ Se enfriaron de inmediato sobre agua con hielo y se leyeron a 620 nm.

Los cálculos se realizaron de la siguiente manera:

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

A (mtra) = Absorbancia de la muestra

A (Std)= Absorbancia del estándar

Se expresan los resultados como gramos de glucógeno/100 g de hígado teniendo en cuenta las diluciones realizadas.

6.6.8 Determinación de proteínas

La determinación se realizó por el método reportado en 1976 por Bradford⁴⁸, el cual se basa en la unión de las proteínas al azul brillante de Coomassie. El colorante tiene dos coloraciones el rojo y el azul. Cuando el color rojo se convierte en azul se ha llevado a cabo la unión a las proteínas y se cuantifica en el espectrofotómetro.

El reactivo de Bradford para la determinación de las proteínas se preparó con 100 mL de ácido fosfórico al 85%, 50 mL de alcohol etílico, 100 mg de azul de Coomassie G-250 y se aforó a un litro con agua destilada.

La técnica se llevó a cabo de la siguiente manera:

- ❖ Se colocaron tres series de ocho tubos de 10 x 10 mm
- ❖ En una serie de ocho tubos se tomaron 100 μ L de homogeneizado de hígado y se llevó a 1000 mL con agua tridestilada
- ❖ Se tomaron alícuotas (20 μ L) para proteínas y se llevaron a 100 μ L con agua en las dos siguientes series de ocho tubos (de la dilución anterior se tomaron 20 μ L y se añaden 80 μ L de agua tridestilada)
- ❖ Se agregaron 2400 μ L del reactivo de Bradford
- ❖ Concluyendo el proceso anterior, se leyeron las absorbancias del complejo colorido a 595 nm.
- ❖ Se preparó un blanco sustituyendo el homogeneizado de hígado por 100 μ L de agua.

6.6.9 Curva de calibración para proteínas

- Se prepara una curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina (1mg/ml)

Con: 0, 5, 10, 15, 20, 30, 35, 40, 50, 60, 80, 100 μ l.

- Se aforan los tubos con agua a 100 μ l.

Tabla 6. Curva de calibración para proteínas

Tubo No.	Albúmina (μl)	Agua (μl)	Bradford (ml)
1	0	100	2.4
2	5	95	2.4
3	10	90	2.4
4	15	85	2.4
5	20	80	2.4
6	30	70	2.4
7	35	65	2.4
8	40	60	2.4
9	50	50	2.4
10	60	40	2.4
11	80	20	2.4
12	100	0	2.4

- Leer absorbancia a 595 nm.

6.7 Determinación del glutatión reducido

El glutatión controla la permeabilidad de la membrana y el transporte de aminoácidos, se encarga de algunos procesos de detoxificación, mantiene el estado redox en las células, hace frente a un ataque de estrés oxidante, por lo tanto, es considerado el principal antioxidante endógeno de las células.

Cuando la célula ha sido dañada por medio de las especies reactivas de oxígeno la actividad endógena del GSH se ve superada, ya que la formación de ROS y peróxidos lipídicos es mayor a la capacidad que tiene el GSH para desactivar a los radicales libres.

La técnica utilizada para determinar los niveles de GSH en hígado se basa en una reacción que incluye al grupo sulfhidrilo del aminoácido cisteína perteneciente al glutatión y al ácido 5-5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) del reactivo de Ellman⁴⁹. Una vez concluida la reacción el producto que se obtiene es el ácido 5-tio-2-dinitrobenzoico, el cual es un compuesto colorido que puede ser leído en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 412 nm.

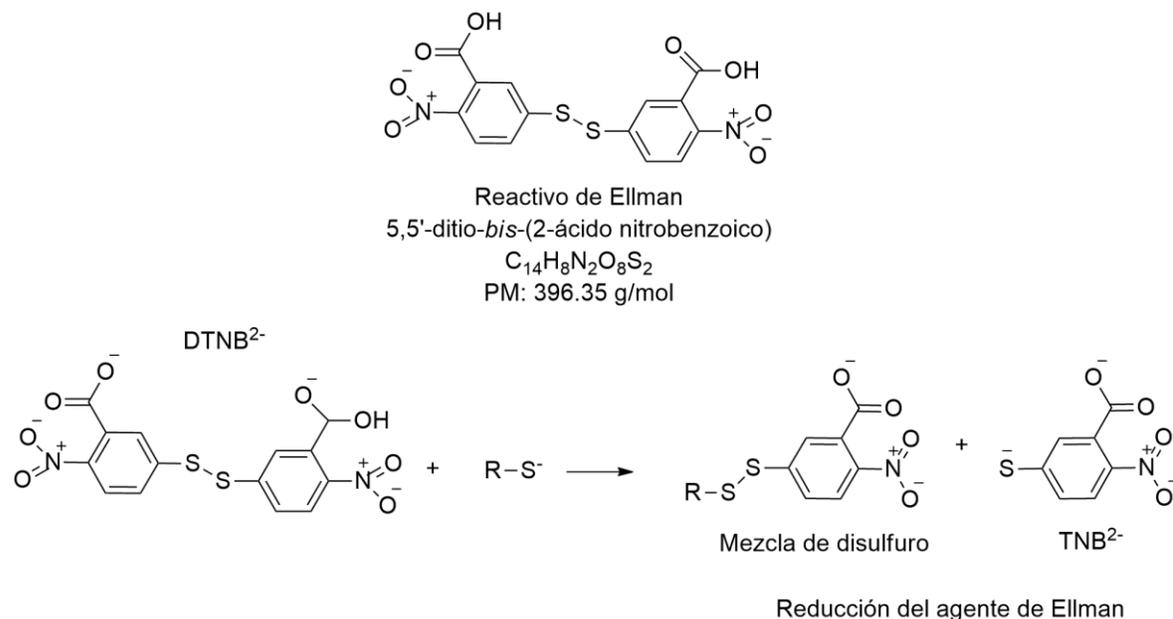


Figura 15. Reacción colorida del reactivo de Ellman con el GSH.

Reactivos:

-Reactivo de Ellman

a) Se pesó 40 mg de ácido 5,5'-ditiobis nitrobenzoico (DTNB)

b) Se prepararon 100 mL de citrato de Na al 1%

c) Se disolvieron (a) en (b)

Se puede mantener congelado no más de dos semanas

-Solución de fosfatos Na_2HPO_4 0.3 M (disuelto en agua)

-Solución precipitante: EDTA 5 mM en TCA 5%. Se disuelve el EDTA en TCA.

Procedimiento:

1) Se homogeneizó 0.3 g de hígado en 1.2 mL de solución precipitante

2) Se centrifugó por 20 minutos a 12 000 rpm

3) Se tomaron 0.1 mL del sobrenadante (por duplicado) y se agregaron 2.1 mL de solución del fosfato y 0.25 mL de reactivo de Ellman

4) Se agitó y se leyeron en el espectrofotómetro a 412 nm

6.7.1 Curva estándar de glutatión reducido-colorimétrico

Solución patrón: GSH 1mol/μl (Pesar 30.733 mg de GSH y llevar a 100 ml con solución de fosfatos).

Tabla 7. Curva de calibración para GSH

Tubo	Vol. GSH (μl)	nmol	Na₂HPO₄ (ml)	DTNB (ml)
B	0	0	2.2	0.25
1	10	10	2.19	0.25
2	25	25	2.175	0.25
3	50	50	2.15	0.25
4	75	75	2.125	0.25
5	100	100	2.1	0.25
6	150	150	2.05	0.25
7	200	200	2	0.25
8	250	250	1.95	0.25

- Agitar y leer a 412 nm.
- Se expresa en μmol/g de tejido húmedo.

6.7.2 Determinación del grado de peroxidación lipídica

La técnica se basa en el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS); en donde el TBA reacciona con el MDA. El malondialdehído contiene tres carbonos en su estructura y es altamente reactivo, genera uno de los principales bioproductos de la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, por lo cual el MDA es la principal sustancia reactiva al TBA.

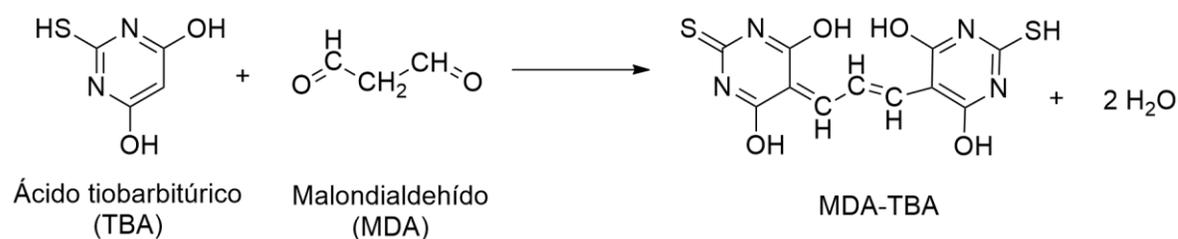


Figura 16. Reacción entre el malondialdehído y ácido tiobarbitúrico.

Reactivos:

- Tris-HCl 150 mM pH=7.4
- Ácido tricloroacético (TCA) al 15%.
- Ácido tiobarbitúrico (TBA) 0.375% p/v en TCA al 15% (se prepara en el momento la cantidad necesaria)

Procedimiento:

1. Pesar 0.5 g de hígado.
2. Homogenizar en 5ml de agua.
3. Tomar 300 µl del homogenado al 10% y agregar 700 µl de Tris-HCl 150 mM pH=7.4 para completar 1 ml.
4. Agregar 2 ml de TBA al 0.375% disuelto en TCA al 15%.
5. Poner a ebullición por 45 min.
6. Centrifugar a 3000 rpm por 10 minutos y leer el sobrenadante a 532 nm.
7. Se realiza un blanco con 1 ml de Tris-HCl 150 mM, pH 7.4.

6.7.3 Determinación de colágena

La colágena es una de las proteínas que conforman la matriz extracelular, esta se encarga de brindar soporte, por otra parte, la prolina y la glicina sufren una reacción de hidroxilación, lo cual hace que la hidroxiprolina sea el aminoácido con mayor proporción presente en la colágena⁵⁰.

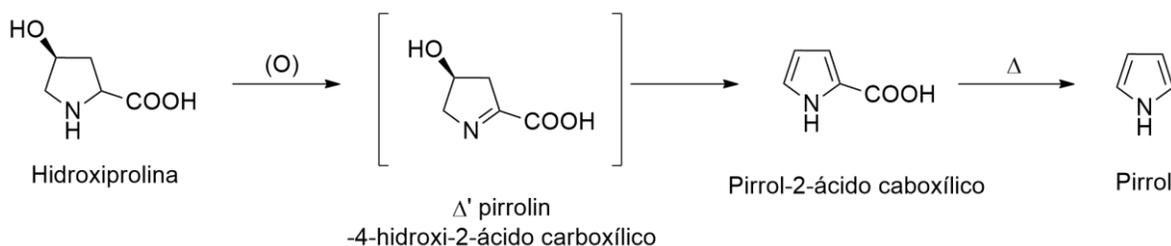


Figura 17. Reacciones de oxidación y descarboxilación que sufre la hidroxiprolina.

Se realizó la determinación de hidroxiprolina por medio del método publicado en 1974 por Rojkind⁵¹.

1. Se pesa 0.1 g de hígado de rata previamente secado con papel filtro y se coloca en una ampolleta.
2. Se agregan 2 ml de HCl 6N y se sellan con el mechero o soplete, posteriormente se colocan a 100 °C en el horno durante 24 h.
3. Una vez hidrolizada la muestra, se destapan las ampolletas y se colocan nuevamente en el horno a temperatura de 60-80°C aproximadamente 24 h o hasta que se sequen.
4. Las muestras ya secas se resuspenden con 2 ml de solución amortiguadora (sol.1); se agitan vigorosamente en el vortex y se vacían en tubos de ensaye, las ampolletas se lavan con la adición de 1 ml de la misma solución.
5. Se centrifugan a 3000 rpm durante 15 min.
6. En un tubo conteniendo una pequeña porción de carbón activado se deposita el sobrenadante, se agita durante un minuto, centrifugar a 3000 rpm por 15 min, si se observa que el sobrenadante no queda claro se repite este paso.
7. Se toma 1 ml de H₂O y 1 ml de cloramina T (sol. 2). Se deja reposar exactamente 20 min a temperatura ambiente. Hacer un blanco con 2 ml de H₂O más 1 ml de cloramina T.

8. Transcurridos los 20 min, adicionar 0.5 ml de tiosulfato de sodio 2M, 1 ml de NaOH 1N y aproximadamente 2 g de NaCl. Agitar de inmediato para detener la reacción.
9. A cada tubo agregar 6 ml de tolueno y agitar durante 1 min justamente. La fase acuosa se utiliza para la determinación de hidroxiprolina.
10. Se extrae la capa de tolueno de se desecha. La porción acuosa se cubre y se coloca en un baño de agua hirviendo durante 20 minutos.
11. Los tubos se enfrían 15 min preferentemente en el refrigerador. Ya fríos se les adicionan 6 ml de tolueno y se agitan durante un minuto.
12. De la fase de tolueno se toman alícuotas por duplicado de 1 ml y se les agregan 4 ml de reactivo de Ehrlich, se agitan fuertemente.
13. Se dejan reposar durante 30 minutos para que se lleve a cabo la reacción colorida. Pasados los mismos, leer a 560 nm.

Reactivos:

Solución 1. Buffer de acetato de sodio-ácido cítrico. pH=6.

Solución amortiguadora (Relación para un litro):

- 50 g de ácido cítrico
- 120 g de acetato de sodio (3H₂O)
- 34 g de NaOH
- 15 ml de ácido acético glacial

La solución amortiguadora se mantiene en refrigeración y es estable por meses.

Solución 2. Solución de cloramina T (Relación para 10 ml)

- 0.141 g de cloramina T se mezclan con 2 ml de agua destilada, 3 ml de etilenglicol y 5 ml de solución amortiguadora. Esta solución se debe preparar en el momento de usarse.

Solución 3. Reactivo de Ehrlich

- a) Se toman 27.4 ml de H₂SO₄ concentrado y se agregan lentamente a 200 ml de alcohol absoluto en un vaso sobre hielo.

- b) Se pesan 120g de p-dimetilaminobenzaldehído y se disuelven en 200 ml de alcohol absoluto.
- La mezcla ácido-etanol (a) se agrega lentamente y con agitación a la solución (b) en hielo, el recipiente se cubre con papel aluminio (solución fotolábil). Agitar durante 15 min y retirar del hielo, seguir agitando hasta disolver.
 - La solución se puede almacenar en refrigeración por varias semanas.
 - Los cristales que se precipitan por el enfriamiento se disuelven calentando en baño María, agitando la solución.

Solución 4. Solución de ninhidrina.

- Pesar 2.50 g de ninhidrina, disolverlos en 60 ml de ácido acético glacial y 40 ml de ácido fosfórico 6N.

6.7.4 Curva estándar de hidroxiprolina

10 mg (76.26 μmol) de hidroxiprolina (HP) se llevan a un volumen de 76.26 ml, lo que nos da una solución cuya concentración es de $1\mu\text{mol/ml} = 1\text{nmol}/\mu\text{l}$.

Tabla 8. Curva estándar de HP

<i>Tubo</i>	<i>HP (μl)</i>	<i>H₂O</i>	<i>HP (nmoles)</i>
1	10	1.99	10
2	30	1.97	30
3	50	1.95	50
4	70	1.93	70
5	100	1.90	100
6	150	1.85	150
7	200	1.80	200
8	300	1.70	300
9	400	1.60	400
10	500	1.50	500
B	---	2.00	---

1. Se colocan en un tubo con rosca y tapón, se les adiciona 1 ml de cloramina T. Se dejan reposar 20 min a temperatura ambiente.
2. Pasados los 20 min se detienen la reacción por la adición de 500 μl de tiosulfato de sodio 2 M; con 1 ml de NaOH 1N y con aproximadamente 2 g de NaCl. Agitar inmediatamente de esto depende que se detenga la reacción.
3. Agregar 6 ml de tolueno a cada muestra y agitar durante 1 min.
4. Se extrae la capa de tolueno, se desecha y el contenido acuoso se cubre con su respectivo tapón y se coloca en un baño hirviendo durante 20 minutos.
5. Se enfrían los tubos y nuevamente se les agregan 6 ml de tolueno y se agitan durante 1 minuto.
6. Se tomaron por duplicado una alícuota de 1 ml de la fase de tolueno y se mezclaron con 4 ml de reactivo de Ehrlich y agitar vigorosamente.
7. Los tubos se mantienen a temperatura ambiente durante 30 minutos para desarrollar color. Leer en espectrofotómetro a 560 nm.

6.7.5 Zimografía

Esta técnica electroforética se utiliza para observar la actividad de enzimas, en este caso, la actividad proteolítica de las metaloproteinasas 2 y 9 siguiendo la siguiente técnica:

1. Se pesó 250 mg de tejido hepático y se homogeneizaron con 1.7 ml de PBS estéril 1X.
2. Las muestras se sonicaron 3 veces por 15 s, con descansos de 15s, con una amplitud del 60%.
3. Se centrifugaron a 13000 rpm por 10 minutos y el supernadante fue colectado y guardado.
4. Se cuantificaron las proteínas por el método del ácido bicinónico.
5. Volúmenes equivalentes a 50 μ g fueron mezclados con solución amortiguadora de muestra (SDS 2.5 %, sacarosa 1% y rojo de fenol, 4 mg/ml).
6. Las muestras preparadas se cargaron en un gel de acrilamida al 8 %, copolimerizando con 1 mg/ml de gelatina.
7. Se corrió una electroforesis a 72 V por 2.5 h.
8. Se lavaron los geles con Triton X-100 2.5%.
9. Se incubaron los geles con solución amortiguadora de activación (Tris-HCl 50 mM pH 7.4 y CaCl_2 5 mM) a 37° C por 48 h.
10. Se tiñeron los geles con azul de Coomasie G-250 al 0.25% en ácido acético al 10% y metanol al 30%.
11. Se destiñeron los geles hasta tener una coloración adecuada para ver la actividad proteolítica de las MMPs.
12. Se realizó el análisis densitométrico.

7 Histologías

7.1 Tinción de hematoxilina y eosina

En esta técnica de tinción de tejidos se aprecian los núcleos de las células de color violeta-azul y el citoplasma se tiñe de color rosa. El procedimiento fue el siguiente:

1. Cortes gruesos de hígado se depositaron en un vial conteniendo una solución fijadora de paraformaldehído al 4% en PBS, el tiempo mínimo de fijación fue de 24 h.
2. Los cortes se lavaron con agua corriente, se deshidrataron en alcoholes y se embebieron en parafina.
3. Se realizaron cortes de 6 micras de espesor y se colocaron en portaobjetos silanizados.
4. Se desparafinaron las muestras y se rehidrataron con xileno, alcohol absoluto y alcohol al 95%.
5. Se aplicó hematoxilina de Harris durante 15 min y se enjuagaron con agua corriente por dos minutos.
6. Se diferenciaron en alcohol acético con tres a diez inmersiones y se verificó la diferenciación con microscopio de luz. Los núcleos deben distinguirse y el fondo debe ser de color muy tenue e incoloro.
7. Se lavaron con agua corriente brevemente y luego se sumergieron en agua amoniacal o saturada de carbonato de litio hasta que las secciones fueron de color azul brillante, una vez más se lavaron en agua corriente de 10 a 20 min.
8. Posteriormente, se tiñeron con eosina de 15 s a 20 min, dependiendo de la caducidad de la eosina y del grado de contraste deseado (contrateñido); se lavaron con alcohol al 95% y luego en alcohol absoluto y con xileno; finalmente, se montaron con el polímero Permound o bálsamo.

7.2 Tinción tricrómica de Masson

Con esta técnica se busca teñir a las bandas de colágena de color azul, el núcleo celular de color rojo y el citoplasma de color rosa; el procedimiento fue el siguiente:

- Cortes gruesos de hígado se depositaron en un vial conteniendo una solución fijadora de paraformaldehído al 4% en PBS, el tiempo mínimo de fijación fue de 24 h.
- Los cortes se lavaron con agua corriente, se deshidrataron en alcoholes y se embebieron en parafina.
- Se hicieron cortes de 6 micras de espesor y se recubrieron con silano.
- Las muestras se desparafinaron y rehidrataron con xileno, alcohol absoluto y alcohol al 95%, se enjuagaron en agua destilada y se sumergieron en el fijador de Bouin por 1 h a 56 °C.
- Posteriormente, se enfriaron y lavaron con agua corriente hasta que el color amarillo desapareció.
- Se enjuagaron con agua destilada para luego sumergirlas en solución de hematoxilina de hierro de Weigert por 10 min.
- Se enjuagaron las muestras con agua corriente y agua destilada.
- Se sumergieron en la solución de fucsina ácido-escarlata de Biebrich por 15 min.
- Se enjuagaron con agua destilada para colocarlas en la solución de ácido fosfomolibdico/ ácido fosfotungstínico por 10-15 min.
- Se colocaron en la solución de anilina azul por 5-10 min o con la solución verde claro por 1 min, se recuperó la solución y se enjuagaron con agua destilada.
- Se lavaron con agua acética al 1% por 3-5 min y luego con alcohol al 95%, alcohol absoluto y con xileno. Finalmente se montaron con el polímero de Permout o bálsamo.

7.3 Tinción rojo oleoso O

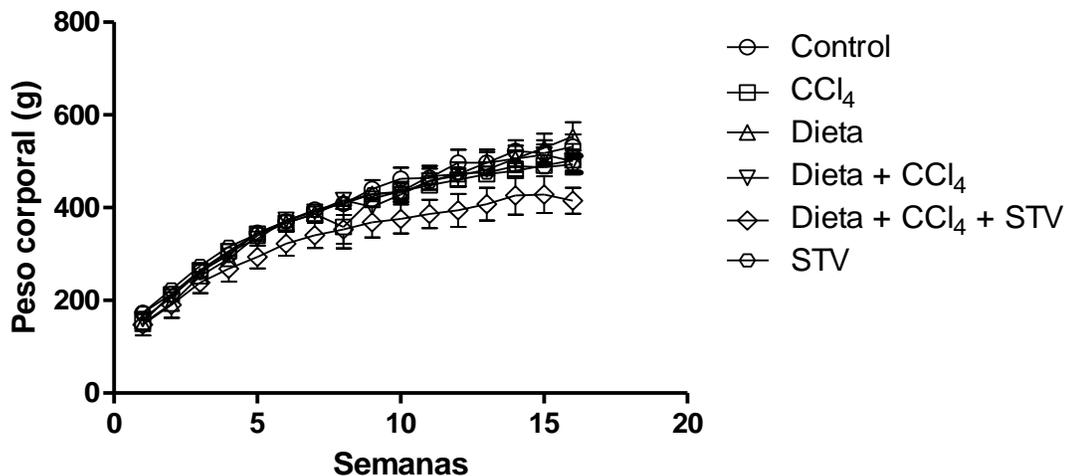
En esta técnica se utiliza para la detección de grasas en tejidos histológicos, ya que por su naturaleza es capaz de difundir hacia los lípidos del tejido.

1. Cortes gruesos de hígado se depositaron en un vial conteniendo una solución fijadora de formol al 10% en PBS, el tiempo mínimo de fijación fue de 24 h.
2. Los cortes se lavaron con PBS y se embebieron en tissue-tek.
3. Se hicieron cortes de 5 micras de espesor con ayuda del criostato.
4. Las muestras se enjuagaron en agua destilada durante 10 min.
5. Posteriormente se sumergieron en polietilenglicol absoluto por 2 min.
6. Se retiró el exceso de polietilenglicol para posteriormente teñir con una solución de rojo oleoso al 7% (preparada previamente con polietilenglicol y filtrada en caliente) durante 10 min.
7. Una vez transcurridos los 10 minutos de tinción, las muestras se diferencian en polietilenglicol al 60% durante 1 min.
8. Las muestras se enjuagan con agua destilada hasta quitar el exceso de polietilenglicol.
9. Se procedió a teñir con hematoxilina de Gill durante 6 min.
10. Se lavaron con agua corriente. Finalmente se montaron con gelatina-glicerol.

8. Resultados

8.1 Efecto del estevióside sobre el peso corporal

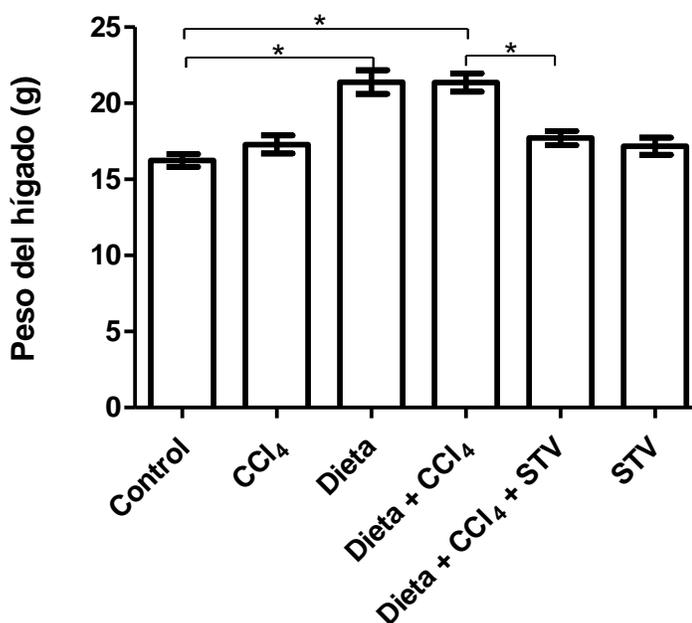
Al inicio del experimento las ratas tuvieron un peso de 170- 190 g, mientras que al término de éste el peso osciló entre 390-560 g (Gráfica1). A pesar de la aparente diferencia entre el grupo Dieta + CCl₄ +STV y el grupo de Dieta, el análisis estadístico no arrojó ninguna diferencia significativa entre ningún grupo de estudio a lo largo de las 16 semanas de duración del experimento. Por otra parte, es importante resaltar que se observa una tendencia al alza por parte del grupo de Dieta comparado con los demás grupos de estudio y la administración del estevióside por sí solo no tuvo ningún efecto sobre el peso corporal de los animales.



Gráfica 1. Efecto del estevióside sobre el peso de las ratas a lo largo del periodo de estudio. Cada punto representa la media de los valores de los pesos a lo largo de 16 semanas \pm SEM (n=8). No se encontraron diferencias significativas.

8.2 Efecto del esteviósido sobre el peso de los hígados

La gráfica 2 muestra el peso de los animales en experimentación, se observa que la Dieta aparentemente promovió la acumulación de lípidos en el hígado favoreciendo la ganancia de peso, teniendo una diferencia significativa respecto al grupo control. Por otra parte, el CCl₄ aparentemente no tuvo efecto sobre este parámetro mientras que la administración conjunta de la Dieta + CCl₄ nuevamente favoreció el depósito de grasa en el órgano, asimismo en el grupo dieta + CCl₄ + STV se observa un posible efecto antiesteatótico por parte del esteviósido teniendo una diferencia significativa respecto al grupo dieta + CCl₄ lo cual se puede constatar en las histologías. La administración del esteviósido en el grupo STV no tuvo ningún efecto sobre el peso del hígado de las ratas.



Gráfica 2. Efecto del esteviósido sobre el peso de los hígados de rata a lo largo del periodo de estudio. Cada barra representa la media de los valores de los pesos al término del experimento \pm SEM (n=8). * indica diferencia significativa, $p \leq 0.05$.

8.3 Efecto del esteviósido sobre la esteatosis hepática.

Se realizó un análisis histológico para verificar los cambios en el parénquima hepático utilizando la tinción de hematoxilina y eosina (Figura 18).

La apariencia macroscópica del hígado representativo del grupo control es aparentemente normal donde se observa una coloración característica del órgano, en cuanto a la histología muestra que el parénquima hepático del grupo control no presenta alteración alguna.

El grupo de dieta muestra un hígado de coloración amarilla-blanquecina que indica una posible esteatosis, la cual se puede correlacionar con la histología, la administración de la dieta provoca una alteración significativa en la morfología hepática con la aparición de microvesículas aparentemente de lípidos, así como la descentralización del núcleo.

La administración de CCl_4 aparentemente no afectó al hígado ya que la apariencia macroscópica es casi normal, mientras que el parénquima hepático es muy parecido al grupo control.

Por otra parte, la administración de la dieta en conjunto con el CCl_4 favorece la acumulación de lípidos, se observa un hígado de coloración amarillo-blanquecina, muy parecido al grupo de dieta, sin embargo, al observar la histología se puede apreciar que la cantidad de microvesículas es mayor, lo cual puede indicar que el CCl_4 favorece la esteatosis.

En cuanto al grupo administrado con la dieta, CCl_4 y el esteviósido se puede apreciar que el hígado representativo tiene una disminución en la coloración amarillo-blanquecina, probablemente por un efecto antiesteatótico por parte del metabolito, el cual se puede constatar en la histología donde hay una disminución de las vesículas de lípidos dentro de los hepatocitos.

Por último, el hígado y el parénquima hepático del grupo administrado únicamente con esteviósido tienen una apariencia normal.

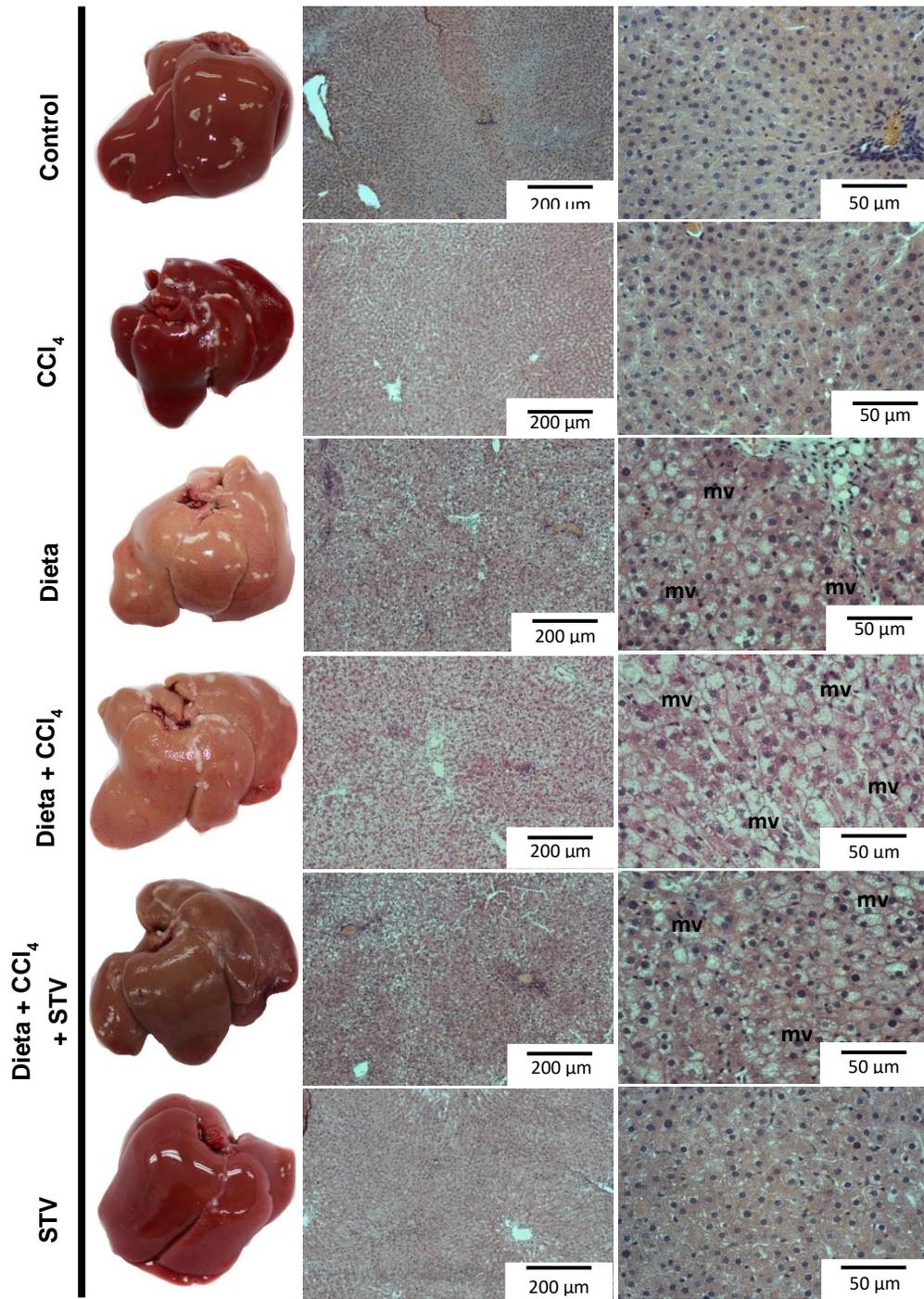
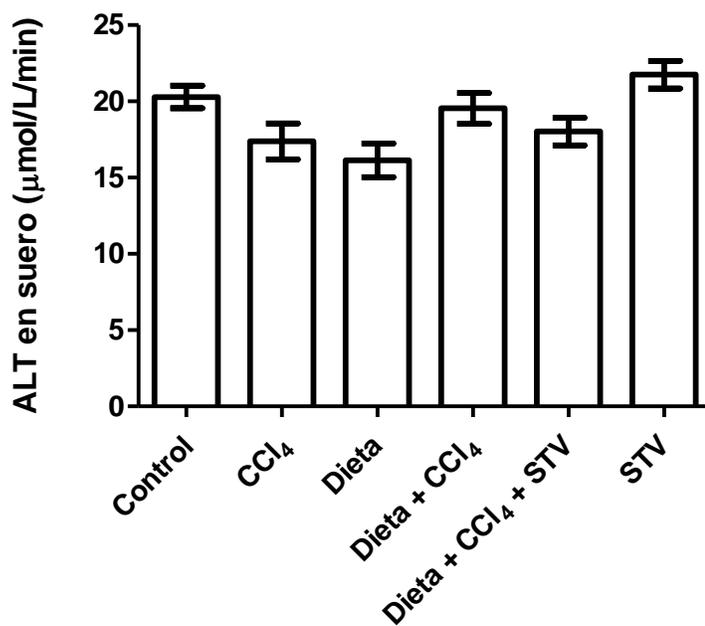


Figura 18. La administración del estevióside aparentemente tiene un efecto antiesteatótico. Efecto del estevióside en la estructura macroscópica y microscópica del hígado en ratas Control, tratadas con CCl_4 , tratadas con la Dieta y ratas tratadas con la Dieta + CCl_4 (Tinción H&E).

8.4 Actividad enzimática de la alanino aminotransferasa, fosfatasa alcalina y γ -glutamyl transpeptidasa

8.4.1 Actividad enzimática de la alanino aminotransferasa

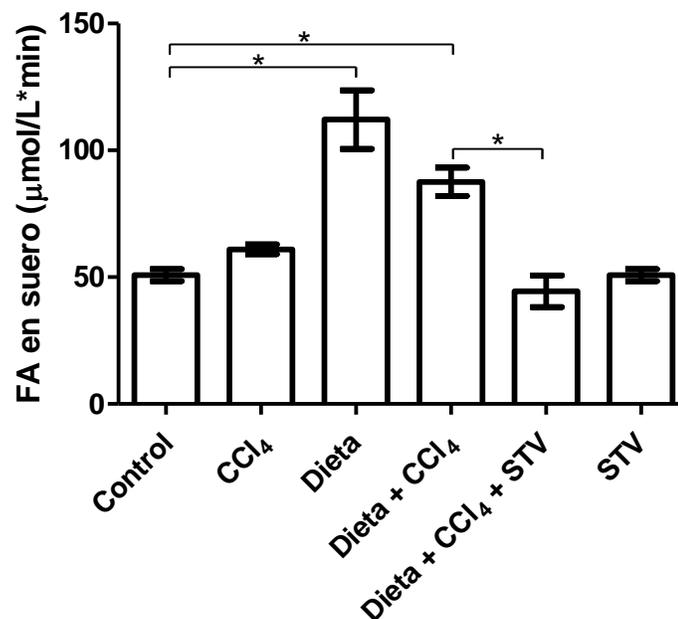
La alanina aminotransferasa es una enzima que se encuentra en el citosol de los hepatocitos por lo que el aumento de su actividad es un marcador de necrosis celular. En la gráfica 3 se observa la actividad de la enzima la cual no aumentó significativamente durante el periodo de experimentación (16 semanas) en ninguno de los seis grupos de estudio, lo cual indica que no hubo un daño en las células hepáticas y por lo tanto el esteviósido no tuvo ningún efecto sobre este parámetro.



Gráfica 3. Actividad de la enzima alanino aminotransferasa (ALT) en suero de ratas Control, tratadas con la Dieta, tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), tratadas con la Dieta + CCl₄, administradas con la Dieta + CCl₄ + Esteviósido (STV) y tratadas únicamente con STV. Cada barra representa la media de los valores de las pruebas realizadas por duplicado \pm SEM (n=8). No se encontraron diferencias significativas.

8.4.2 Actividad enzimática de la fosfatasa alcalina

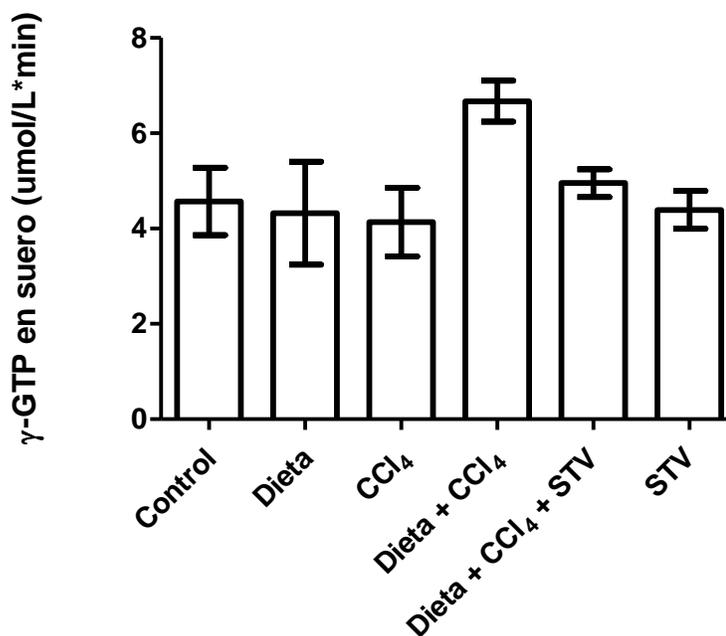
La gráfica 4 muestra la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, la cual es un indicador de colestasis. Se observa que la dieta por sí sola ocasiona un aumento significativo en la actividad de la enzima, mientras que el CCl_4 no tiene ningún efecto sobre esta, por otra parte se muestra que la actividad de la enzima en el grupo de dieta + CCl_4 hubo un aumento significativo respecto al grupo control, mientras que la administración de la dieta + CCl_4 en conjunto con el esteviósido tiene un posible efecto hepatoprotector al impedir que haya un aumento en la actividad de la fosfatasa alcalina, por otro lado el esteviósido por sí solo no tiene ningún efecto sobre la actividad de la enzima ya mencionada.



Gráfica 4. Actividad de la enzima fosfatasa alcalina (FA) en suero de ratas Control, tratadas con la Dieta, tratadas con tetracloruro de carbono (CCl_4), tratadas con la Dieta + CCl_4 , administradas con la Dieta + CCl_4 + Esteviósido (STV) y tratadas únicamente con STV. Cada barra representa la media de los valores de las pruebas realizadas por duplicado \pm SEM (n=8). * indica diferencia significativa, $p \leq 0.05$.

8.4.3 Actividad enzimática de la γ -glutamil transpeptidasa

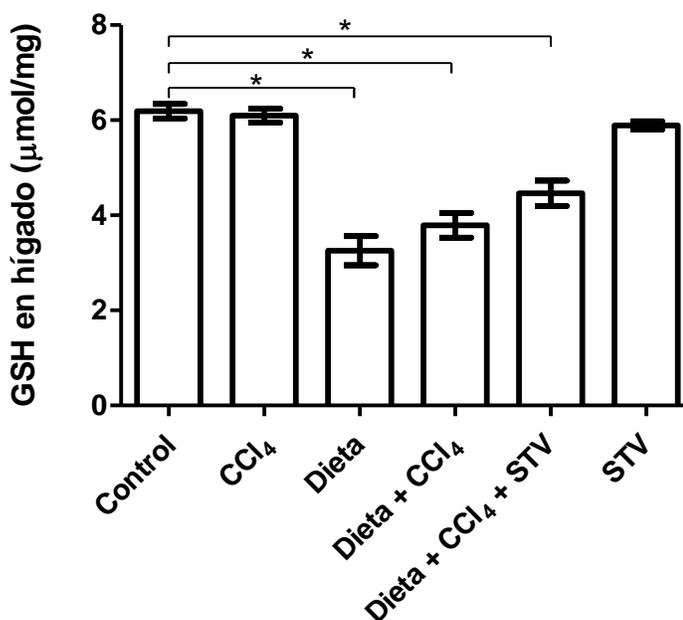
Al igual que la fosfatasa alcalina, la enzima γ -GTP es un indicador de colestasis, en la gráfica 5 se observa la actividad de la enzima, la cual no aumentó significativamente durante el periodo de experimentación (16 semanas) en ninguno de los seis grupos de estudio, sin embargo en el grupo dieta + CCl_4 se observa una tendencia a la alza, lo que nos indica que probablemente es necesaria una administración de una dosis más alta y/o prolongada de lípidos y carbohidratos para poder tener una mayor actividad de esta enzima.



Gráfica 5. Actividad de la enzima gamma-glutamil transpeptidasa (γ -GTP) en suero de ratas Control, tratadas con la Dieta, tratadas con tetracloruro de carbono (CCl_4), tratadas con la Dieta + CCl_4 , administradas con la Dieta + CCl_4 + Estevióside (STV) y tratadas únicamente con STV. Cada barra representa la media de los valores de las pruebas realizadas por duplicado \pm SEM (n=8). No se encontraron diferencias significativas.

8.5 Determinación del glutatión reducido hepático

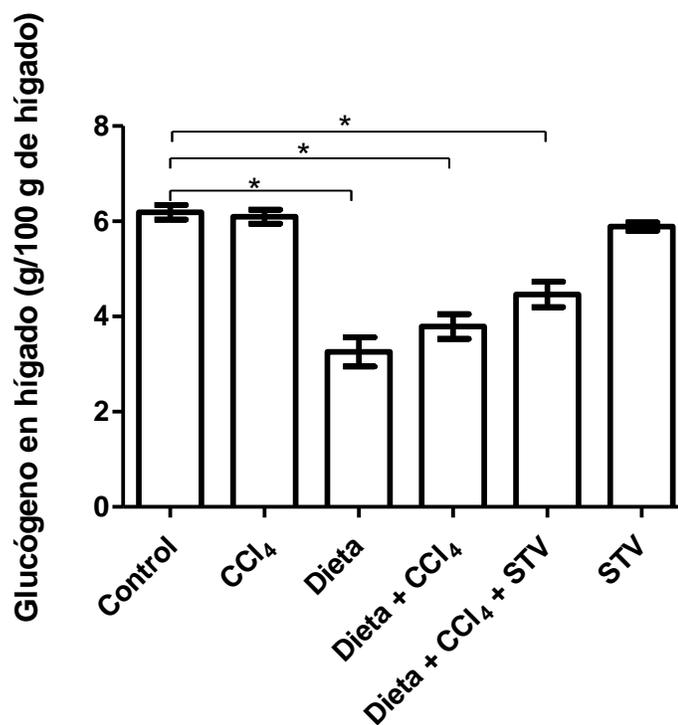
El glutatión es el principal antioxidante endógeno, es utilizado como un marcador de estrés oxidante, su disminución indica un posible daño hepático. La siguiente gráfica muestra que la administración de la dieta disminuye significativamente la cantidad de glutatión reducido presente en el hígado. Por otra parte, se observa que la administración del CCl₄ por sí solo no tiene algún efecto sobre este parámetro pero que al ser administrado en conjunto con la dieta se observa un decaimiento significativo comparado con el grupo control, sin embargo, la administración del esteviósido en conjunto con la dieta y el CCl₄ no fue capaz de revertir la disminución del antioxidante endógeno, pero se observa una tendencia a la alza por lo que se pudiera recomendar un tratamiento más extenso y/o una dosis mayor de esteviósido. En cambio, la administración por si sola del esteviósido (grupo STV) no tuvo ningún efecto sobre este parámetro (Gráfica 6).



Gráfica 6. Determinación de glutatión reducido en el hígado de ratas Control, tratadas con la Dieta, tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄), tratadas con la Dieta + CCl₄, administradas con la Dieta + CCl₄ + Esteviósido (STV) y tratadas únicamente con STV. Cada barra representa la media de los valores de las pruebas realizadas por duplicado \pm SEM (n=8). * indica diferencia significativa, $p \leq 0.05$.

8.5.1 Contenido del glucógeno hepático

El contenido de glucógeno hepático se utiliza para verificar la capacidad biosintética del hígado, la presente gráfica muestra que la administración de la dieta afecta significativamente la capacidad biosintética del órgano mientras que la administración de CCl_4 es capaz de alterar este parámetro aun siendo una dosis muy baja. Por otra parte, se observa que hay un efecto sinérgico con la administración de la dieta + CCl_4 y la administración conjunta de la dieta + CCl_4 + STV este último no fue capaz de revertir el daño causado, sin embargo, al igual que el glutatión reducido se observa una tendencia a la alza, por otra parte la administración de únicamente esteviósido no afectó este parámetro (Gráfica 7).



Gráfica 7. Contenido de glucógeno hepático de ratas Control, tratadas con la Dieta, tratadas con tetracloruro de carbono (CCl_4), tratadas con la Dieta + CCl_4 , administradas con la Dieta + CCl_4 + Esteviósido (STV) y tratadas únicamente con STV. Cada barra representa la media de los valores de las pruebas realizadas por duplicado \pm SEM ($n=8$). * indica diferencia significativa, $p \leq 0.05$.

Los resultados mostrados anteriormente sugieren que la dieta líquida compuesta por grasas saturadas, colesterol y fructosa, incluyendo al tetracloruro de carbono como potenciador aparentemente causa únicamente esteatosis confirmándose tanto macroscópicamente como microscópicamente. En cuanto a los resultados de las enzimas utilizadas como marcadores de daño hepático se llega a la conclusión que debido a la acumulación de grasa en el hígado se provoca un impedimento en el flujo biliar, causando colestasis, sin embargo, el daño no es suficiente para causar necrosis en los hepatocitos.

Por otra parte, se observa un incremento en la formación de radicales libres, los cuales se pueden medir indirectamente mediante la cuantificación de glutatión reducido en hígado, la capacidad biosintética del órgano se ve afectada por la deposición de la grasa en éste, en cuanto a los resultados de la actividad farmacológica por parte del esteviósido se aprecia que hay un aparente efecto antiesteatótico. La representación macroscópica de los hígados del grupo donde se evaluó el efecto de la molécula muestra que hay una disminución en la coloración amarillenta, esto se puede constatar nuevamente en la histología del grupo en cuestión, así como en el peso de los hígados de las ratas, donde se puede deducir que hubo una disminución de la acumulación de lípidos en el hígado.

A pesar de los resultados anteriormente mencionados, uno de los objetivos principales del presente trabajo es desarrollar un modelo novedoso de esteatohepatitis no alcohólica, por lo cual se decidió modificar el modelo utilizando nuevamente al CCl_4 como inductor químico, a continuación, se muestran los cambios realizados al experimento.

9 Nuevo modelo para la inducción de esteatohepatitis no alcohólica

De acuerdo con estudios anteriormente realizados, se decidió utilizar la dieta hipercolesterolémica utilizada en 1986 por Matsuda y colaboradores⁵², la cual consiste en:

Ingredientes	Fórmula (%)
Colesterol	1.0
Colato de sodio	0.5
Mantequilla	5.0
Sacarosa	30.0
Caseína	10.0
Rat Chow	53.5

A la anterior dieta se le añadió carboximetilcelulosa al 0.3% para lograr una pasta y poder fabricar los pellets que se dieron *ad libitum* a los animales de los grupos correspondientes.

El experimento se realizó en un cuarto aislado del ruido, con la temperatura y luz controlados. Se formaron 4 grupos de estudio con una n de 12 animales cada uno y se distribuyeron de manera aleatoria.

Las ratas fueron colocadas en 12 cajas, las cuales contenían 4 animales cada una, los animales estuvieron en un periodo de adaptación de una semana de duración antes de iniciar el experimento.

Una vez concluida la semana de adaptación, las ratas fueron pesadas y se registró su peso inicial, posteriormente fueron administradas como se indica a continuación:

GRUPOS:

Control: Se les administró por vía intraperitoneal 0.25 mL de vehículo (petrolato), durante 15 semanas dos veces al día.

Dieta: Administración por vía intraperitoneal del vehículo durante 15 semanas en conjunto con la dieta *ad libitum* descrita anteriormente⁵².

CCl₄: Administración de 0.25 mL de tetracloruro de carbono disuelto en petrolato cada semana por 15 semanas siguiendo el siguiente esquema:

Semana	Dilución
1	1:7
2	1:6
3	1:5
4	1:4
5	1:3
6-15	1:3

Dieta + CCl₄: Administración *ad libitum* de la dieta reportada por Matsuda⁵² además de una dosis semanal de CCl₄ durante 15 semanas siguiendo el esquema ya mencionado.

10 Resultados

10.1 Efecto del tratamiento sobre la esteatosis hepática

Se realizó un análisis histológico para verificar los cambios en el parénquima hepático utilizando la tinción de hematoxilina y eosina (Figura 19).

La apariencia macroscópica del hígado representativo del grupo control es normal donde se observa una coloración café-rojiza característica del órgano, en cuanto a la histología muestra que el parénquima hepático del grupo control no presenta alteración alguna.

El grupo de CCl₄ muestra un hígado aparentemente normal ya que la apariencia macroscópica es muy similar al grupo control, mientras que el parénquima hepático no muestra un cambio aparente.

Por otra parte, la administración de la dieta favorece la coloración amarilla-blanquecina que indica una posible esteatosis, esto se correlaciona con la histología representativa del grupo, donde se observa que la dieta provoca una alteración significativa en la morfología hepática donde se favorece la acumulación de lípidos en el hígado en forma de microvesículas, así como la descentralización del núcleo. Asimismo, la administración de la dieta en conjunto con el CCl₄ favorece aún más la acumulación de lípidos y se observa un hígado de coloración amarillo-blanquecina, similar al grupo de dieta, sin embargo, al observar la histología se puede apreciar que la cantidad de microvesículas es menor, con un mayor porcentaje de macrovesículas, lo cual puede indicar que el CCl₄ favorece la esteatosis.

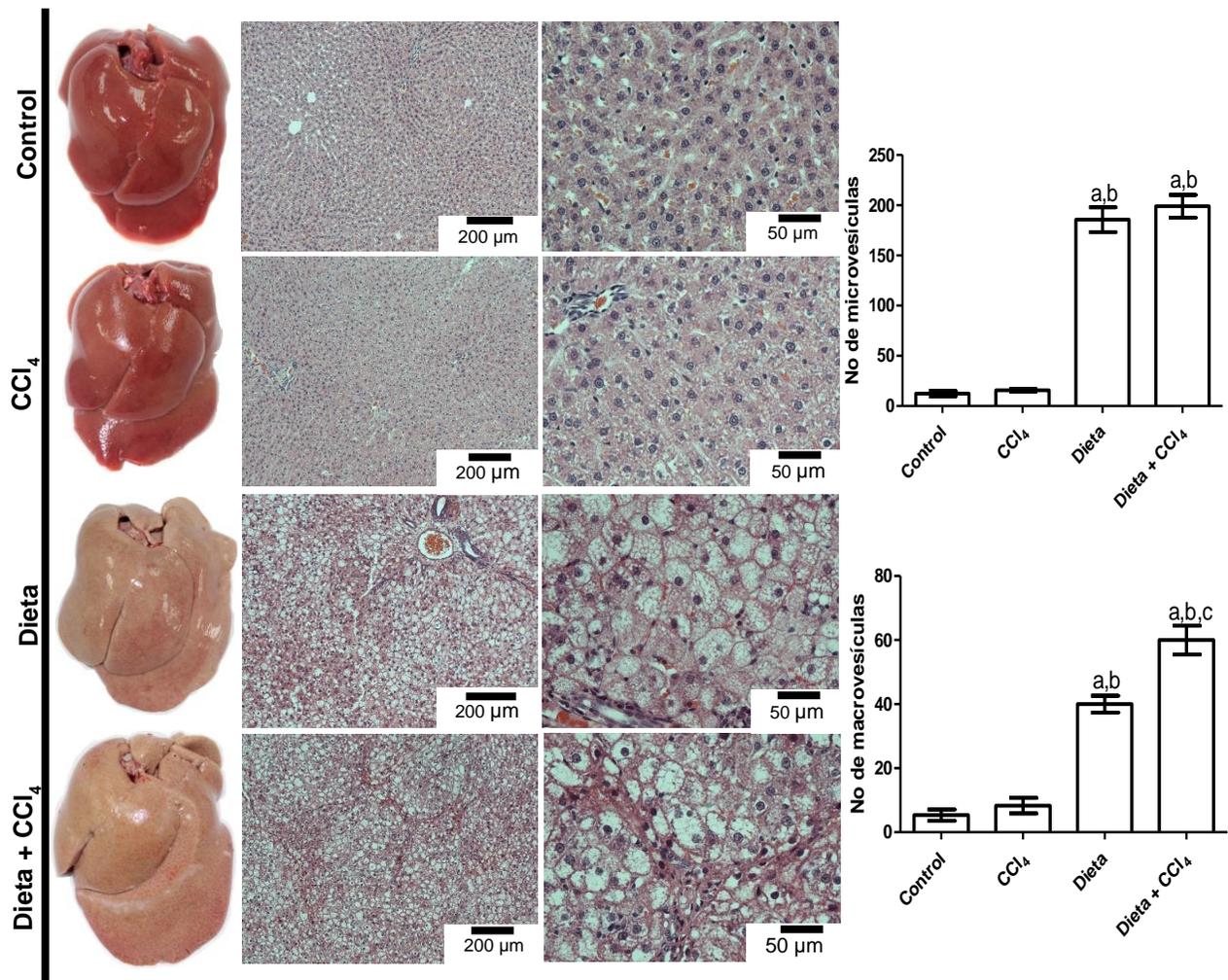
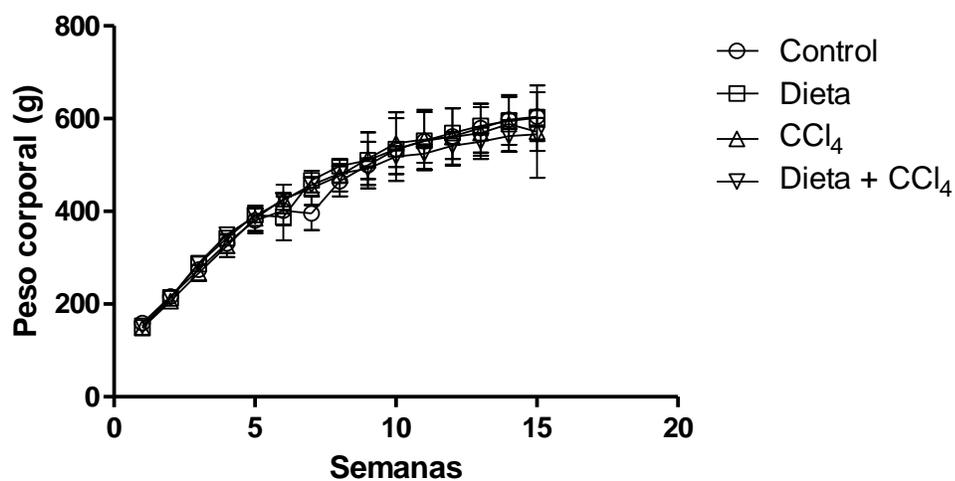


Figura 19. **La administración de la dieta aparentemente favorece la acumulación de lípidos en los hepatocitos.** Efecto de la dieta en la estructura macroscópica y microscópica del hígado en ratas Control, tratadas con CCl₄, tratadas con la Dieta y ratas tratadas con la Dieta + CCl₄ (Tinción H&E). Los histogramas representan el contenido de microvesículas y macrovesículas de lípidos en el hígado en ratas Control, ratas tratadas con CCl₄, ratas administradas con la Dieta y ratas tratadas con la Dieta + CCl₄.

10.2 Efecto del tratamiento sobre el peso corporal de las ratas

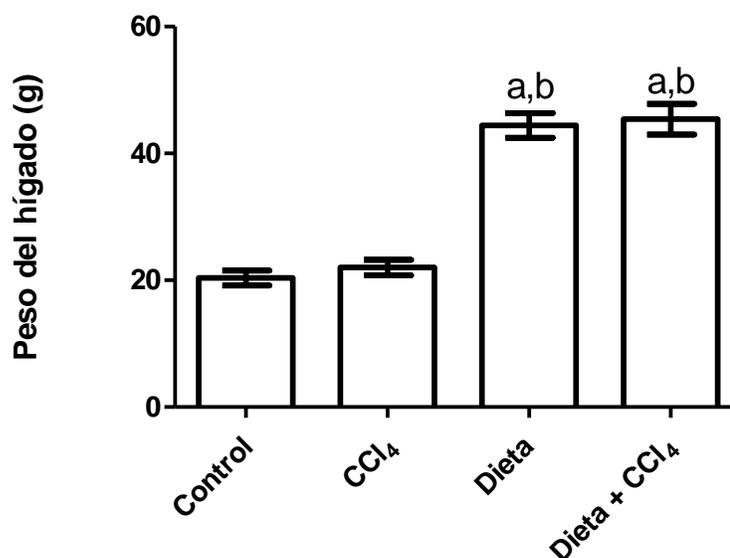
Al inicio del experimento las ratas tuvieron un peso de 170- 180 g, mientras que al término de este el peso osciló entre 500-580 g, no hubo una diferencia significativa entre los grupos de estudio (Gráfica 8).



Gráfica 8. Efecto de la dieta sobre el peso de las ratas a lo largo del periodo de estudio. Cada punto representa la media de los valores de los pesos a lo largo de 16 semanas \pm SEM (n=8). No se encontraron diferencias significativas.

10.3 Efecto del tratamiento sobre el peso de los hígados

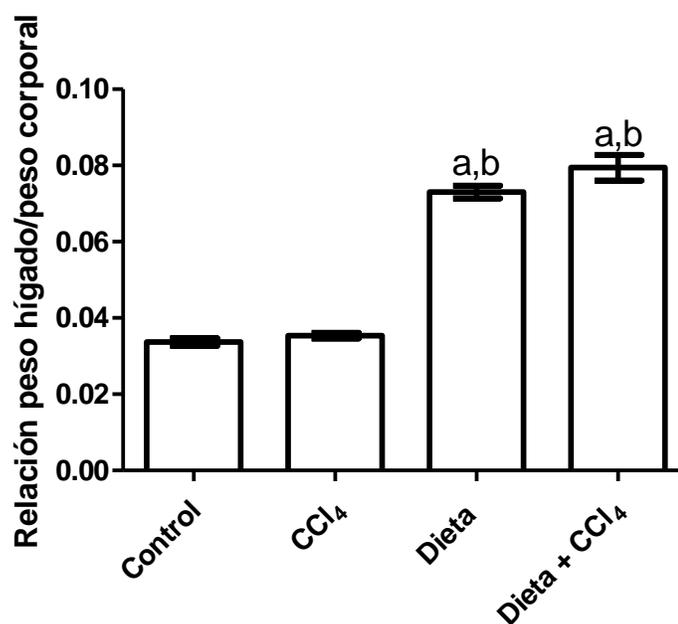
La siguiente gráfica muestra el peso de los hígados a lo largo del periodo de estudio, se observa que la dieta aparentemente promovió la esteatosis hepática favoreciendo el aumento del peso de los hígados, teniendo una diferencia significativa respecto al grupo control. Por otra parte, el CCl₄ por sí mismo aparentemente no tuvo efecto sobre este parámetro mientras que la administración conjunta de la dieta + CCl₄ nuevamente favoreció el depósito de grasa en el órgano teniendo una diferencia significativa respecto al grupo control (Gráfica 9).



Gráfica 9. Efecto de la dieta sobre el peso de los hígados de las ratas a lo largo del periodo de estudio. Cada barra representa la media de los valores de los pesos a lo largo de 16 semanas \pm SEM (n=8). (a): $p \leq 0.05$ comparada con el grupo control; (b): $p \leq 0.05$ comparado con el grupo CCl₄.

10.4 Relación peso del hígado/ peso corporal

Una manera de normalizar los datos obtenidos es realizando una relación, la siguiente gráfica muestra la relación del peso del hígado de las ratas sobre su peso corporal (Gráfica 10), aparentemente el CCl₄ no tuvo una actividad significativa sobre este cociente, por otra parte, se puede observar que el grupo de dieta la relación aumenta al doble teniendo una diferencia significativa respecto al grupo control de manera similar con el grupo de dieta + CCl₄, sin embargo entre ellos no existe ninguna diferencia estadísticamente significativa

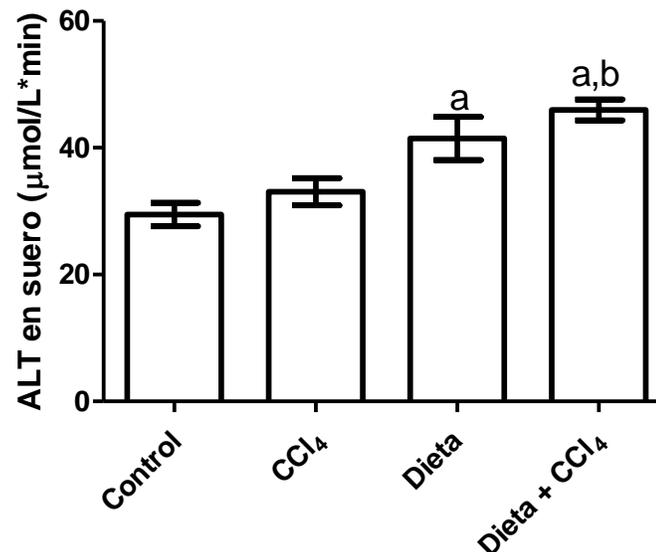


Gráfica 10. Relación peso del hígado/peso corporal de las ratas al final del periodo de estudio. Cada barra representa la media de los valores de la semana 16 ± SEM (n=8). (a): $p \leq 0.05$ comparada con el grupo control; (b): $p \leq 0.05$ comparado con el grupo CCl₄.

10.5 Actividad enzimática de la alanino aminotransferasa, fosfatasa alcalina y γ -glutamyl transpeptidasa

10.5.1 Actividad enzimática de la alanino aminotransferasa

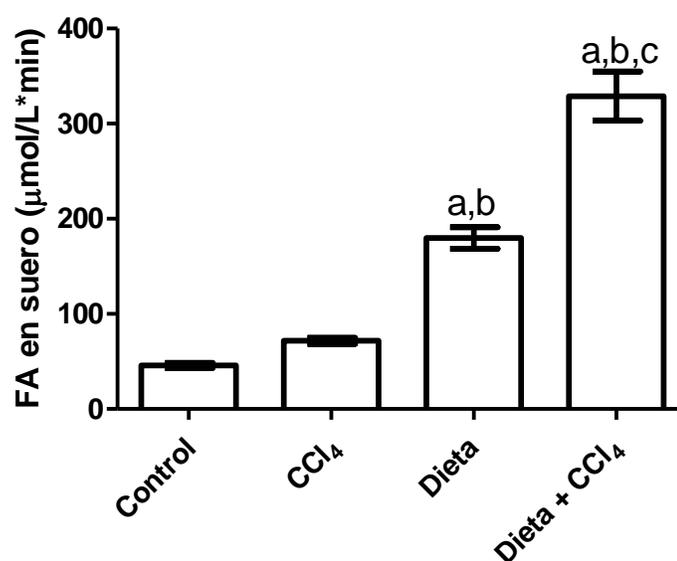
En cuanto a este marcador de necrosis, se observa que en la gráfica 11 que la actividad de la enzima aumentó significativamente durante el periodo de experimentación (16 semanas) en el grupo de dieta y dieta + CCl₄, ambos teniendo una diferencia significativa respecto al grupo control, por otra parte, el CCl₄ no tuvo efecto sobre este parámetro.



Gráfica 11. Actividad de la enzima alanino aminotransferasa (ALT) en suero de ratas control, ratas administradas con CCl₄, ratas alimentadas con la Dieta y ratas tratadas con la Dieta + CCl₄. Cada barra representa la media de los valores de las pruebas realizadas por duplicado \pm SEM (n=8). (a): $p \leq 0.05$ comparada con el grupo control; (b): $p \leq 0.05$ comparado con el grupo CCl₄.

10.5.2 Actividad enzimática de la fosfatasa alcalina

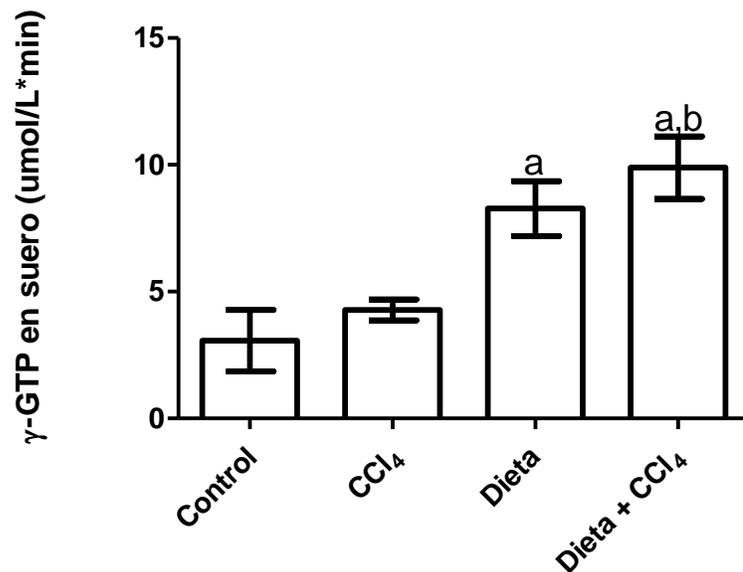
En la gráfica 12, se observa que la dieta por sí sola ocasiona un aumento significativo en la actividad de la enzima, mientras que el CCl₄ no tiene ningún efecto sobre ésta. Por otra parte, se muestra que en la actividad de esta enzima en el grupo de dieta + CCl₄ hubo un aumento significativo respecto al grupo control, sin embargo, también existe una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo dieta y dieta + CCl₄, lo que nos sugiere que la dieta por sí sola es capaz de producir colestasis siendo con mayor intensidad cuando se administra en conjunto con el CCl₄,



Gráfica 12. Actividad de la enzima fosfatasa alcalina (FA) en suero de ratas Control, tratadas con la Dieta, tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄) y tratadas con la Dieta + CCl₄. Cada barra representa la media de los valores de las pruebas realizadas por duplicado \pm SEM (n=8). (a): $p \leq 0.05$ comparada con el grupo control; (b): $p \leq 0.05$ comparado con el grupo CCl₄, (c): $p \leq 0.05$ comparada con el grupo Dieta.

10.5.3 Actividad enzimática de la γ -glutamil transpeptidasa

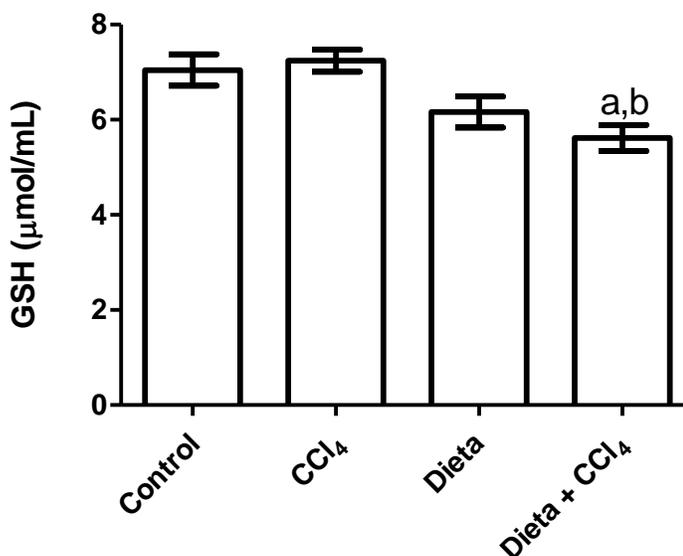
En la gráfica 13 se observa que la actividad de la enzima γ -GTP aumentó significativamente en los grupos dieta y dieta + CCl_4 , siendo mayor en el grupo al que se le administró la dieta en conjunto con el CCl_4 , sugiriendo que el CCl_4 potencia la colestasis, por otra parte, la dosis administrada de CCl_4 aparentemente no causa ningún efecto sobre este parámetro.



Gráfica 13. Actividad de la enzima γ -glutamil transpeptidasa en suero de ratas Control, tratadas con la Dieta, tratadas con tetracloruro de carbono (CCl_4) y tratadas con la Dieta + CCl_4 . Cada barra representa la media de los valores de las pruebas realizadas por duplicado \pm SEM (n=8). (a): $p \leq 0.05$ comparada con el grupo control; (b): $p \leq 0.05$ comparado con el grupo CCl_4 .

10.6 Determinación del glutatión reducido hepático

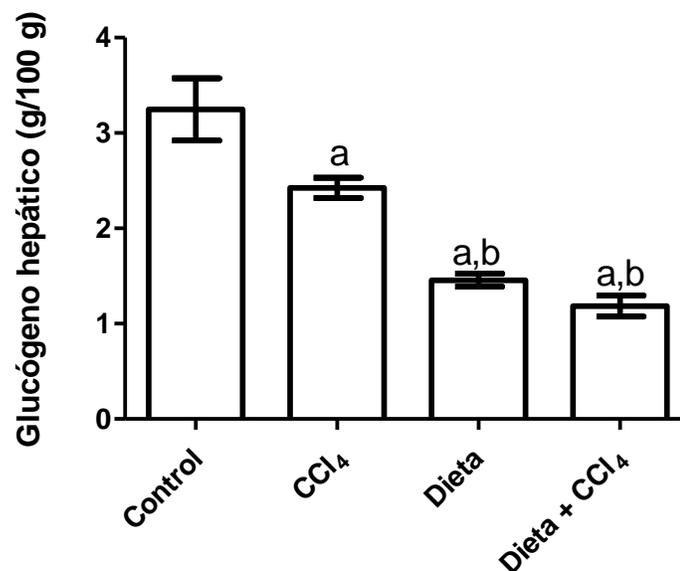
La gráfica 14 muestra que la administración de la dieta no tiene un efecto en los niveles de glutatión reducido hepático. Por otra parte, se observa que la administración del CCl₄ por sí solo no tiene algún efecto sobre este parámetro, pero que al ser administrado en conjunto con la dieta se observa un decaimiento significativo comparado con el grupo control, lo que nos puede indicar que el CCl₄ está cumpliendo su función como potenciador químico ya que también existe una diferencia significativa entre este último grupo y el grupo que fue administrado únicamente con la dieta,



Gráfica 14. Determinación de glutatión reducido en el hígado de ratas Control, tratadas con la Dieta, tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄) y tratadas con la Dieta + CCl₄. Cada barra representa la media de los valores de las pruebas realizadas por duplicado \pm SEM (n=8). (a): $p \leq 0.05$ comparada con el grupo control; (b): $p \leq 0.05$ comparado con el grupo CCl₄.

10.6.1 Efecto del tratamiento sobre la capacidad biosintética del hígado

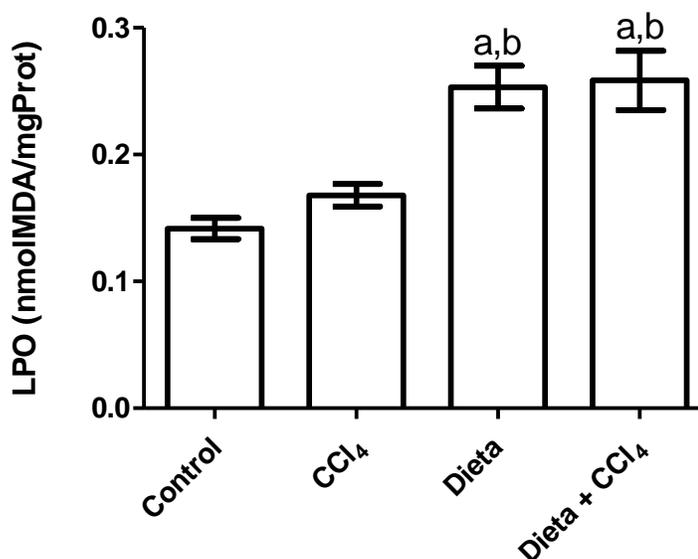
La gráfica muestra 15 que la administración de la dieta afecta significativamente la capacidad biosintética del órgano, por otra parte, se observa que hay un efecto negativo con la administración de la dieta + CCl₄ teniendo una diferencia significativa respecto al grupo control, es decir, que la administración de la dieta en conjunto con el CCl₄ es capaz de alterar la función de almacenamiento de glucógeno en este órgano,



Gráfica 15. Contenido de glucógeno hepático de ratas Control, tratadas con la Dieta, tratadas con tetracloruro de carbono (CCl₄) y tratadas con la Dieta + CCl₄. Cada barra representa la media de los valores de las pruebas realizadas por duplicado \pm SEM (n=8). (a): $p \leq 0.05$ comparada con el grupo control; (b): $p \leq 0.05$ comparado con el grupo CCl₄.

10.6.2 Efecto del tratamiento sobre el estrés oxidante

La peroxidación lipídica se mide por la concentración de malondialdehído (MDA) la cual se eleva significativamente cuando existe un aumento en el estrés oxidante a nivel de membranas celulares. La gráfica 16 muestra que la dieta fue capaz de elevar significativamente la concentración de MDA respecto al grupo control, en el caso del grupo dieta + CCl₄ se puede observar que la dieta en conjunto con la administración del CCl₄ también es capaz de elevar la concentración de MDA a niveles estadísticamente significativos.



Gráfica 16. Determinación de la peroxidación lipídica en el hígado de ratas control, ratas alimentadas con la Dieta, ratas administradas con CCl₄ y tratadas con la Dieta + CCl₄. Cada barra representa la media de los valores de las pruebas realizadas por duplicado \pm SEM (n=8). (a): $p \leq 0.05$ comparada con el grupo control; (b): $p \leq 0.05$ comparado con el grupo CCl₄.

10.6.3 Efecto del tratamiento sobre la cantidad de lípidos en el hígado

En la figura 20 se muestran las imágenes representativas de la tinción de rojo oleoso O, donde la administración del CCl_4 no tuvo gran impacto sobre la acumulación de lípidos en el citoplasma de los hepatocitos, sin embargo, con la administración de la dieta la esteatosis fue evidente, habiendo mayormente microvesículas cerca de la vena central. Interesantemente, en el grupo administrado con la dieta en conjunto con el CCl_4 , la esteatosis se hace más evidente, dónde prevalecen las macrovesículas de igual manera cerca de la vena central, esto se corrobora con el análisis cuantitativo de la coloración rojiza representado en el histograma.

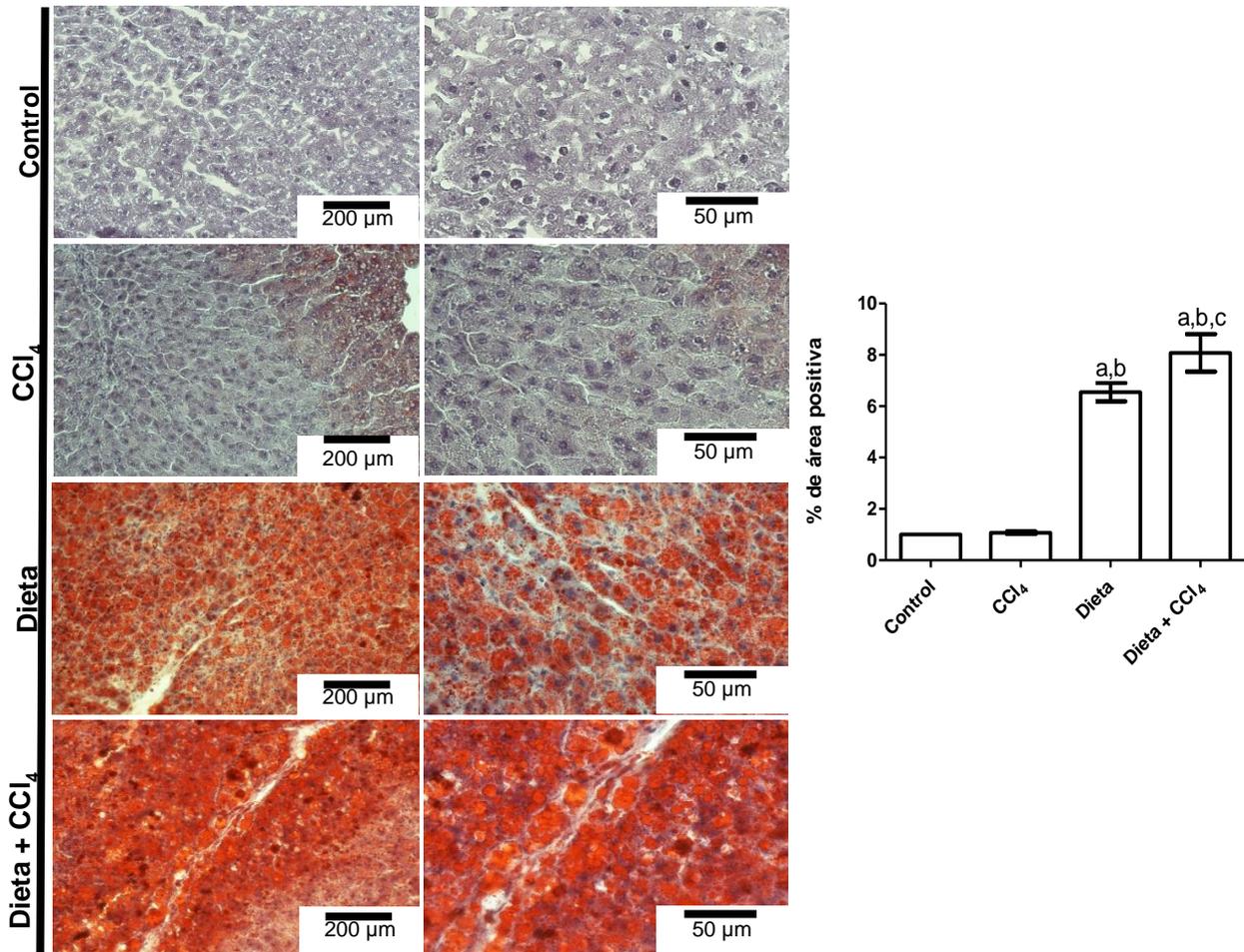
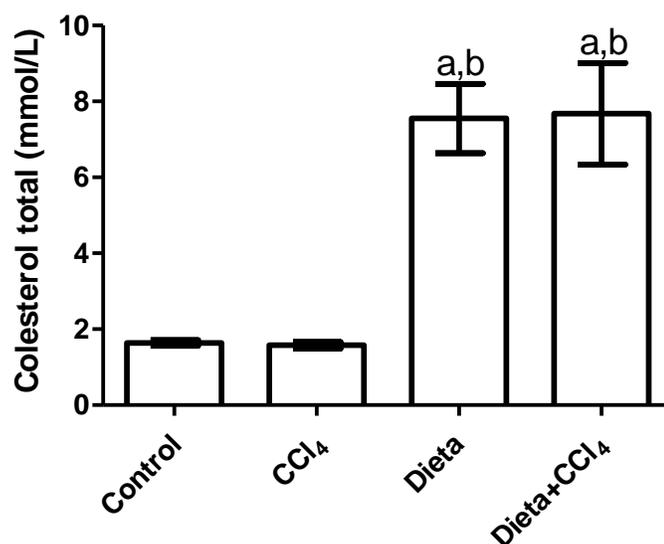


Figura 20. **La administración de la dieta favoreció la acumulación de lípidos en los hepatocitos y se potencia con la administración concomitante del CCl₄.** Los paneles muestran las histologías de cada grupo de estudio teñidas con rojo oleoso “O”. La gráfica muestra el porcentaje de área positiva a la coloración rojiza de ratas control, ratas administradas con CCl₄, ratas alimentadas con la Dieta y tratadas con la Dieta + CCl₄. Cada barra representa la media de los valores de las pruebas realizadas por duplicado \pm SEM (n=3). (a): $p \leq 0.05$ comparada con el grupo control; (b): $p \leq 0.05$ comparado con el grupo CCl₄, (c): $p \leq 0.05$ comparada con el grupo Dieta.

10.6.4 Efecto del modelo sobre el colesterol total

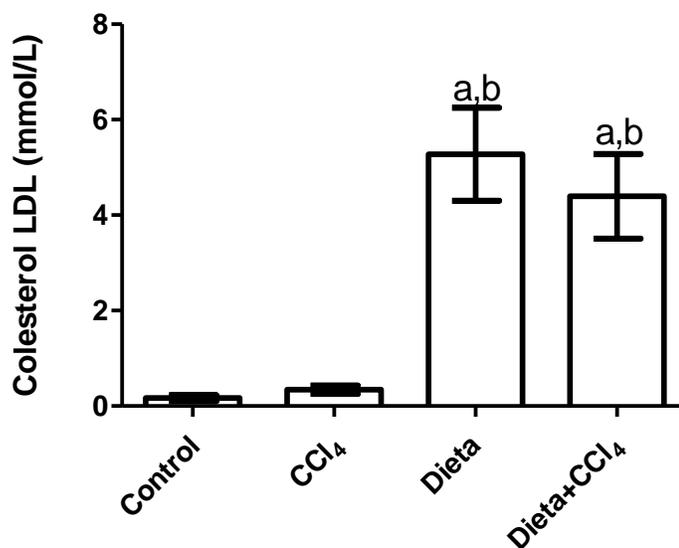
Respecto a los resultados obtenidos en la determinación del colesterol total en suero sanguíneo, se observa que el CCl₄ no tuvo efecto aparente sobre los parámetros de colesterol. Sin embargo, la dieta por si sola fue capaz de aumentar los niveles circulantes del esterol, obteniéndose un resultado similar al ser administrada la dieta en conjunto con el hepatotóxico (Gráfica 17).



Gráfica 17. Determinación del colesterol total en suero de ratas control, ratas administradas con CCl₄, ratas alimentadas con la Dieta y ratas tratadas con la Dieta + CCl₄. Cada barra representa la media de los valores de las pruebas realizadas por duplicado \pm SEM (n=8). (a): $p \leq 0.05$ comparada con el grupo control; (b): $p \leq 0.05$ comparado con el grupo CCl₄.

10.6.5 Efecto del modelo sobre el colesterol LDL

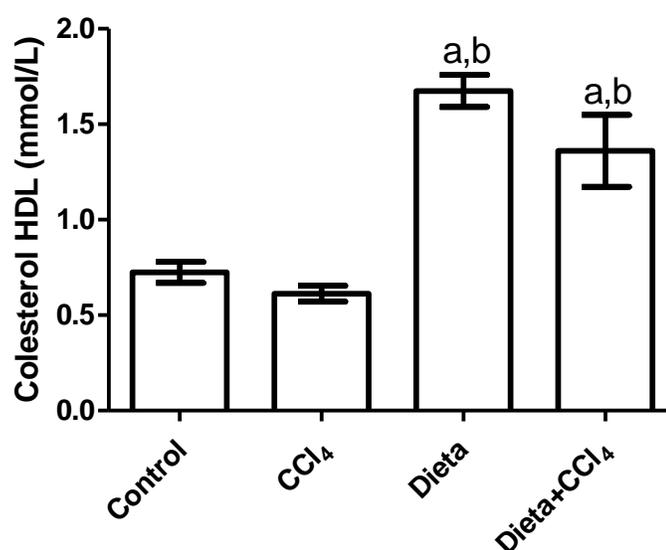
En la gráfica 18 se observa que hay un aumento de los niveles séricos de colesterol LDL, siendo estadísticamente significativo en los grupos de dieta y dieta + CCl₄ respecto a los grupos controles, lo que nos indica que el modelo es capaz de favorecer la dislipidemia y posiblemente favorezca la aparición de lípidos tóxicos.



Gráfica 18. Determinación de colesterol LDL mediante la fórmula de Friedewald en suero de ratas control, ratas administradas con CCl₄, ratas alimentadas con la Dieta y ratas tratadas con la Dieta + CCl₄. Cada barra representa la media de los valores de las pruebas realizadas por duplicado \pm SEM (n=8). (a): $p \leq 0.05$ comparada con el grupo control; (b): $p \leq 0.05$ comparado con el grupo CCl₄.

10.6.6 Efecto del modelo sobre el colesterol HDL

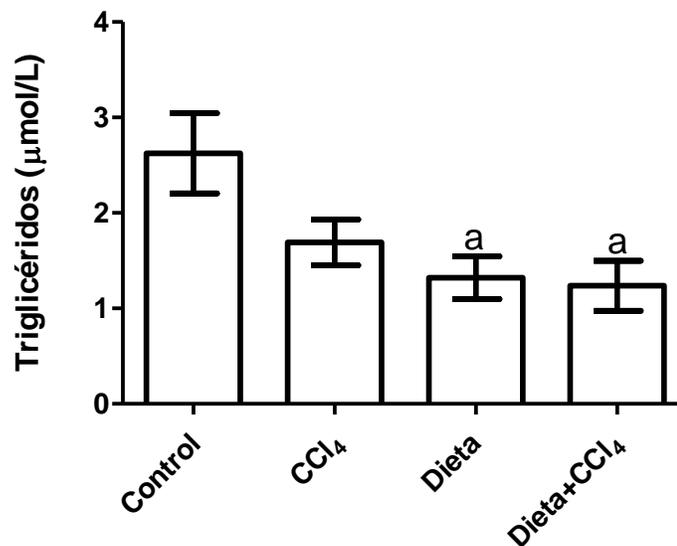
La gráfica 19 muestra los niveles de colesterol HDL de los animales tratados durante 15 semanas. Los niveles de este lípido de los animales que fueron tratados únicamente con la dieta fueron significativamente mayores a los niveles observados en las ratas del grupo control y del grupo administrado únicamente con el CCl₄, por otra parte, los niveles de colesterol HDL del grupo administrado con la dieta en conjunto con el CCl₄ muestran una tendencia similar al tener una diferencia estadísticamente significativa comparados con los grupos Control y CCl₄.



Gráfica 19. Determinación de colesterol HDL en suero de ratas Control, ratas administradas con CCl₄, ratas alimentadas con la Dieta y ratas tratadas con la Dieta + CCl₄. Cada barra representa la media de los valores de las pruebas realizadas por duplicado \pm SEM (n=8). (a): $p \leq 0.05$ comparada con el grupo control; (b): $p \leq 0.05$ comparado con el grupo CCl₄.

10.6.7 Efecto del modelo sobre los triglicéridos

La gráfica 20 muestra el contenido de triglicéridos (TG) en suero sanguíneo de las ratas en experimentación. Los datos indicaron que la dieta por si sola fue capaz de disminuir significativamente los niveles de TG, respecto al grupo Control, mientras que el grupo de dieta + CCl₄ tuvo un resultado similar, es decir, los niveles fueron más bajos y estadísticamente diferentes respecto al grupo Control.



Gráfica 20. Efecto del tratamiento sobre los niveles séricos de triglicéridos de ratas Control, ratas administradas con CCl₄, ratas alimentadas con la Dieta y ratas tratadas con la Dieta + CCl₄. Cada barra representa la media de los valores de las pruebas realizadas por duplicado \pm SEM (n=8). (a): $p \leq 0.05$ comparada con el grupo control.

10.6.8 El tratamiento favoreció la síntesis de la colágena

La cuantificación del contenido de colágena estima la cantidad de fibrosis que presenta el hígado después de un daño crónico que pudo ser inducido por diversos hepatotóxicos.

Se puede observar en la figura 21, en las imágenes representativas de la tinción tricrómica de Masson que la dieta fue capaz de producir fibrosis hepática al aumentar las bandas de colágena, principalmente alrededor de las venas centrales, siendo esto más marcado en el grupo de animales a los cuales se les administró la dieta en conjunto con el CCl₄, mientras que el histograma muestra que los niveles de colágena aumentaron únicamente cuando se administra de manera concomitante con la dieta, por otra parte, las ratas tratadas únicamente con CCl₄ no tuvieron cambios significativos en el contenido de colágena.

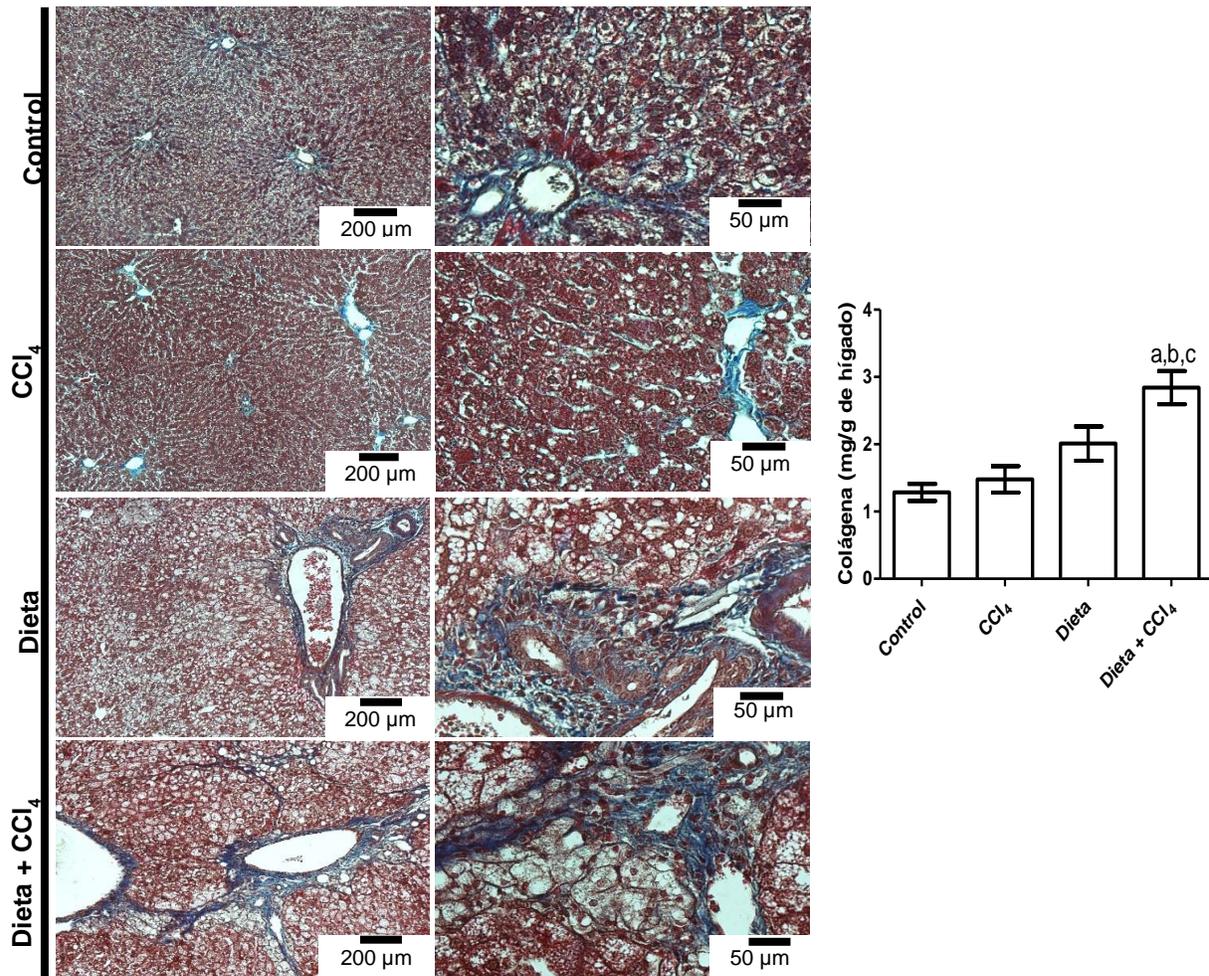


Figura 21. Efecto del tratamiento sobre la deposición de matriz extracelular en el parénquima hepático. Los paneles muestran la tinción tricrómica de Masson de las ratas Control, administradas con CCl₄, ratas tratadas con la Dieta y ratas tratadas con la Dieta + CCl₄. El histograma representa el contenido de colágena en el hígado en ratas Control, ratas tratadas con CCl₄, ratas administradas con la Dieta y ratas tratadas con la Dieta + CCl₄. Cada barra representa la media de los valores de las pruebas realizadas por duplicado \pm SEM (n=8). (a): $p \leq 0.05$ comparada con el grupo control; (b): $p \leq 0.05$ comparado con el grupo CCl₄, (c): $p \leq 0.05$ comparada con el grupo Dieta.

10.6.9 Efecto del tratamiento sobre la remodelación de la matriz extracelular

Con la administración de únicamente la dieta la actividad de la metaloproteasa 2 aumentó significativamente respecto al grupo control, sin embargo, en el caso de la metaloproteinasas 9 fue necesaria la administración de la dieta en conjunto con el CCl₄ para poder observar un aumento significativo respecto al grupo control, por otra parte, la administración de CCl₄, por sí solo, pareciera no tener efecto sobre la actividad de las proteasas 9 y 2 (Fig. 22).

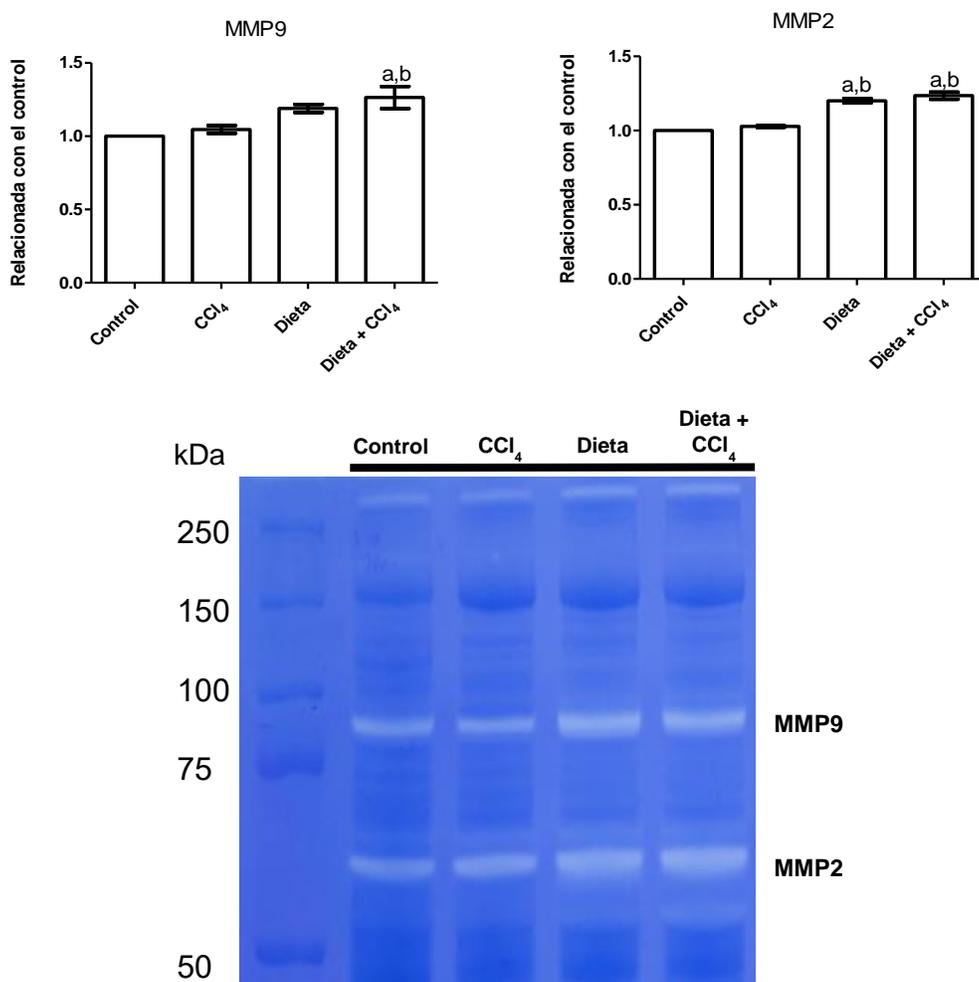


Figura 22. Determinación de la actividad de las metaloproteinasas 9 y 2 en muestras de tejido hepático, mediante la técnica de zimografía de las ratas control, ratas alimentadas con la Dieta, ratas administradas con CCl₄ y tratadas con la Dieta + CCl₄. Cada barra representa la media de los valores de las pruebas realizadas por duplicado \pm SEM (n=8). (a): $p \leq 0.05$ comparada con el grupo control; (b): $p \leq 0.05$ comparado con el grupo CCl₄.

10.7 Efecto del tratamiento sobre la estructura hepática

La microscopía óptica mostró la organización de la estructura del parénquima hepático conservada en los grupos control y CCl_4 , por otra parte, la estructura hepática del grupo dieta muestra una gran cantidad de microvesículas, sin embargo, los cortes semifinos en el grupo de dieta + CCl_4 permitieron apreciar la presencia de grandes gotas lipídicas dentro del citoplasma de los hepatocitos, especialmente a nivel perivenular (Fig. 23).

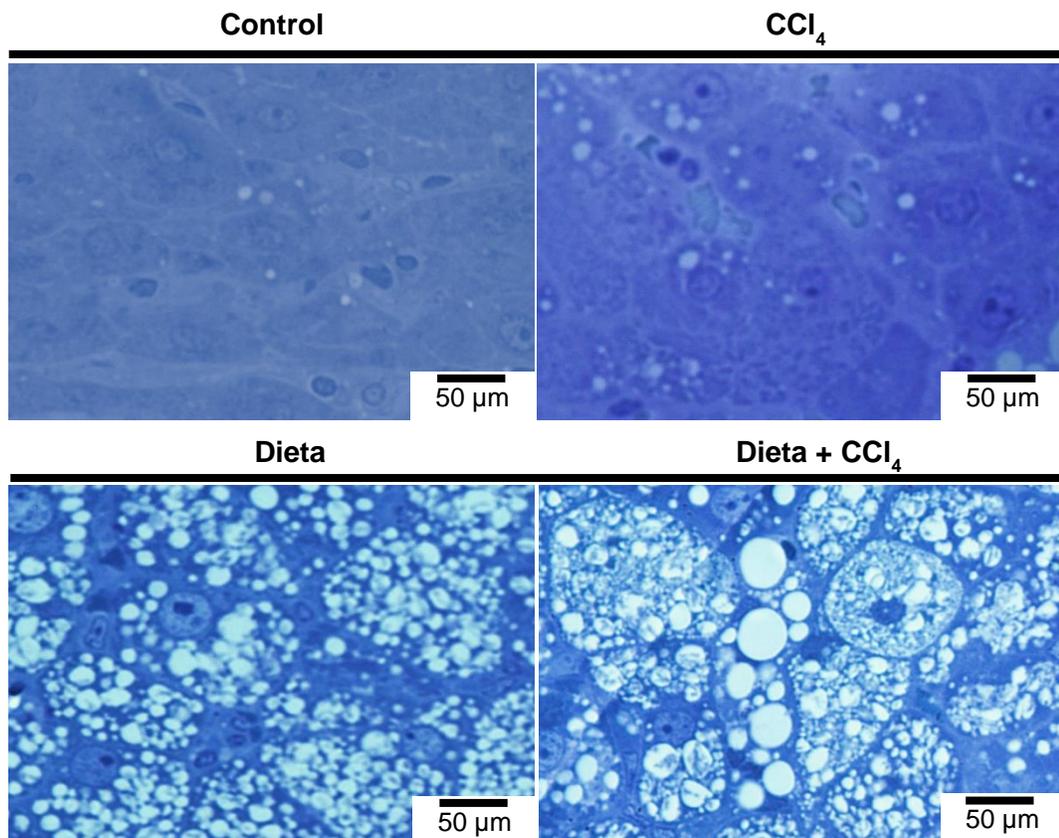


Figura 23. Imagen estructural en donde se observa la conservación de la arquitectura del parénquima hepático en los grupos Control y CCl_4 , así como la existencia de micro y macrovesículas en el citoplasma de los hepatocitos en los grupos Dieta y Dieta + CCl_4 .

11. Discusión

La importancia de la nutrición y la actividad física de la población ha crecido en la última década debido a que diversos campos de la medicina se han interesado en estos dos aspectos⁵³.

Diversos estudios que se han realizado muestran una estrecha relación entre la cantidad de calorías que se ingiere en la dieta y el estilo de vida sedentario en el desarrollo de síndrome metabólico, así como la resistencia a la insulina⁵⁴.

Los casos de NASH han aumentado entre la población debido a que existe una epidemia de obesidad a nivel mundial que a su vez permite el desarrollo de resistencia a la insulina, un factor muy importante en la fisiopatología de NASH⁵⁵.

A pesar de los grandes esfuerzos por diversos grupos de investigación para poder desarrollar nuevos modelos de NASH, no se ha logrado obtener un modelo que sea barato y relativamente corto, además de que simule lo que pasa en el ser humano. En el presente estudio se trató de desarrollar NASH con dos modelos diferentes, los cuales compartían algo en común: el colesterol, azúcares y las grasas saturadas, se trató de acelerar el proceso de la enfermedad utilizando un inductor químico, en este caso el tetracloruro de carbono.

Por otra parte, el esteviósido es un glucósido diterpenoide con diversos antecedentes sobre sus efectos sobre las células β del páncreas, favoreciendo la secreción de insulina y reduciendo la resistencia a esta proteína manteniendo niveles adecuados de glucosa en sangre, también se ha descrito que favorece la activación de la lipasa hepática por lo que los niveles de lípidos disminuyen hasta a niveles normales²⁶. Además, existen reportes que demuestran que el esteviósido tiene un efecto positivo sobre el Nrf2, actuando así como antioxidante⁴³, incrementando la capacidad antioxidante endógena, por lo cual nosotros lo propusimos como posible fármaco para tratar al hígado graso no alcohólico.

Modelo de dieta aterogénica líquida y efecto del esteviósido

Con anterioridad se ha utilizado al CCl₄ como agente causal de fibrosis hepática siguiendo un protocolo de tres administraciones semanales de 400 mg/kg⁵⁶, sin embargo, en el año 2018, un grupo de investigadores liderado por Scott Friedman¹¹, utilizó este agente como potenciador químico para desarrollar primeramente NASH (12 semanas) y posteriormente HCC (24 semanas), reduciendo significativamente el tiempo para poder generar NASH.

Sin embargo, el problema seguía radicando en los costos del tipo de alimento que se utiliza para provocar la enfermedad a los animales de experimentación, ya que las dietas comerciales para este fin son muy costosas.

El daño causado por CCl₄ está estrechamente asociado a la producción de radicales libres que alteran a diversos organelos como la mitocondria, el retículo endoplásmico y la membrana plasmática⁵⁷, teniendo como resultado un daño a las células hepáticas y como consecuencia final la activación de HSCs para favorecer la síntesis de MEC. Sin embargo, la hipótesis del desarrollo de NASH incluye un complejo sistema de alteraciones en diversas vías de señalización. Sabiendo lo anterior se planteó el utilizar una dieta líquida con alto contenido de colesterol, grasas saturadas, fructosa y CCl₄ administrado intraperitonealmente para que fungiera un papel como inductor químico.

La teoría multifactorial⁵ que actualmente ha ganado terreno en la descripción de la patofisiología de NASH explica que hay alteraciones a nivel metabólico, inmunológico, genético y endócrino. La teoría indica que existen numerosas vías actuando de manera conjunta, entre ellas sobresalen el metabolismo anormal de los lípidos, estrés en el retículo endoplásmico, disfunción mitocondrial, respuesta inmunológica alterada y un desbalance en la microbiota⁵.

Con el alto contenido de grasas saturadas, colesterol y fructosa se trató de imitar el tipo de dieta que consumen las personas, favoreciendo el síndrome metabólico y la secreción de citocinas pro-inflamatorias.

La administración de una dosis de 400 mg/kg de CCl₄ administrada una vez por semana se esperaba que favoreciese la formación de radicales libres, sin embargo,

la dosis administrada no sería suficiente para causar un daño *per se*, sino que únicamente estaría tomando un papel como potenciador químico.

En cuanto a los resultados del peso corporal obtenidos con este modelo para inducir NASH mostraron resultados similares a los obtenidos por Kučera y colaboradores en el 2011⁵⁸, dónde no hubo un incremento significativo en el peso corporal al final del estudio, a pesar de que el contenido de colesterol, grasas saturadas y fructosa eran altos, lo cual puede estar relacionado con la capacidad de las ratas jóvenes para incrementar el gasto de energía produciendo un aumento en la temperatura corporal⁵⁹ o se le puede atribuir a que el consumo de carbohidratos, en este caso la sacarosa, reduce significativamente el apetito y favorece la saciedad, haciendo que el consumo del alimento sólido disminuyera; un resultado similar fue publicado por Acosta-Cota⁶⁰.

Por otra parte, el peso de los hígados de los grupos administrados con la dieta y la Dieta + CCl₄ tuvieron un aumento significativo en comparación con los demás grupos experimentales, esto posiblemente debido a la deposición de grasa en el órgano⁶¹. Se sabe que el hígado está involucrado en diversas reacciones metabólicas, cuando existe una resistencia a la insulina la lipoprotein lipasa no es activada correctamente lo que provoca que haya un incremento en la síntesis de triglicéridos y por ende presencia de esteatosis en el hígado⁶². Por otra parte, el esteviósido fue capaz de proteger al hígado al no permitir una acumulación exagerada de lípidos en el órgano. Holvoet y colaboradores explican este efecto antiesteatósico, el esteviósido al aumentar la sensibilidad a la insulina favorece la diferenciación del tejido adiposo, teniendo como resultado un aumento en la adiponectina y una disminución de la acumulación de lípidos en el hígado⁶³.

Una de las características histológicas importante en el diagnóstico de NASH es la aparición de microvesículas en el citoplasma de los hepatocitos⁶⁴.

De acuerdo con las características macroscópicas de los hígados se observa el evidente cambio de coloración, así como el aumento de peso de los hígados de los grupos que fueron administrados con la dieta líquida.

Por una parte, se sabe que el consumo de carbohidratos, en especial la fructosa, favorece la lipogénesis y a su vez facilita la acumulación de ácidos grasos libres en

el hígado⁶⁵, lo que se puede apreciar como el cambio de coloración de los hígados. Adicionalmente, en las histologías obtenidas del tejido hepático se puede observar que la dieta líquida favorece la acumulación de grasa en el hígado, lo que concuerda con diversos reportes donde los ácidos grasos libres y los carbohidratos, en especial la fructosa favorecen la acumulación lípidos tóxicos⁸.

Por otra parte, el CCl₄, como se esperaba, no favoreció el incremento del número de microvesículas dentro de los hepatocitos, esto se puede confirmar con la histología del grupo administrado con CCl₄, ya que tanto macroscópicamente como microscópicamente el hígado se ve aparentemente normal, sin un cambio en la coloración característica del órgano ni del parénquima hepático. Por otro lado, cuando el CCl₄ es administrado en conjunto con la dieta el porcentaje de microvesículas aumenta, siendo los resultados muy similares a los obtenidos por Tsuchida y colaboradores¹¹.

La administración del esteviósido pareció ser suficiente para disminuir la esteatosis y esto se puede verificar tanto en la coloración macroscópica del hígado como en la histología donde las microvesículas disminuyeron en el grupo administrado con el glucósido del esteviol. El efecto antiesteatótico del esteviósido puede deberse al efecto que tiene este compuesto sobre el metabolismo de los carbohidratos en el hígado, donde se ha descrito que incrementa la actividad de Foxo1, G6pc, Insr, Irs2, mTor entre otras proteínas que están asociadas al catabolismo, almacén y transporte de los lípidos⁶⁶.

Por otro lado, uno de los biomarcadores más utilizados cuando se habla de daño hepático es la enzima ALT, que normalmente se encuentra en el citosol de los hepatocitos, pero es liberada hacia el torrente sanguíneo cuando aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática, por lo tanto, cuando hay niveles plasmáticos altos de esta enzima se dice que hay necrosis en las células hepáticas⁶⁷.

En el presente trabajo la administración de la dieta líquida sola o en combinación con el CCl₄ no fue capaz de elevar significativamente la actividad de la enzima ALT, posiblemente debido a que el daño inducido causó acumulación de lípidos en el parénquima hepático, pero no fue capaz de producir necrosis como sucedió con la

dieta líquida reportada por Zou y colaboradores⁶⁸. Tanto la dieta utilizada por Zou como la que se empleó en el presente estudio fueron dietas líquidas y con alto contenido de grasas y colesterol. Sin embargo, la diferencia radica en el contenido de colato de sodio, el cual está relacionado con una mejor absorción de colesterol, por lo tanto, se infiere que al no haber suficientes niveles séricos del esteroide en el organismo de los animales el daño no es tan marcado como para causar necrosis en los hepatocitos.

En cuanto a los marcadores de colestasis, la administración de la dieta aumentó la actividad de la enzima FA lo que indica una posible obstrucción de los conductos biliares, probablemente debido a la acumulación de ácidos grasos libres, mientras que la enzima γ -GTP no tuvo un aumento importante.

El glutatión reducido es uno de los antioxidantes endógenos más importantes del organismo y, cuando hay un desbalance en los niveles de radicales libres, el glutatión ejerce su acción para evitar que los radicales libres dañen a las membranas celulares y se produzca un estrés oxidante.

En este sentido, observamos que el tratamiento con la dieta y el CCl₄ fue capaz de provocar un desbalance en las especies reactivas de oxígeno, haciendo que el GSH hepático disminuyera de manera significativa, esto se le puede atribuir a la toxicidad del colesterol y al mecanismo de acción del CCl₄, los cuales se encargan de generar estrés oxidante provocando que los niveles de GSH disminuyan⁶⁹.

Desafortunadamente, el esteviósido no fue capaz de prevenir este efecto probablemente es necesario utilizar una dosis más alta de este compuesto, ya que solo se observó una tendencia que no alcanzó a ser significativa de manera estadística.

Una manera de evaluar el daño hepático es verificando la capacidad biosintética del hígado, la cual puede estimarse por el contenido de glucógeno hepático, ya que una función de este órgano es almacenar energía en forma de glucógeno. En el presente estudio se observó que los animales administrados únicamente con la dieta líquida, así como a los que se les administró la dieta más el inductor químico tuvieron un decremento en la cantidad de glucógeno hepático.

Se sabe que la insulina estimula la actividad de la enzima glucógeno sintasa e inhibe a la glucogenólisis lo cual es muy importante para la producción de glucosa endógena. En este sentido, es posible que en nuestros grupos experimentales exista, una disminución en la actividad de la enzima anteriormente mencionada debido a la pobre captación de insulina por parte de las células hepáticas, lo que a su vez provocaría la disminución de los niveles de glucógeno hepático⁶², sin embargo, es necesario llevar a cabo otros experimentos para investigar estos resultados.

De acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente nosotros concluimos que con la dieta líquida no se logró inducir NASH, ya que no se presentó inflamación, necrosis o fibrosis. Sin embargo, es importante señalar que se logró producir esteatosis hepática, por lo que el modelo pudiera ser de utilidad para investigaciones de hígado graso no alcohólico o el impacto que tiene la alimentación rica en carbohidratos y grasas saturadas sobre el metabolismo hepático.

Debido a que con el modelo de dieta líquida no se logró inducir NASH, en la siguiente sección se discuten los resultados de otro modelo que desarrollamos para este fin.

Nuevo modelo de esteatohepatitis no alcohólica

Este segundo modelo consistió en la administración de una dieta con un porcentaje alto de colesterol, sacarosa y grasas saturadas que representa la dieta de la mayoría de los individuos que padecen NASH, nuevamente se utilizó a el CCl₄ como inductor químico para acelerar el proceso de fibrogenesis que normalmente ocurre después de largos periodos de tiempo⁷⁰.

Para desarrollar este modelo, todas las ratas fueron alimentadas *ad libitum* con la dieta reportada por Matsuda *et al*⁶² durante 15 semanas, el peso de las ratas fue similar a los pesos obtenidos con la administración de la dieta líquida anteriormente mencionada, no hubo diferencia significativa en ninguno de los grupos analizados, probablemente a la capacidad de las ratas jóvenes de facilitar el gasto de energía⁵⁹.

En el año 2018, Tsuchida y colaboradores diseñaron un modelo experimental para reproducir NASH en roedores en un lapso de 12 semanas¹¹. En el modelo se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6J, los cuales fueron administrados con una dieta comercial que contenía 21% de grasas, 41% de azúcar y 1.2% de colesterol. Los animales alimentados con la dieta comercial también fueron administrados con una dosis baja de CCl₄ para acelerar el desarrollo de la enfermedad, los resultados fueron que a las 12 semanas los animales presentaban las características de NASH similares a la enfermedad en humanos y a las 24 semanas desarrollaron HCC¹¹.

Existe evidencia de que la acumulación hepática de colesterol conduce a daño hepático, inflamación y fibrosis en modelos animales⁷¹, en este estudio se demostró que las ratas que fueron alimentadas con colesterol, sacarosa y grasas saturadas tuvieron un aumento en el peso del hígado, probablemente a la acumulación de grasa en el órgano y/o presencia de inflamación, donde tanto la administración de la dieta y la dieta en conjunto con el CCl₄ mostraron resultados similares, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Tsuchida y colaboradores¹¹.

Las imágenes representativas de la tinción de hematoxilina y eosina muestran que el tratamiento con la dieta favoreció la acumulación de lípidos en el citoplasma de los hepatocitos y que la dieta en conjunto con la administración del CCl₄ favoreció la aparición de macrovesículas, teniendo como resultado la inflamación de los hepatocitos y que el núcleo se moviera hacia la periferia indicando un posible balonamiento de los hepatocitos lo que concuerda con la necrosis y el desarrollo de fibrosis reportada por Takaki y colaboradores³.

También se observó inflamación lobular lo que concuerda con el estadio de NASH en humanos, donde se observan esteatosis y fibrosis mayormente en la zona 3⁷².

Por otra parte, la acumulación de lípidos en el hígado favoreció el incremento de la actividad de la ALT, así como la actividad de las enzimas FA y γ -GTP. Como era de esperarse, el CCl₄ mostró un efecto sinérgico al ser administrado en conjunto con la dieta experimental. Además, nuestros resultados pueden deberse, a la acumulación de ácidos grasos libres y colesterol, así como ciertos derivados de otras moléculas que favorecen la lipotoxicidad, lo que contribuye al daño a los hepatocitos y al desarrollo de NASH⁸.

Diversos estudios han demostrado que existe una relación entre el colesterol y el desarrollo y progresión de la fibrosis hepática⁷³. El colesterol libre es capaz de sensibilizar a las HSCs a su activación por medio del TGF- β , haciendo que los TLR4 aumenten y se favorezca la señalización de esta vía⁷³.

Para ayudar a la reabsorción del colesterol y que el daño fuera mayor, a la dieta aterogénica del segundo modelo empleado se le añadió colato de sodio, con la finalidad de favorecer los niveles séricos de colesterol, es decir, impedir que fuera eliminado con facilidad en las heces. Con la modificación mencionada anteriormente se obtuvieron mejores resultados en cuanto a los marcadores de daño hepático como se muestra a continuación.

En cuanto al contenido intrahepático de GSH, se observa que hubo una disminución en el grupo administrado con la dieta en conjunto con el CCl₄, lo que sugiere que existe mayor desbalance redox al administrar CCl₄, del que se sabe que su mecanismo de daño es a través de radicales libres⁵⁶. Es importante mencionar la administración de CCl₄ *per se* no fue capaz de disminuir los niveles de GSH, por lo cual podemos deducir que este compuesto está cumpliendo su función de inductor químico y no está actuando como hepatotóxico al administrarlo en conjunto con la dieta.

Por otra parte, la capacidad biosintética del hígado, estimada por la concentración de glucógeno, se vio disminuida con la dieta, así como con la administración de la dieta en conjunto con el CCl₄, probablemente este efecto esté relacionado con la resistencia a la insulina y la incapacidad de ésta para activar a la enzima glucógeno sintasa⁷².

Cuando se administra el colesterol en combinación con grasas poliinsaturadas, se favorece el estrés oxidante, desencadenando vías proinflamatorias y profibrogénicas en el hígado de roedores⁷⁴. El colesterol es susceptible de sufrir reacciones de oxidación para dar lugar a oxisteroles, estas moléculas se encuentran elevadas en personas que padecen hígado graso, además, los oxisteroles son capaces de activar vías apoptóticas favoreciendo el desarrollo de NASH⁷⁵.

El estrés oxidante a nivel membranal fue cuantificado mediante determinación del grado de LPO. Los resultados indican que, la dieta con o sin la administración del CCl₄ favoreció el aumento de la LPO. Es ampliamente reconocido que los radicales libres causan daño celular y juegan un papel muy importante en las enfermedades hepáticas⁵⁵, por lo que es probable que las ROS hayan sido las responsables de ocasionar daño a las membranas celulares.

Una característica común en las enfermedades es la acumulación de lípidos en el tejido. Entre estas enfermedades se encuentra la NASH, por lo tanto, es necesario realizar técnicas de cuantificación de lípidos como lo es la técnica de rojo oleoso O, dónde se pretende analizar la cantidad de lípidos presentes en el tejido hepático⁷⁶. Las imágenes representativas de la tinción de rojo oleoso O muestran que la acumulación de grasa en el hígado de las ratas administradas con la dieta era mayor que en las ratas control, lo que sugiere que el consumo de una dieta aterogénica conduce al desarrollo de hígado graso no alcohólico⁷⁷ y que la administración de la dieta aterogénica en conjunto con el CCl₄ favorece la aparición de NASH.

Es bien sabido que el consumo de dietas altas en colesterol puede favorecer la aparición de NASH en pacientes con hígado graso no alcohólico⁷⁵. Las ratas que fueron alimentadas con la dieta aterogénica presentaron niveles de colesterol total en suero elevados a comparación de los grupos control, lo que concuerda con el alto contenido de este lípido en la dieta con que fueron alimentados, probablemente debido a un mecanismo de compensación para atenuar la acumulación de colesterol en el hígado⁶⁸.

Por otra parte, las LDL están implicadas en la patogénesis de la aterosclerosis y se ha reportado que sus niveles aumentan en el suero cuando las personas consumen alimentos ricos en colesterol⁷⁸.

En el presente estudio se observa que hay un incremento en esta lipoproteína lo que correlaciona nuevamente con el alto contenido de colesterol de la dieta aterogénica con la que fueron alimentados los animales durante el tiempo de experimentación.

Diversos estudios muestran que los niveles séricos de HDL disminuyen cuando hay dislipidemias; sin embargo, en este caso se observó lo contrario. Este resultado se

puede explicar, debido a que se ha reportado que dependiendo de la etapa en la que se encuentra el avance de la enfermedad, puede existir un incremento en los niveles de HDL⁷⁹. Se ha reportado que existe un incremento en los niveles de HDL en ratas que sufren de colestasis, por lo tanto, hay un aumento en la cantidad de los transportadores para evitar que haya una acumulación de colesterol en los hepatocitos⁷⁹.

En cuanto a los triglicéridos, los niveles séricos disminuyeron en los grupos que fueron tratados con la dieta y la dieta en conjunto con el CCl₄. Probablemente, este resultado se debe a que los triglicéridos se encuentran acumulados en el hígado, y no se liberan al suero explicando así la presencia de hígado graso. Esto se podría correlacionar con el cambio de coloración del hígado, el aumento de peso de este órgano y la cantidad de lípidos encontrados en el citoplasma de los hepatocitos.

La aparición de las bandas de colágena se debe a la activación de las HSC, células que normalmente almacenan vitamina A y que al ser activadas por diversas citocinas como el TGF- β comienzan a expresar una proteína llamada α -SMA⁸⁰, favoreciendo la síntesis de colágena, un proceso muy importante en el desarrollo de la fibrosis.

En el presente estudio se puede observar que la dieta favorece la aparición de bandas de colágena, esto probablemente a que los lípidos tóxicos fueron capaces de favorecer el estrés oxidante, que, a su vez, favoreció la expresión de proteínas profibrogénicas. De manera notable, la fibrosis se vio potenciada con la administración concomitante de la dieta y el CCl₄, dónde este hepatotóxico al parecer está favoreciendo la aparición de NASH, fungiendo como un acelerador de la fibrosis, induciendo un aumento en las bandas de colágena alrededor de las venas centrales¹¹. Lo anterior también concuerda con los reportes de fibrosis alrededor de la zona 3 en pacientes que sufren de NASH⁷².

Por otra parte, la MEC es un medio muy importante para el correcto funcionamiento del hígado, sin embargo, cuando existe un daño hepático, la MEC es capaz de remodelarse y generar una pérdida del parénquima hepático y por ende pérdida del correcto funcionamiento de las células.

Cuando las HSC se encuentran expresando α -SMA también son fuente de MMP9 y MMP2⁴², dos enzimas que participan en la remodelación de la MEC. En este sentido, se observó que la dieta por sí sola no fue capaz de aumentar la actividad de la MMP9, pero que al ser administrada en conjunto con el CCl₄ se favoreció la actividad de esta enzima. En cuanto a la MMP2, se observó que tanto la dieta como la dieta administrada juntamente con el CCl₄ favorecieron la actividad de la enzima. En nuestro caso, el aumento de la actividad de ambas enzimas nos da un indicio de que aparentemente existe una fibrosis incipiente y esto se puede correlacionar con el aumento de la colágena en el hígado.

Por último, se analizó la morfología de los hepatocitos por cortes semifinos mediante microscopía óptica, los resultados que se obtuvieron muestran infiltraciones de lípidos que favorecen la aparición de microvesículas en el grupo que fue administrado con la dieta, generando cambios en los organelos de los hepatocitos. Se observa, además, que el núcleo se mueve hacia la periferia debido a la acumulación de triglicéridos en el citoplasma de los hepatocitos⁸¹. Por otra parte, cuando la cantidad de microvesículas aumenta, éstas se fusionan para formar las llamadas macrovesículas, una característica importante en la fisiopatología de la NASH⁸². Nuestros resultados concuerdan con los de Orlicky y colaboradores⁸³, quienes precisan que la generación de esteatosis se debe principalmente al consumo de grasas y azúcares lo que genera las microvesículas, y que el CCl₄ favorece la unión de estas para formar las macrovesículas, un resultado muy similar al obtenido por Tsuchida y colaboradores¹¹.

En resumen, tal vez la parte más importante de este trabajo es que hemos desarrollado un modelo para reproducir NASH en ratas que tiene características histológicas y bioquímicas similares a la enfermedad en humanos, por lo tanto, pudiera ser un modelo útil para poder profundizar en las vías moleculares del desarrollo de NASH, así como para probar el efecto de diferentes fármacos.

12 Conclusiones

Con el modelo de la dieta líquida administrada en conjunto con el CCl₄, únicamente se logró causar hígado graso simple, debido a la falta de necrosis en los hepatocitos. Por otra parte, el esteviósido aparentemente fue capaz de prevenir la acumulación de lípidos en los hepatocitos.

Con el modelo de la dieta aterogénica administrada en conjunto con el CCl₄ aparentemente se logró producir NASH en los animales de experimentación. El mecanismo por el cual el modelo está causando un daño hepático posiblemente se encuentra asociado a la acumulación de lípidos en el órgano, consecuencia de la administración de la dieta aterogénica y que posteriormente el CCl₄ causa un estrés oxidante por lo cual se eleva la actividad de los marcadores de daño hepático, favoreciendo la producción de MEC y NASH.

13 Perspectivas

- Profundizar en las vías moleculares para verificar la patogénesis del modelo.
- Evaluar las vías proinflamatorias y profibrogénicas (IL-1 β ; IL-6; IL-18; NLRP3; α -SMA; TNF- α ; TGF- β ; MMP13)
- Probar el posible efecto hepatoprotector del esteviósido en el modelo de NASH.

14 Bibliografia

1. Kuntz, E., Kuntz, H., 2006. History of hepatology. Hepatology principles and practice. History, morphology, biochemistry, diagnostics, clinic, therapy. VerlaBerlin Heidelberg. USA. Springer, pp. 1-13.
2. Muriel, P., 2017. The Liver: General Aspects and Epidemiology. In: Muriel, P., editor. Liver Pathophysiology: Therapies and antioxidants. Walthman, MA, USA. Elsevier Inc. pp.3-22.
3. Takaki, A., Kawai, D., Yamamoto, K., 2014. Molecular mechanisms and new treatment strategies for non-alcoholic steatohepatitis (NASH). *Int J Mol Sci.* 5: 7352-7379.
4. Ludwig, J., Viggiano, T., McGill, D., *et al.*, 1980. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc.* 7:434-438.
5. Kutlu, O., Nur-Kaleli, H., Ozer, E., 2018. Molecular pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis-(NASH)- related hepatocellular carcinoma. *Can J Gastroenterol Hepatol.* 18:1-9.
6. Friedman, S., Neuschwander-Tetri, B., Rinella, M., *et al.*, 2018. Mechanisms of NAFLD development and therapeutic strategies. *Nat Med.* 7: 908-922.
7. Lonardo, A., Nascimbeni, F., Maurantonio, M., *et al.*, 2017. Nonalcoholic fatty liver disease: Evolving paradigms. *World J Gastroenterol.* 36: 6571-6592.
8. Neuschwander-Tetri, B., 2010. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: the central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. *Hepatology.* 52:774-788.

9. Matteoni, C., Younossi, Z., Gramlich, T., 1999. Nonalcoholic fatty liver disease: A spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterol.* 116:1413-1419.
10. Herman, M., Kahn, B., 2012. Adipose tissue de novo lipogenesis: Unanticipated benefits in health and disease. *ASBMB.* 2:30-32.
11. Tsuchida, T., Lee, Y., Fujiwara, N., *et al.*, 2018. A simple diet-and chemical-induced murine NASH model with rapid progression of steatohepatitis, fibrosis and liver cancer. *J Hepatol.* 69:385-395.
12. Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., *et al.*, 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 372:425-432.
13. Hummel, K., Dickie, M., Coleman, D., 1996. Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science.* 153:1127-1128.
14. Oana, F., Takeda, H., Hayakawa, K., *et al.*, 2005. Physiological difference between obese (fa/fa) Zucker rats and lean Zucker rats concerning adiponectin. *Metabolism.* 8:995-1001.
15. Nakayama, H., Otabe, S., Ueno, T., *et al.*, 2007. Transgenic mice expressing nuclear sterol regulatory element-binding protein 1c in adipose tissue exhibit liver histology similar to nonalcoholic steatohepatitis. *Metabolism.* 4:470-475.
16. Weltman, M., Farrel, G., Liddle, C., 1996. Increased hepatocyte CYP2E1 expression in a rat nutritional model of hepatic steatosis with inflammation. *Gastroenterol.* 6: 1645-1653.
17. Clapper, J., Hendricks, M., Gu, G., *et al.*, 2013. Diet-induced mouse model of fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis reflecting clinical disease progression and methods of assessment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 7:483-495.

18. Fujii, M., Shibasaki, Y., Wakamatsu, K., *et al.*, 2013. A murine model for non-alcoholic steatohepatitis showing evidence of association between diabetes and hepatocellular carcinoma. *Med Mol Morphol.* 3:141-152.
19. Donlan, W., Lee, J., 2010. Coraje, nervios, and susto: culture-bound syndromes and mental health among Mexican migrants in the United States. *Adv Mental Health.* 9:288-302.
20. Pedraza-Alva, G., Ramírez-Serrano, C., Pedraza, F., Flores-Vallejo, R., Villarreal, M., Pérez-Martínez, L., 2019. From traditional remedies to cutting-edge medicine: Using ancient Mesoamerican knowledge to address complex disorders relevant to psychoneuroimmunology. *Brain Behav Immun.* 19:30389-30397.
21. Rao, T., Tan, Z., Peng, J., *et al.*, 2019. The pharmacogenetics of natural products: A pharmacokinetic and pharmacodynamic perspective. *Pharmacol Res.* 146:104283.
22. Ramos-Tovar, E., Muriel, P., 2017. Stevia as a putative hepatoprotector. In: Muriel, P., editor. *Liver Pathophysiology: Therapies and antioxidants.* Waltham, MA, USA. Elsevier Inc. pp. 529-546.
23. Lemus-Mondaca, R., Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L., *et al.*, 2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. *Food Chem.* 132:1121-1132.
24. Shibata, H., Sonoke, S., 1991. Glycosylation of steviol and steviol-glucosides in extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Physiol.* 95:152-156.
25. De, S., Mondal, S., Banerjee, S., 2013. Health benefits and pharmacological effects of steviol glycosides. In: *Stevioside: technology, applications and health.* Editorial Wiley Blackwell. USA. 27-43.

26. Jeppesen, P., Gregersen, S., Poulsen, C., *et al.*, 2000. Stevioside acts directly on pancreatic β cells to secrete insulin: actions independent of cyclic adenosine monophosphate and adenosine triphosphate- sensitive K^+ -channel activity. *Metabolism*. 49:208-214.
27. Tomita, T., Sato, N., Arai, T., 1997. Bactericidal activity of a fermented hot-water extract from *Stevia rebaudiana* Bertoni towards enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and other food-borne pathogenic bacteria. *Microbial Immunol*. 41:1005-1009.
28. Pariwat, P., Homvisasevongsa, S., Muanprasat, C., *et al.*, 2008. A natural plant-derived dihydroisosteviol prevents cholera toxin-induced intestinal fluid secretion. *J Pharmacol Exp Ther*. 324:798-805.
29. Jarayaman, S., Manoharan, M.S., Illanchezian, S., 2008. *In vitro* antimicrobial and antitumor activities of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaf extracts. *Trop J Pharmaceut Res*. 7:1143-1149.
30. Melis, M., 1997. Effects of steviol on renal function and mean arterial pressure in rats. *Phytomedicine*. 3:349-352.
31. Melis, M., Sainati, A., 1991. Effect of calcium and verapamil in renal function of rats during treatment with stevioside. *J Ethnopharmacol*. 33:257-262.
32. Lee, C., Wong, K., Liu, J., *et al.*, 2001. Inhibitory effect of stevioside on calcium influx to produce antihypertension. *Planta Med*. 67:796-799.
33. Shukla, S., Mehta, A., Bajpai, V., 2009. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic leaf extract of *Stevia rebaudiana* Bert. *Food Chem Toxicol*. 47:2338-2343.

34. Ghanta, S., Poddar, A., Chattopadhyay, J., 2007. Oxidative DNA damage preventive activity and antioxidant potential of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni, a natural sweetener. *J Agri Food Chem.* 55:10962-10967.
35. Suanarunsawat, T., Chaiyabutr, N., 1997. The effect of steviosides on glucosa metabolism in rat. *Can J Physiol Pharmacol.* 75:976-982.
36. Toskulkao, C., Deechakawan, W., Leardkamolkarn, V., *et al.*, 1994. The low calorie natural sweetener stevioside: nephrotoxicity ad its relationship to urinary enzyme excretion in the rat. *Phytother Res.* 8:281-286.
37. Cardoso, V., Barbosa, M., Muramoto, E., *et al.*, 1996. Pharmacokinetic studies of ¹³¹I-stevioside and its metabolites. *Nucl Med Biol.* 23:97-100.
38. Roberts, A., Renwick, A., 2008. Comparative toxicokinetics and metabolism of rebaudioside A, stevioside, and steviol in rats. *Food Chem Toxicol.* 46:31-39.
39. Renwick, A., Molinary, S., 2010. Sweet-taste receptors, low energy sweeteners, glucosa absortion and insulin release. *Br J Nut.* 104:1415-1420.
40. Hong, J., Chen, L., Jeppesen, P., *et al.*, 2006. Stevioside counteracts the α -cell hypersecretion caused by long-term palmitate exposure. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 290:416-422.
41. Freeman, B.A., 1982. Biology of disease. Free radical and tissue injury. *Lab Invest.* 47:412-422.
42. Halliel, B., 1987. Oxidation and human disease: some new concepts. *Faseb J.* 5:8-65.

43. Casas- Grajales, S., Ramos-Tovar, E., Chávez-Estrada, E., *et al.*, 2019. Antioxidant and immunomodulatory activity induced by stevioside in liver damage: *In vivo*, *in vitro* and *in silico* assays. *Life Sci.* 224:187-196.
44. "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio". Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Diario Oficial de la Federación, 6 de diciembre de 1999.
45. Reitman, S., Frankel, S., 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol.* 28:56-63.
46. Glossmann, H., Neville, D., 1972. Gamma-Glutamyltransferase in kidney brush border membranes. *FEBS Lett.* 19:340-344.
47. Seifter, S., Dayton, S., 1950. The estimation of glycogen with the anthrone reagent. *Arch Biochem.* 25:191-200.
48. Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
49. Sedlak, J., Lindsay, R., 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 25:192-205.
50. El, R., Gad, A., 2015. Chemical and biological evaluation of Aegyptian Nile Tilapia (*Oreochromis nilóticas*) fish scale collagen. *Int J Biol Macromol.* 79:618-626.
51. Rojkind, M., Dunn, M., 1979. Hepatic fibrosis. *Gastroenterol.* 76:849-863.

52. Matsuda, H., Chisaka, T., Kunomora, Y., *et al.*, 1986. Effects of crude drugs on experimental hypercholesterolemia. I. tea and its active principles. *J Ethnopharmacol.* 17:213-224.
53. Hassan, K., Bhalla, V., Regal, M., *et al.*, 2014. Nonalcoholic fatty liver disease: A comprehensive review of a growing epidemic. *World J Gastroenterol.* 34:12082-120101.
54. Pitsavos, C., Panagiotakos, D., Weinem, M., *et al.*, 2006. Diet, exercise and the metabolic syndrome. *Rev Diabet Stud.* 3:118-126.
55. Cortez-Pinto, H., Jesus, L., Barros, H., *et al.*, 2006. How different is the dietary pattern in non-alcoholic steatohepatitis patients? *Clin Nutr.* 25:816-823.
56. Ramos-Tovar, E., Flores-Beltrán, R.E., Galindo-Gómez, S., *et al.*, 2019. An aqueous extract of *Stevia rebaudiana* variety Morita II prevents liver damage in a rat model of cirrhosis that mimics the human disease. *Ann Hepatol.* 3:472-479.
57. Rahman, M., Muse, A., Khan, D., *et al.*, 2017. Apocynin prevented inflammation and oxidative stress in carbon tetra chloride induced hepatic dysfunction in rats. *Biomed Pharmacother.* 99:421-428.
58. Kučera, O., Garnol, T., Lotková, H., *et al.*, 2011. The effect of rat strain, diet composition and feeding period on the development of a nutritional model of non-alcoholic fatty liver disease in rats. *Physiol Res.* 60:317-328.
59. Berry, M., Clark D., Grivell A., *et al.*, 1985. The contribution of hepatic metabolism to diet-induced thermogenesis. *Metabolism.* 34:141-147.

60. Acosta-Cota, S., Aguilar-Medina, E., Ramos-Payán, R., *et al.*, 2018. Histopathological and biochemical changes in the development of nonalcoholic fatty liver disease induced by high-sucrose diet at different times. *Can J Physiol Pharmacol.* 97:23-36.
61. Ozkan, H., Yakan, A., 2019. Dietary high calories from sunflower oil, sucrose and fructose sources alters lipogenic genes expression levels in liver and skeletal muscle in rats. *Annals hepatol.* 18:715-724.
62. De Souza, A., Batista, G., Alegre, S., 2017. Assessment of insulin sensitivity by the hyperinsulinemic euglycemic clamp: comparison with the spectral analysis of photoplethysmography. *J Diabetes Complications.* 31:128-133.
63. Aghajanyan, A., Movsisyan, Z., Trchounian, A., 2017. Antihyperglycemic and antihyperlipidemic activity of hydroponic *Stevia rebaudiana* aqueous extract in hyperglycemia induced by immobilization stress in rabbits. *Biomed Res Int.* 2017:9251358.
64. Tsutsumi, V., Nakamura, T., Ueno, T., *et al.*, 2017. Structure and Ultrastructure of the Normal and Diseased Liver. In: Muriel, P., editor. *Liver Pathophysiology: Therapies and antioxidants.* Waltham, MA, USA. Elsevier Inc. pp. 23-44
65. Mota, M., Banini, B., Cazanave, S., Sanyal, A., 2016. Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism.* 8:1049-1061.
66. Holvoet, P., Rull, A., García-Heredia, A., *et al.*, 2015. *Stevia*-derived compounds attenuate the toxic effects of ectopic lipid accumulation in the liver of obese mice: A transcriptomic and metabolomic study. *Food Chem Toxicol.* 77:22-33.

67. Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., *et al.*, 2008. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicol.* 245:194-205.
68. Zou, Y., Li, J., Lu, C., *et al.*, 2006. High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Sci.* 79:1100-1107.
69. Mari, M., Caballero, F., Colell, A., *et al.*, 2006. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell metabolism.* 3:185-198.
70. Liu, Y., Meyer, C., Xu, C., *et al.*, 2013. Animal models of chronic liver diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 304:499-469.
71. Van Rooyen, D., Larter, C., Haigh, W., *et al.*, 2011. Hepatic free cholesterol accumulates in obese, diabetic mice and causes nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterol.* 141:1393-1403.
72. Kleiner, D., Makhlouf, H., 2016. Histology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in adults and children. *Clin Liver Dis.* 20:293-312.
73. Teratani, T., Tomita, K., Suzuki, T., *et al.*, 2012. A high-cholesterol diet exacerbates liver fibrosis in mice via accumulation of free cholesterol in hepatic stellate cells. *Gastroenterol.* 142:152-164.
74. Sheng, D., Zhao, S., Gao, L., 2019. BabaoDan attenuates high-fat diet-induced non-alcoholic fatty liver disease via activation of AMPK signaling. *Cell Biosci.* 9:1-10.
75. Ferré, N., Martínez-Clemente, M., López-Parra, M., *et al.*, 2009. Increased susceptibility to exacerbated liver injury in hypercholesterolemic Apo-E deficient mice: potential involvement of oxysterols. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 296:553-562.

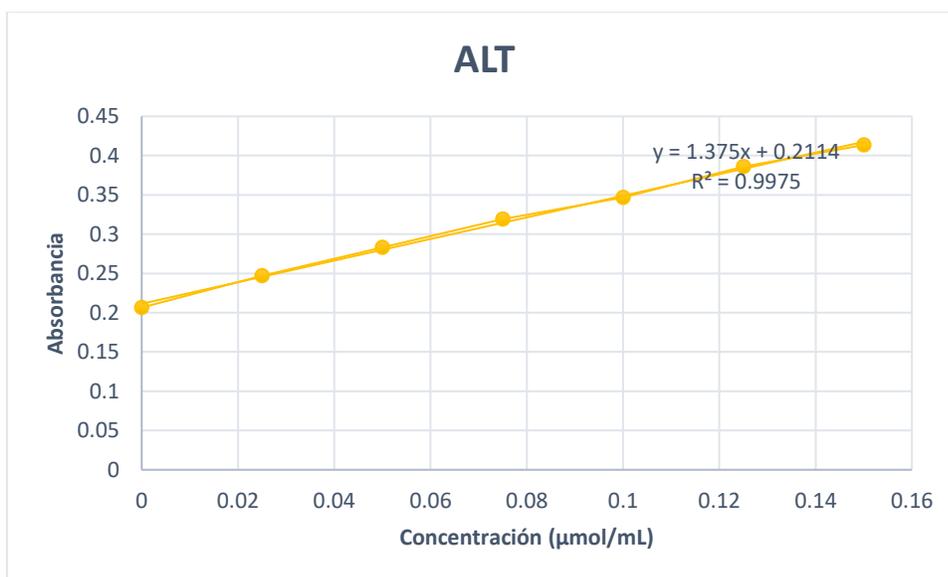
76. Mehlem, A., Hagberg, C., Muhl, L., *et al.*, 2013. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. *Nat Protoc.* 6:1149-1154.
77. Yasukate, K., Kohjims, M., Nakashima, M., *et al.*, 2014. Dietary habits and behaviors associated with nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 20:1756-1767.
78. Chang, P., Pai, J., Lai, Y., 2019. Electronegative LDL from rabbits fed with atherogenic diet is highly proinflammatory. *Mediators inflamm.* 19:1-12.
79. Takeyama, Y., Uehara, Y., Anan, A., *et al.*, 2017. Increased hepatic ABCA1 transporter is associated with hypercholesterolemia in a cholestatic rat model and primary biliary colangitis patients. *Med Mol Morphol.* 50:227-237.
80. Poupon, R., Ouguerran, K., Chretien, Y., *et al.*, 1993. Cholesterol-lowering effect of ursodeoxycholic acid in patients with primary cirrhosis. *Hepatol.* 17:577-582.
81. Koyama, Y., Brenner, D., 2017. Liver inflammation and fibrosis. *J Clinical Investig.* 127:55-64.
82. Macfarlane, D., Zou, X., Andrew, R., *et al.*, 2011. Metabolic pathways promoting intrahepatic fatty acid accumulation in methionine and choline deficiency: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2:402-409.
83. Orlicky, D., Roede, J., Bales, E., *et al.*, 2011. Chronic ethanol consumption in mice alters hepatocyte lipid droplets properties. *Alcohol Clin Exp Res.* 6:1020-1033.

15 Anexos

15.1 Curva de calibración de la ALT

La curva se realizó de acuerdo con el método descrito en el apartado 6.5.2, obteniéndose los siguientes resultados:

Concentración (μmol/ml)	ABS 1	ABS 2	Promedio
0	0.21	0.203	0.2065
0.025	0.244	0.25	0.247
0.05	0.278	0.288	0.283
0.075	0.311	0.327	0.319
0.1	0.341	0.352	0.3465
0.125	0.383	0.389	0.386
0.15	0.4	0.427	0.4135

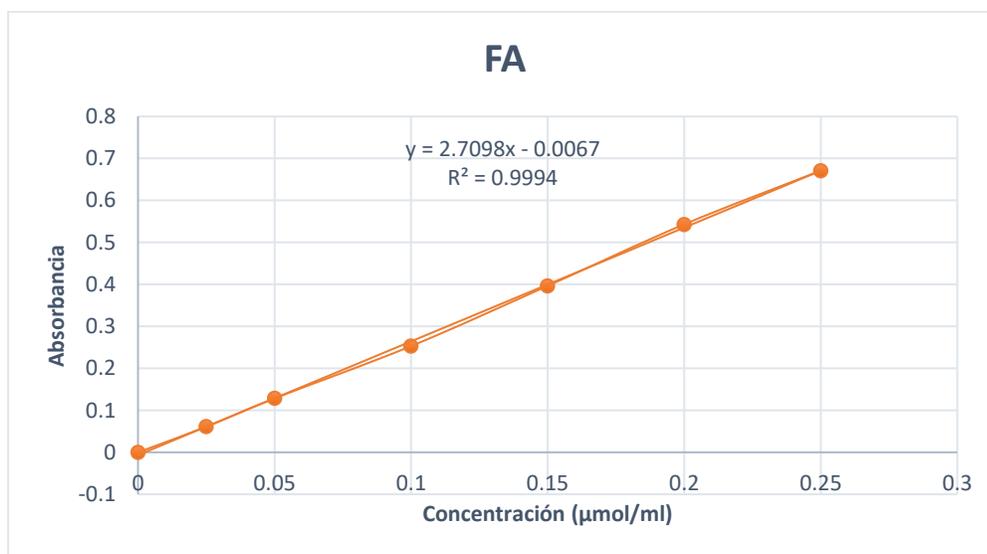


De acuerdo con los valores encontrados se obtuvo la ecuación de la recta, de tipo lineal $y = mx + b$, posteriormente se calcularon las concentraciones de las muestras de suero sanguíneo de las ratas en experimentación.

15.2 Curva de calibración de la FA

La curva se realizó de acuerdo con el método descrito en el apartado 6.5.4, obteniéndose los siguientes resultados:

Concentración (umol/ml)	Abs 1	Abs 2	Promedio
0	0.052	0.052	0.052
0.025	0.112	0.114	0.113
0.05	0.18	0.181	0.1805
0.1	0.306	0.304	0.305
0.15	0.445	0.452	0.4485
0.2	0.59	0.6	0.595
0.25	0.686	0.76	0.723

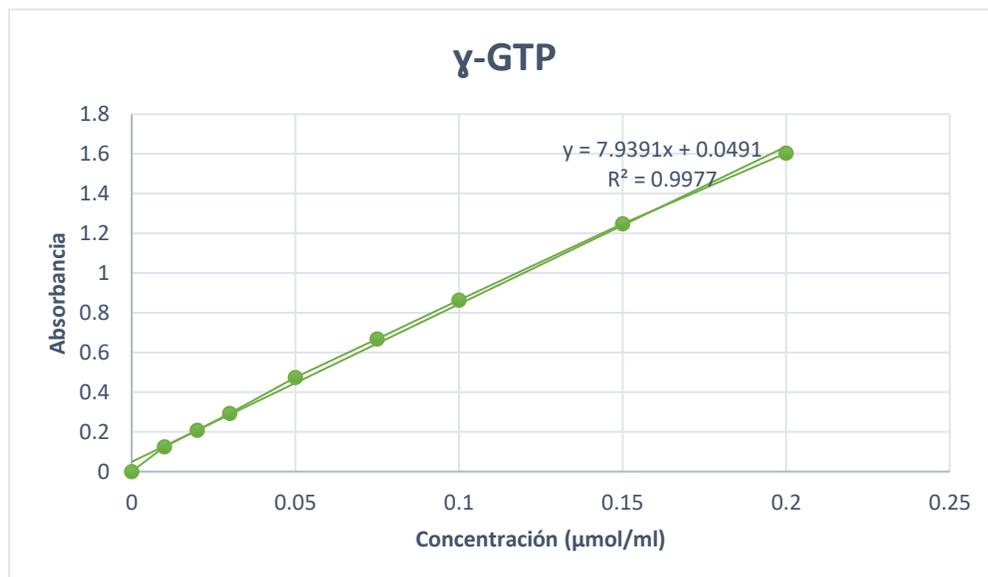


De acuerdo con los valores encontrados se obtuvo la ecuación de la recta, de tipo lineal $y = mx + b$, posteriormente se calcularon las concentraciones de las muestras de suero sanguíneo de las ratas en experimentación.

15.3 Curva de calibración de la γ -GTP

La curva se realizó de acuerdo con el método descrito en el apartado 6.5.6, obteniéndose los siguientes resultados:

Concentración (μ moles/ml)	Abs 1	Abs 2	Promedio
0	0	0	0
0.01	0.126	0.124	0.125
0.02	0.207	0.208	0.2075
0.03	0.295	0.292	0.2935
0.05	0.472	0.475	0.4735
0.075	0.665	0.67	0.6675
0.1	0.862	0.865	0.8635
0.15	1.25	1.247	1.2485
0.2	1.602	1.606	1.604

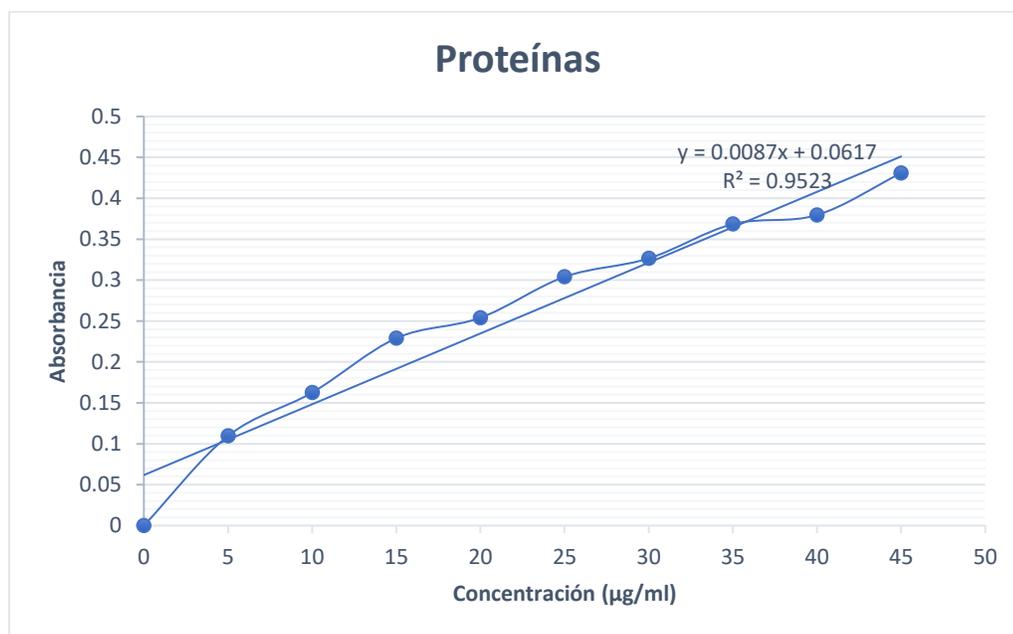


De acuerdo con los valores encontrados se obtuvo la ecuación de la recta, de tipo lineal $y = mx + b$, posteriormente se calcularon las concentraciones de las muestras de suero sanguíneo de las ratas en experimentación.

15.4 Curva de calibración de proteínas

La curva se realizó de acuerdo con el método descrito en el apartado 6.5.9, obteniéndose los siguientes resultados:

Tubo	ABS 1	ABS2	PABS	[X] Conocida (μg)	ABS-B [Y]
B1	0.867	0.882	0.8745	0	0
2	0.984	0.984	0.984	5	0.1095
3	1.039	1.035	1.037	10	0.1625
4	1.115	1.092	1.1035	15	0.229
5	1.14	1.117	1.1285	20	0.254
6	1.188	1.169	1.1785	25	0.304
7	1.211	1.191	1.201	30	0.3265
8	1.242	1.244	1.243	35	0.3685
9	1.244	1.264	1.254	40	0.3795
10	1.301	1.3095	1.30525	45	0.43075

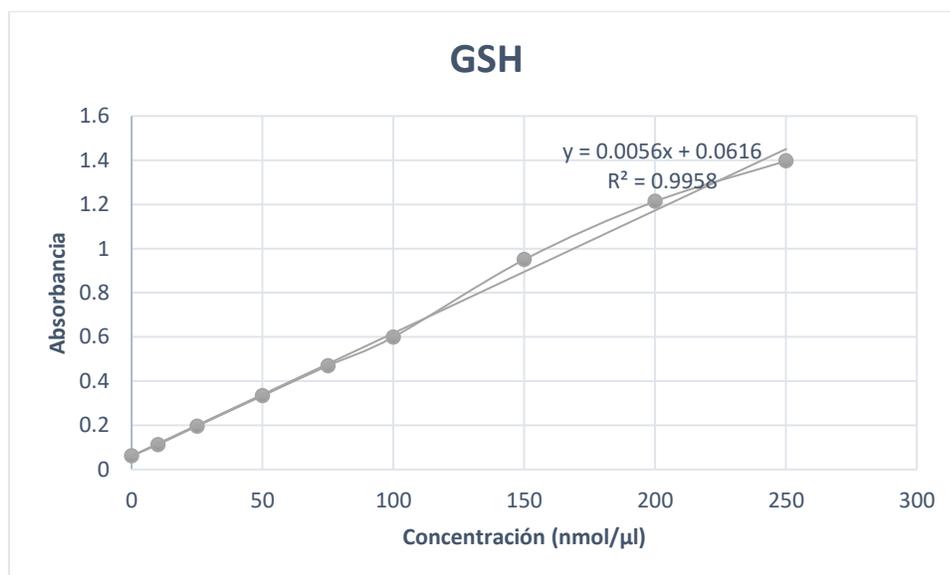


De acuerdo con los valores encontrados se obtuvo la ecuación de la recta, de tipo lineal $y = mx + b$, posteriormente se calcularon las concentraciones de las muestras de hígado de las ratas en experimentación.

15.5 Curva de calibración de GSH

La curva se realizó de acuerdo con el método descrito en el apartado 6.6.1, obteniéndose los siguientes resultados:

Tubo	ABS 1	ABS 2	Promedio	Concentración (nmol/ μ l)	ABS-B (Y)
B	0.063	0.059	0.061	0	0
1	0.112	0.113	0.1125	10	0.0515
2	0.195	0.197	0.196	25	0.135
3	0.333	0.334	0.3335	50	0.2725
4	0.471	0.469	0.47	75	0.409
5	0.602	0.597	0.5995	100	0.5385
6	0.947	0.953	0.95	150	0.889
7	1.207	1.22	1.2135	200	1.1525
8	1.393	1.4	1.3965	250	1.3355

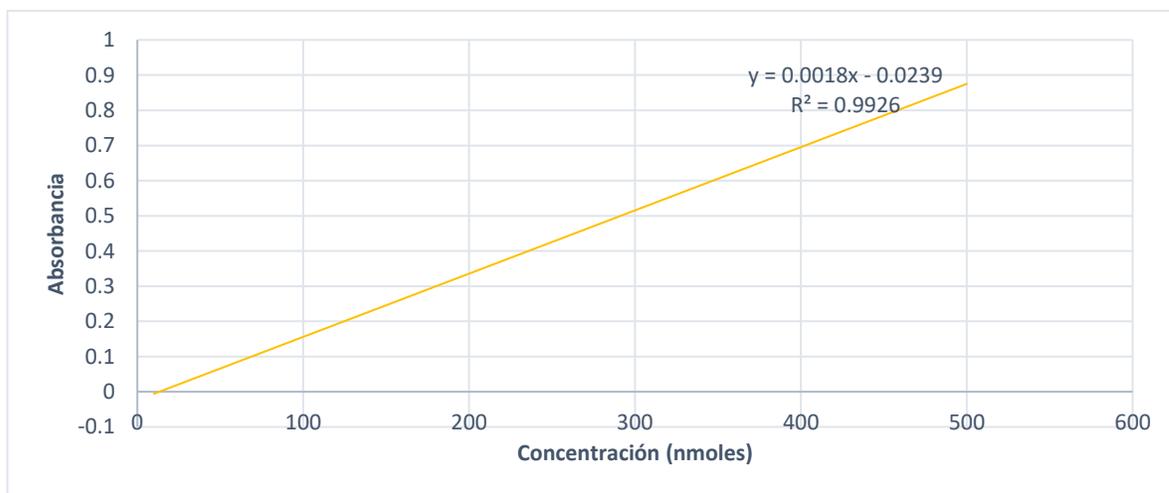


De acuerdo con los valores encontrados se obtuvo la ecuación de la recta, de tipo lineal $y = mx + b$, posteriormente se calcularon las concentraciones de las muestras de hígado de las ratas en experimentación.

15.6 Curva de calibración de HP

La curva se realizó de acuerdo con el método descrito en el apartado 6.6.3, obteniéndose los siguientes resultados:

Tubo	ABS1	ABS2	PABS	[HP nmoles]	PABS-B
B	0.118	0.118	0.118	0	0
1	0.159	0.158	0.1585	10	0.0405
2	0.173	0.155	0.164	30	0.046
3	0.181	0.186	0.1835	50	0.0655
4	0.192	0.198	0.195	70	0.077
5	0.235	0.272	0.2535	100	0.1355
6	0.316	0.345	0.3305	150	0.2125
7	0.43	0.479	0.4545	200	0.3365
8	0.69	0.605	0.6475	300	0.5295
9	0.784	0.793	0.7885	400	0.6705
10	0.987	1.053	1.02	500	0.902



De acuerdo con los valores encontrados se obtuvo la ecuación de la recta, de tipo lineal $y = mx + b$, posteriormente se calcularon las concentraciones de las muestras de hígado de las ratas en experimentación.