



**Universidad Autónoma de Tlaxcala**

---

---

**Posgrado en Ciencias Biológicas**

**Consumo de sacarosa a temprana edad más estrés:  
relación entre corticosterona y esteatosis hepática en  
ratas machos**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Adriana Corona Pérez

**Directora**

Dra. Leticia Nicolás Toledo

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2018.





**Universidad Autónoma de Tlaxcala**

---

---

**Posgrado en Ciencias Biológicas**

**Consumo de sacarosa a temprana edad más estrés:  
relación entre corticosterona y esteatosis hepática en  
ratas machos**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Adriana Corona Pérez

**Cómite tutorial**

Dra. Leticia Nicolás Toledo

Dra. Ida Soto Rodríguez

Dr. Francisco Castelán

Dra. Estela Cuevas Romero

Dr. Jorge Rodríguez Antolín

Dra. Margarita Cervantes Rodríguez

## **Financiamiento**

La presente tesis fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del apoyo recibido de la beca CONACyT 417844-CPA; y realizada en las inmediaciones del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.



**Universidad Autónoma de Tlaxcala**  
**Secretaría de Investigación Científica y Posgrado**  
**Posgrado en Ciencias Biológicas**



**COORDINACIÓN DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA**  
**PRESENTE**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Adriana Corona Pérez** realiza para la obtención del grado de **Doctora en Ciencias Biológicas**, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Consumo de sacarosa a temprana edad más estrés: relación entre corticosterona y esteatosis hepática en ratas machos”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
TLAXCALA, TLAX., NOVIEMBRE 27 DE 2017

  
\_\_\_\_\_  
DR. FRANCISCO CASTELLANO

  
\_\_\_\_\_  
DRA. IDA SOTO RODRÍGUEZ

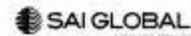
  
\_\_\_\_\_  
DR. JORGE RODRÍGUEZ ANTOLÍN

  
\_\_\_\_\_  
DRA. ESTELA CEBÁS ROMERO

  
\_\_\_\_\_  
DRA. MARGARITA CERVANTES RODRÍGUEZ



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:  
ISO 9001:2008-NMX-CC-9001-IMNC-2008



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070, Tlaxcala, Tlax. Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: [posgradoctbcuat@gmail.com](mailto:posgradoctbcuat@gmail.com)

### **Agradecimientos**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, por el programa tan amplio que ofrece a los aspirantes y por el apoyo del mismo para la realización del proyecto aquí desarrollado.

Al apoyo recibido de la beca CONACyT 417844-CPA para la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Leticia Nicolas Toledo del laboratorio de Inmunquímica del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Unidad Periférica del Instituto Biomédicas de la UNAM, lugar donde fue realizada esta investigación.

Se contó con la tutoría de los Dres. Ida SotoRodríguez, Francisco Castelan, Estela Cuevas Romero, Jorge Rodríguez Antolín y Margarita Cervantes Rodríguez a quienes agradezco sus enriquecedoras aportaciones en la realización de la presente tesis. Un reconocimiento especial a la QFB Laura García Rivera por su valioso apoyo técnico.

Por último, pero no menos importante al Dr. Mauricio Díaz Muñoz y a la Dra. Dalia Luna Moreno del Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Campus UNAM-Juriquilla, Queretaro a quienes agradezco infinitamente sus atenciones y facilidades prestadas para la elaboración de este proyecto.

## **Agradecimientos**

Antes que nada, a Dios por darme la sabiduría y paciencia para este logro.

A mis padres y hermano, de quienes siempre he recibido una respuesta positiva y apoyo incondicional. Porque en mis logros y tropiezos siempre han estado ahí para brindarme la mano, porque siempre he recibido de ustedes el mejor ejemplo, los quiero.

A la Dra. Leticia Nicolás Toledo por haberme brindado su experiencia y conocimiento, por ser uno de los principales cimientos para la formación de mi vida profesional e impulsarme en muchos sentidos a seguir adelante. Por su plena confianza, apoyo, paciencia y por su valiosa dirección para seguir este camino y llegar a la conclusión del mismo. Cuya experiencia y educación han sido fuente de motivación durante estos años.

Al Dr. Francisco Castelán y a la Dra. Estela Cuevas, por todos y cada uno de sus consejos, por su disponibilidad y calidad humana, por escucharme y siempre estar dispuestos a ayudarme porque de ustedes he aprendido mucho, mi respeto y admiración hacia a sus personas.

A todas mis compañeras del laboratorio de Inmunoquímica y Endocrinología por todas las experiencias vividas. Especialmente, a Julie, Crithian y Yeimi por su apoyo incondicional y cada una de las experiencias vividas durante todo este difícil pero divertido y enriquecedor camino.

*A mis padres, esposo e hija...*

De quién aprendí que un tropezón no es caída,  
que todo en la vida vuelve,  
que no hay mal que por bien no venga,  
que con voluntad y esfuerzo  
todo resulta más fácil.

Que lo más valioso del mundo es la familia,  
que no se llora a quien no te valora,  
que por más tropezón, caída, obstáculo,  
o barrera que se interponga en el camino,  
el objetivo es levantar la cabeza y seguir adelante.

*"Intenta no volverte un hombre de éxito, sino volverte un hombre de valor".*

**Albert Einstein**

## RESUMEN

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) es un conjunto de alteraciones que comprenden la presencia de una simple esteatosis hasta una cirrosis, y es considerado el trastorno hepático crónico más común. La resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, obesidad y síndrome metabólico, son algunos de los factores que promueven el desarrollo de hígado graso no alcohólico. Recientemente, los glucocorticoides también se han asociado con el desarrollo de alteraciones del hígado graso no alcohólico debido a los niveles elevados de cortisol presentes en orina y suero en pacientes obesos adultos y a las características clínicas que comparten con individuos con síndrome de Cushing, los cuales cursan con síndrome metabólico e hígado graso. Sin embargo, estudios epidemiológicos han mostrado que solo el 20% de los pacientes con síndrome de Cushing tienen esteatosis hepática, sugiriendo que otros factores son involucrados con la acumulación de grasa en hígado. Por otro lado, las evidencias muestran que el estrés también promueve el inicio de la NAFLD con un incremento concomitante en la actividad de la 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa hepática tipo 1 (11 $\beta$ -HSD-1), enzima que activa a los glucocorticoides. De la misma manera, estudios en modelos animales han mostrado que el consumo de una dieta rica en carbohidratos durante la edad adulta es capaz de promover la acumulación de grasa en hígado y que una dieta palatable tiene efectos diferenciales sobre la concentración de glucocorticoides, afectando la respuesta al estrés. Sin embargo, se desconocen los efectos de la interacción entre el estrés y una dieta enriquecida en carbohidratos en el desarrollo de NAFLD. En el presente estudio se evaluó de manera sistemática el impacto del estrés crónico y el consumo de una dieta alta en sacarosa en animales recién destetados hasta la edad adulta sobre los niveles de glucocorticoides y la acumulación de grasa hepática. Para ello, se utilizaron 96 ratas macho Wistar de 21 días de edad asignadas en 4 grupos (n=8/grupo): control (C), estrés por restricción crónica (E), dieta alta en sacarosa (A30) y estrés por restricción crónica más 30% de sacarosa (E + A30) con una duración de 1, 2 y 3 meses. El estrés por restricción crónica consistió en una sesión diaria de 1 hora, 5 días por semana y durante 4 semanas, antes del sacrificio. Las ratas se alimentaron con una dieta estándar y agua corriente (grupo C) o 30% de sacarosa diluida en agua (grupo A30). Los niveles de triglicéridos, estrés oxidativo, actividad de la 11 $\beta$ -HSD-1, infiltración de células inmunes, y cantidad de glucógeno

en el hígado fueron cuantificados. La concentración sérica de corticosterona también fue evaluada. Los resultados muestran que en los animales de 1 mes; el grupo E mostró un alto nivel de corticosterona y una alta actividad de la 11 $\beta$ -HSD-1 hepática coincidente con el aumento de los signos de esteatosis hepática, un alto contenido de triglicéridos y estrés oxidativo hepático. Por el contrario, el consumo de una dieta alta en sacarosa en ratas estresadas (grupo E + A30) redujo la actividad hepática 11 $\beta$ -HSD-1, el nivel de corticosterona y el contenido de triglicéridos hepáticos. Por otra parte, en los animales de 2 meses; el grupo E mostró concentraciones séricas normales de corticosterona sin esteatosis hepática. Sin embargo, mostró una alta cantidad de glucógeno, inflamación, fibrosis leve, estrés oxidativo, y una alta actividad de la 11 $\beta$ -HSD-1 en hígado. El grupo A30 presentó esteatosis hepática y fibrosis moderada con una disminución de la concentración de corticosterona. La dieta con alto contenido de sacarosa y el grupo de estrés crónico (E+A30) mostraron concentraciones bajas de corticosterona, esteatosis hepática y estrés oxidativo. Por su parte, a pesar de que los grupos de 3 meses mostraron concentraciones normales de corticosterona y de la 11 $\beta$ -HSD-1 hepática, el grupo E tuvo una mayor cantidad de glucógeno hepático, acompañado de un aumento de los dienos conjugados y disminución de TBARS, sin esteatosis hepática. El grupo A30, además de presentar un aumento en el contenido de grasa y triglicéridos hepáticos no mostró estrés oxidativo. La dieta alta en sacarosa y el grupo de estrés crónico (E+A30) aumentaron el glucógeno y disminuyeron la grasa, triglicéridos y estrés oxidativo hepático. Con nuestros resultados mostramos el desarrollo de esteatosis hepática asociada a los altos niveles de corticosterona y 11 $\beta$  HSD-1 hepática, sugiriendo que una dieta rica en sacarosa mejora la acumulación de triglicéridos hepáticos promovidos por el estrés por restricción en ratas machos jóvenes. Contrario a lo observado en ratas con un consumo prolongado de sacarosa y estrés crónico que generan diferentes componentes del hígado graso no alcohólico. La combinación de ambos factores podría potenciar el desarrollo del NAFLD. Además, mostramos que la corticosterona no es un factor indispensable en el desarrollo de esteatosis hepática. Sin embargo, estos resultados nos siguen manteniendo a la expectativa en relación a si los glucocorticoides y el consumo de sacarosa potencian el desarrollo de esteatosis hepática.

## **INDICE**

INTRODUCCIÓN	5
1.1 Consumo de bebidas azucaradas	6
1.2 Estrés	7
1.3 Glucocorticoides	9
1.4 Hígado	13
1.5 Organogénesis del hígado	15
1.6 Metabolismo de carbohidratos y glucocorticoides	17
1.7 Esteatosis hepática no alcohólica	21
2. ANTECEDENTES	22
2.1 Modelos animales	22
2.1.1 Consumo de carbohidratos y esteatosis hepática	22
2.1.2 Glucocorticoides y esteatosis hepática	23
2.1.3 Efectos del estrés en hígado	24
2.1.4 Sacarosa más estrés en hígado	25
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. HIPÓTESIS	28
5. OBJETIVO GENERAL	28
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
6. METODOLOGÍA	29
6.1 Manejo de los animales	29
6.2 Protocolo de la dieta	30
6.3 Estrés	30
6.4 Obtención de kilocalorías (kcal) consumidas en el alimento	30
6.5 Obtención de kilocalorías (kcal) consumidas en el agua	31
6.6 Obtención de muestras sanguíneas, hígado y tejido adiposo	31
6.7 Determinación de corticosterona	32
6.8 Análisis histológico del hígado	32
6.9 Número de células inmunes dentro de los sinusoides	33

6.10 Tinción rojo oleoso	34
6.11 Medición del contenido de grasa y triglicéridos hepáticos	34
6.12 Contenido de glucógeno hepático	34
6.13 Inmunohistoquímica de 3-Nitrotirosina para la determinación de daño oxidativo	35
6.14 Determinación de peroxidación de lípidos	35
6.15 Determinación del contenido de carbonilos	36
6.16 Actividad de la 11 $\beta$ - hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 1 (11 $\beta$ -HSD1)	37
6.17 Análisis estadístico	37
7. RESULTADOS	38
7.1 PRIMER MES	38
7.1.1 Ganancia de peso corporal	38
7.1.2 Consumo de alimento, agua y kilocalorías	38
7.1.3 Niveles de glucosa sérica	40
7.1.4 Índice de adiposidad	40
7.1.5 Peso del hígado	41
7.1.6 Análisis histológico del hígado	42
7.1.7 Área de los hepatocitos	44
7.1.8 Área nuclear	44
7.1.9 Densidad nuclear	45
7.1.10 Acumulación de triglicéridos hepáticos	46
7.1.11 Daño oxidativo hepático	47
7.1.12 Corticosterona y 11 $\beta$ -HSD1	49
7.2 SEGUNDO MES	50
7.2.1 Ganancia de peso corporal	50
7.2.2 Consumo de alimento, agua y kilocalorías	50
7.2.3 Niveles de glucosa sérica	52
7.2.4 Índice de adiposidad	52
7.2.5 Peso del hígado	53
7.2.6 Análisis histológico del hígado	54

7.2.7 Área de los hepatocitos	56
8.2.8 Área nuclear	56
7.2.9 Densidad nuclear	57
7.2.10 Infiltración de células inmunes dentro de los sinusoides	58
7.2.11 Triglicéridos hepáticos	59
7.2.12 Glucógeno hepático	60
7.2.13 Daño oxidativo hepático	61
7.2.14 Corticosterona y 11 $\beta$ -HSD1	63
7.3 TERCER MES	64
7.3.1 Ganancia de peso corporal	64
7.3.2 Consumo de alimento, agua y kilocalorías	64
7.3.3 Niveles de glucosa sérica	66
7.3.4 Índice de adiposidad	66
7.3.5 Peso del hígado	68
7.3.6 Análisis histológico del hígado	68
7.3.7 Área de los hepatocitos	69
7.3.8 Área nuclear	70
7.3.9 Densidad nuclear	71
7.3.10 Infiltración de células inmunes dentro de los sinusoides	72
7.3.11 Contenido de grasa y triglicéridos hepáticos	73
7.3.12 Glucógeno hepático	74
7.3.13 Daño oxidativo hepático	74
7.3.14 Corticosterona y 11 $\beta$ -HSD1	77
8. DISCUSIÓN	78
8.1 Primer mes	78
8.2 Segundo mes	81
8.3 Tercer mes	84
9. CONCLUSIONES	90
10. PERSPECTIVAS	91

11. REFERENCIAS	92
12. ANEXOS	110
12.1 Deshidratación del tejido hepático	110
12.2 Tinción de hematoxilina – eosina	111
12.3 Tinción de Tricrómica de Masson	113
13. PUBLICACIONES	115

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) es uno de los trastornos crónicos hepático más común (Kawasaki y cols 2009; Fu y cols. 2010). Son varios los factores asociados al desarrollo de esta alteración entre ellos se encuentra la resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, y obesidad, por lo que recientemente se ha considerado la manifestación hepática del síndrome metabólico (Ahmed y cols. 2012). Por otra parte, la obesidad es una enfermedad crónica reconocida como un problema de salud pública (Marti y cols. 2008). Esta enfermedad es considerada un desorden metabólico asociado con factores sociales, psicológicos, predisposición genética y hábitos alimenticios, que afecta a todas las edades (Chin y Rona 2001; Bartolomucci y cols. 2009). Las prevalencias de sobrepeso y obesidad han aumentado con rapidez en México. En el 2016, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (ENSANUT) reportó una prevalencia del 33.2% de sobrepeso y obesidad en niños menores de 5 a 11 años a nivel nacional, de 36.3% en adolescentes y 72.5% en adultos. Las evidencias señalan que las bebidas con aporte energético incrementan el riesgo de padecer obesidad, diabetes y síndrome metabólico (Schulze y cols. 2004; Vartanian y cols. 2007; Chandramouli y cols. 2011). Y recientemente, también han sido asociadas con el aumento en la prevalencia de hígado graso no alcohólico (Nseir y cols. 2010; Agius 2013).

Por otra parte, se ha sugerido que factores sociales como el trabajo, el medio ambiente, el nivel socioeconómico aumentan el estrés en la sociedad moderna y de manera particular durante la niñez y juventud, etapa que se percibe como un periodo de la vida con menos exigencias (Kostelnik y Whiren 2009; Krolow y cols. 2013). El estrés, es definido como una respuesta adaptativa no específica del cuerpo a estresores reales o percibidos (Chrousos 2000) a través del incremento de las concentraciones de glucocorticoides (Van de Kar y Blair 1999) que son altamente implicados en la prevalencia de sobrepeso, obesidad (Björntorp 2001; Kyrou y cols. 2006) y la enfermedad del hígado graso no alcohólico (Pinheiro y cols. 2009).

Los glucocorticoides son hormonas esteroideas sintetizadas en la glándula adrenal (Grasa-Martínez 2004; Pinheiro y cols. 2009), para el mantenimiento de la homeostasis metabólica tanto en estado basal como en respuesta al estrés y juegan un papel importante en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas (Nader y cols. 2012). La conducta alimentaria

ha sido asociada con el estrés, tales como la ansiedad, depresión, el comer por razones emocionales y el consumo de alimentos palatables, son de gran importancia en la patogénesis de obesidad (Guerra y cols. 2000; Pervanidou y Chrousos 2011). En niños y adolescentes con sobrepeso se ha mostrado que el aumento de la ansiedad se asocia con un aumento de comidas palatables y la pérdida de control sobre la comida, sugiriendo que la ingesta de alimentos palatables es una forma de hacer frente a la ansiedad (Pervanidou y Chrousos 2012).

Se ha reportado que la enfermedad del hígado graso no alcohólico es causada por la interacción de factores como la ingesta de carbohidratos (Manti y cols. 2014) y el estrés (Kyrou y Tsigos 2007; Czech y cols. 2013; Liu y cols. 2014), y recientemente ha sido correlacionada con los niveles elevados de cortisol presentes en orina y suero en pacientes obesos adultos (Altuna y cols. 2006). Aunque los mecanismos subyacentes de la progresión de la enfermedad del hígado graso no alcohólico no son claros, un desequilibrio que involucra la tolerancia a la glucosa, un mayor almacén de ácidos grasos no esterificados en hígado y una alta lipogénesis de *novo* proveniente de la glucosa y fructosa (Scorletti y cols. 2011), parecen ser responsables de la acumulación de grasa en hígado que incrementan la  $\beta$ -oxidación y estrés oxidativo (Scorletti y cols. 2011; Manti y cols. 2014; Lee y cols. 2014). Sin embargo, la relación entre el estrés, los glucocorticoides, y el metabolismo de carbohidratos desde una temprana edad hasta la edad adulta no ha sido estudiada.

### **1.1 Consumo de bebidas azucaradas**

México es uno de los principales consumidores de refrescos y bebidas azucaradas per cápita en el mundo con un consumo aproximado entre 115 y 163 litros por persona al año y un consumo promedio de medio litro al día (Rivera y cols. 2000; Barquera y cols. 2008; Euromonitor 2011; Chaloupka y cols. 2011; Silva y Durán 2014). Las bebidas azucaradas son consideradas todas aquellas que poseen un sabor dulce, otorgado por edulcorantes o sustitutos de azúcares, con contenido energético, cuya función está basada en satisfacer una necesidad energética básica del individuo (Rivera y cols. 2008).

Estudios realizados en humanos sobre la sensación de hambre y control del apetito muestran que las bebidas ricas en azúcares simples tienen menor capacidad para producir

saciedad que los alimentos sólidos, induciendo a una mayor ingesta de energía (OMS 2003; Di Meglio y Mattes 2000; Martínez 2008). Atendiendo estas consideraciones, se ha señalado que uno de los problemas de consumir bebidas azucaradas en niños y adolescentes es que, además de no brindar nutrientes, las calorías que aportan se acumulan con el tiempo y derivan en obesidad y diabetes a una temprana edad (Rivera y cols. 2008; Pisabarro 2009; INSP 2013; Silva y Durán 2014).

Por otra parte, se ha mostrado que la ingesta de bebidas azucaradas promueve un incremento de la presión arterial, triglicéridos, colesterol y síndrome metabólico que podrían estar involucrados con su efecto glicémico (Silva y Duran 2014) y el origen de la adiposidad a través de la síntesis de triglicéridos (lipogénesis de *novo* hepática), generando ácidos grasos para la producción de triglicéridos hepáticos ligando este proceso al desarrollo de esteatosis hepática (Silva y Duran 2014). El aumento de lípidos hepáticos se asocia con el aumento de la síntesis y secreción de VLDL (Adiels y cols. 2006). Para el ensamblaje intracelular de los triglicéridos en VLDL es esencial la apoB, y cuando los lípidos hepáticos se incrementa la degradación de apoB se reduce (Silva y Duran 2014).

## **1.2 Estrés**

El estrés es definido como una disrupción en la función de la homeostasis de un organismo causada por un estresor. El sistema de estrés funciona de manera circadiana e interactúa con otros sistemas para regular una variedad de funciones. Cambios fisiológicos y conductuales (referido como alostasis) son respuestas características al estrés, que involucran al eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) y el sistema nervioso simpático (Chrousos 2000).

El estrés fisiológico y psicológico incrementan las concentraciones de glucocorticoides en plasma por la activación del eje HPA (Van de Kar y Blair 1999), que es controlado por varios circuitos de retroalimentación negativos que tiende a normalizar el tiempo de integración en la secreción de cortisol, y media los efectos percibidos por el estrés en la periferia del cuerpo que ayudan al organismo hacer frente a estos cambios (Chrousos 2000; Fernando y cols. 2013). Bajo condiciones normales, la activación de la respuesta al estrés, resulta en cambios adaptativos endocrinos, metabólicos, y cardiovasculares que pueden mantener la homeostasis (Pervanidou

y Chrousos 2012), que incluyen el incremento de glucosa en plasma debido a la gluconeogénesis y degradación de glucógeno, así como la inhibición de la entrada de glucosa en algunos tejidos, estimulación de la lipólisis en tejido adiposo y un incremento de la tasa metabólica (Arcego y cols. 2014). Por otra parte, se ha observado que la experiencia de un estrés físico o emocional intenso, así como de estrés crónico, puede conducir al desarrollo de una serie de condiciones psicológicas y somáticas, incluyendo trastornos de ansiedad, depresión, obesidad y síndrome metabólico (Pervanidou y Chrousos 2012). La exposición al estrés puede promover un incremento o disminución en la ingesta de comida, dependiendo del tipo y la intensidad (Adam y Epel 2007; Krolow y cols. 2013; Arcego y cols. 2014). Así mismo, la regulación del eje HPA dependerá del tipo de dieta consumida: Estudios en roedores han mostrado que dietas altas en carbohidratos reducen la respuesta del eje al estrés (Pecoraro y cols. 2004; Krolow y cols. 2013; Corona-Pérez y cols. 2015), mientras que dietas ricas en grasa aumentan los niveles de glucocorticoides (Kamara y cols. 1998). Además, hay evidencia de que los glucocorticoides estimulan el apetito y el incremento del peso corporal a través del efecto orexigénico del neuropeptido Y (NPY) en el eje HPA, un efecto que es inhibido por la leptina y la insulina (Krolow y cols. 2013). Aunado a ello, la activación del sistema simpático incrementa la secreción de IL-6 lo que aumenta la movilización de ácidos grasos libres que inducen resistencia a la insulina en músculo y proveen sustrato para la producción hepática de lipoproteínas (Chrousos 2000).

Se ha sugerido que factores ambientales, como el estrés, son altamente implicados en la prevalencia de obesidad (Björntorp 2001; Kyrou y cols. 2006; Klump y cols. 2007) y la enfermedad del hígado graso no alcohólico (Pinheiro y cols. 2009). Muchas evidencias proponen que la experiencia de un estrés agudo o crónico durante periodos críticos del crecimiento y desarrollo pueden tener grandes efectos frecuentemente irreversibles sobre la conducta, crecimiento, función reproductiva, cardiovascular, inmune y metabólica (Charmandari y cols. 2003; Pervanidou y Chrousos 2012) promoviendo la aparición temprana del síndrome metabólico (Krolow y cols. 2013), a través de la sobresecreción crónica de mediadores de estrés como los glucocorticoides y las catecolaminas que conducen al desarrollo de hiperinsulinemia, adiposidad visceral, hipertensión arterial, intolerancia a la glucosa y

dislipidemia (Chrousos y Gold 1998; Chrousos 2000; Björntop 2001; Rosmond 2005; Pervanidou y Chrousos. 2011).

### **1.3 Glucocorticoides**

Los glucocorticoides son hormonas esteroideas sintetizadas en la zona fasciculada de la glándula adrenal (Grasa-Martínez 2004; Pinheiro y cols. 2009), bajo el control de un sistema de retroalimentación neuroendocrina a través, del eje HPA (Vegiopoulos y Herzing 2007).

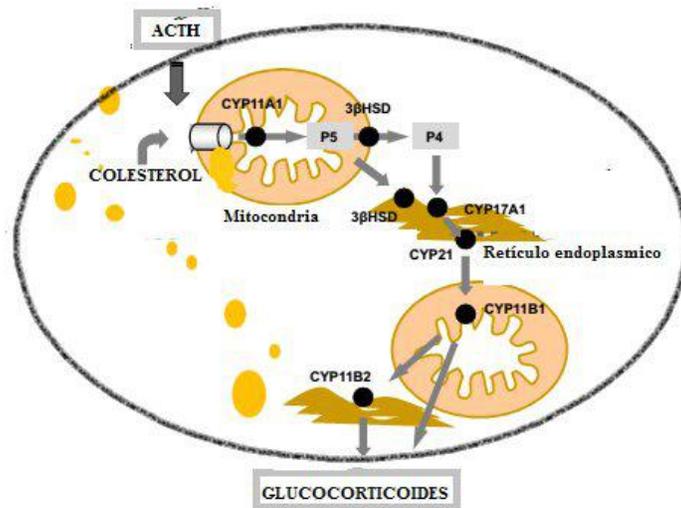
La activación del eje HPA se inicia en el núcleo paraventricular hipotalámico con el aumento en la síntesis de la hormona liberadora de corticotropina (CRH, por sus siglas en inglés), la cual se libera al sistema hipofisario, que al unirse a su receptor en las células corticotropas de la adenohipófisis, se produce la secreción de la hormona adrenocorticotropina (ACTH, por sus siglas en inglés) que a su vez, estimula la producción de glucocorticoides en las glándulas adrenales (Schawartz y cols. 2003; Perello y Spinedi 2004). Los glucocorticoides plasmáticos, a su vez, determinan un mecanismo de retroalimentación negativo sobre la actividad neuronal, regulando la síntesis de CRH y la sensibilidad a los mecanismos activadores del eje. La síntesis y secreción de glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en roedores), representa el paso final de una cascada neuroendocrina que inicia en el sistema nervioso central (Sapolsky y cols. 2000; Pacak y Palkovits 2001).

La secreción de glucocorticoides sigue un ritmo circadiano regulado por el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (Pervanidou y Chrousos 2012) que aumenta ante situaciones de ayuno prolongado y condiciones de estrés (Grasa-Martínez 2004). Estas hormonas son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis metabólica y juegan un papel importante en el metabolismo de carbohidratos y lípidos (Stimson y Walker 2008; Vegiopoulos y Herzig 2007; Pinheiro y cols. 2009; Nader y cols. 2012).

Las células esteroideogénicas pueden emplear dos fuentes potenciales de colesterol para la esteroideogénesis: la primera, a través de la síntesis de colesterol de *novo* pasando por la vía del acetato en el retículo endoplásmico; y la segunda, a partir del colesterol ligado a lipoproteínas circulantes. Hay dos principales mecanismos para esto: la absorción de la

circulación de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (principal fuente de colesterol esteroidogénica en roedores) a través de receptores scavenger B1 (SR-B1), y la captación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) (fuente esteroidogénica en humanos), derivadas principalmente de fuentes dietéticas a través de receptores LDL en la superficie celular (Miller y Bose 2011).

La ACTH induce la esteroidogénesis por la unión al receptor acoplado a proteína G (Kraemer y cols. 2013), a través de la activación de la adenilato-ciclasa que genera AMP cíclico activando la proteína quinasa (PKA) dependiente de AMP (Kraemer y cols. 2013) promoviendo la movilización de colesterol a través de endocitosis mediada por receptor (Miller y Bose 2011) hacia la mitocondria y su translocación de la membrana mitocondrial externa hacia la interna, donde ocurre la síntesis de pregnenolona por acción de la enzima citocromo P450<sub>sc</sub> (CYP11A1; por sus siglas en inglés cholesterol side cleavage enzyme) (Stocco 2001; Miller y Bose 2011; Gómez-Chang y cols. 2012). La pregnenolona formada (P5) se metaboliza por 3 $\beta$ -HSD mitocondrial o del retículo endoplásmico, que conduce a la formación a la progesterona (P4). P5 metabolizado por CYP17 forma dehidroepiandrosterona y P4 metabolizado por las formas CYP17 androstenediona que también está formado por dehidroepiandrosterona a través de la acción de 3 $\beta$ -HSD. En la glándula adrenal, P4 y 17-hidroxiprogesterona son metabolizados por CYP21 para formar 11-desoxicorticosterona y 11-desoxicortisol, respectivamente, que se metaboliza adicionalmente por CYP11B1 en las mitocondrias para formar corticosterona y el cortisol, respectivamente (Papadopoulos y Miller 2012; Figura 1).



**Figura 1.** Síntesis de glucocorticoides en la glándula adrenal.

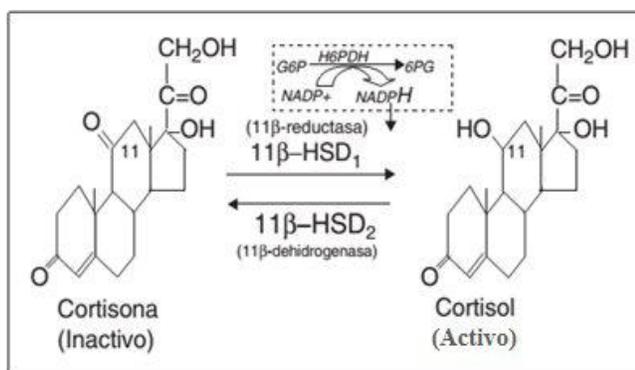
Cerca del 80-85% de los glucocorticoides viajan en sangre unidos a la globulina ligadora de corticosteroides (CBG) y cerca de un 10-15% unidos a la albúmina, quedando apenas una fracción del 5% de cortisol libre circulante considerado biológicamente activo (Rodes y cols. 2001; Grasa-Martínez 2004; Opherk y cols. 2004; Vegiopoulos y Herzig 2007). Los efectos fisiológicos de los glucocorticoides son mediados a través de receptores citoplasmáticos (Vegiopolus y Herzing 2007) que viajan al núcleo celular y promueven o inhiben la expresión de genes (Grasa-Martínez 2004). Hay dos subtipos de receptores: los receptores a glucocorticoides (GR) tipo 2 de baja afinidad y receptores a mineralocorticoides (MR) tipo 1 de alta afinidad (Walker 2007).

Los tejidos que expresan receptores a glucocorticoides son el hígado, pulmón, tejido adiposo, músculo, corteza adrenal, células  $\beta$  pancreáticas y la glándula pituitaria anterior, tejidos determinantes para la homeostasis de lípidos, insulina y glucosa hepática. Mientras que, el receptor a mineralocorticoides se expresa en la nefrona distal, hipocampo, corazón, colon distal, glándulas salivales y sudoríparas (Seckl y cols. 2004; Vegiopoulos y Herzig 2007).

La síntesis y secreción de glucocorticoides representa el paso final de una cascada de señalizaciones reguladas por el sistema neuroendocrino (Vegiopoulos y Herzig 2007). Sin embargo, hay evidencias de una síntesis local de glucocorticoides regulado por la enzima  $11\beta$ -

hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $11\beta$ -HSD) (London y cols. 2007; London y Castonguay 2009) la cual ha sido asociada recientemente con la presencia del síndrome metabólico (Czege y cols. 2012). Hay dos isoenzimas: La enzima tipo 1 ( $11\beta$ -HSD1) cuya función es la conversión de cortisona inactiva a cortisol activo y la enzima tipo 2 ( $11\beta$ -HSD2) que cataliza la inactivación de cortisol a cortisona (Seckl y cols. 2004; Tomlinson y cols. 2004).

La  $11\beta$ -HSD1 es un enzima luminal del retículo endoplásmico, que se expresa en hígado y tejido adiposo. La actividad reductora de  $11\beta$ -HSD1 es totalmente dependiente del cofactor nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), obtenido por la acción de la hexosa-6-fosfato deshidrogenasa (H6PDH), enzima de inicio de la vía de las pentosas, y co-localizada con  $11\beta$ -HSD1 en la cara interna del retículo endoplásmico (Fernández-Vázquez y cols. 2011; Czege y cols. 2012; Figura 2).



**Figura 2.** Modulación intracelular de la acción glucocorticoide. Glucosa-6-fosfato (G6P), Hexosa-6-fosfato deshidrogenasa (H6PDH).

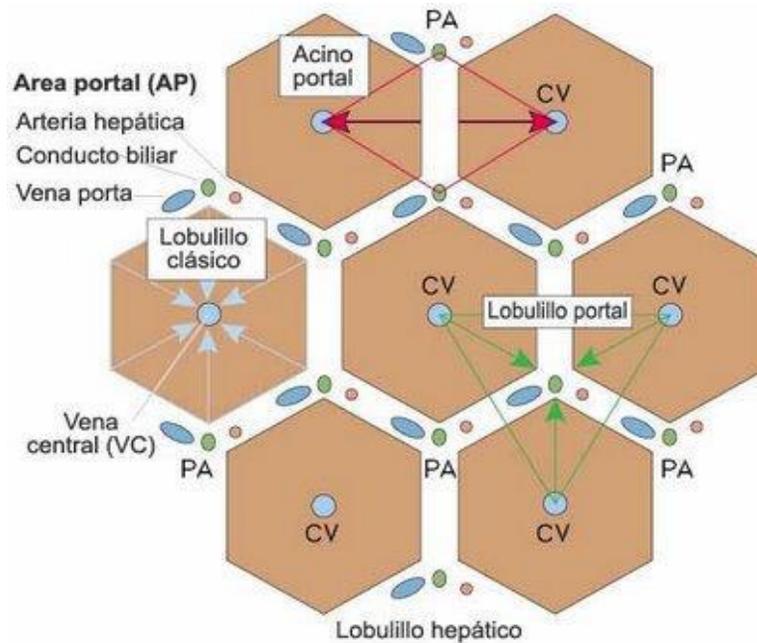
En el hígado la activación de la enzima  $11\beta$ -HSD1 amplifica la síntesis local de glucocorticoides. Estudios en humanos como en roedores obesos han mostrado un aumento de la enzima  $11\beta$ -HSD1 (Seckl y cols. 2004). En apoyo a lo anterior, estudios realizados mediante la infusión de cortisol tetramarcado con deuterio (F-4D) tanto en perros como en humanos obesos, han mostrado que más del 50% de la producción diaria de cortisol procede de la activación de cortisona por la acción de la enzima  $11\beta$ -HSD1 extra-suprarrenal, básicamente hepática (Fernández-Vázquez y cols. 2011).

Por otra parte, se ha mostrado que el aumento de la producción hepática de cortisol en los obesos con síndrome metabólico no se acompaña de hipercortisolismo sistémico, porque ambos orígenes del cortisol circulante, suprarrenal y hepático, están en equilibrio dinámico y el aumento de producción hepática se ve compensado por un mayor catabolismo hepático del cortisol y una menor actividad del eje corticosuprarrenal, como se demuestra por el aumento de ACTH dosis dependiente en respuesta al tratamiento con inhibidores específicos de 11 $\beta$ -HSD1 (Rosenstock y cols. 2010).

#### **1.4 Hígado**

El hígado es la glándula más grande del organismo y se encuentra localizada en el hipocondrio derecho del abdomen (Fortoul 2010). El hígado se encuentra dividido en lóbulos (Tanaka y cols. 2011) y en la rata se compone por 6 lóbulos (Möller y Vázquez 2011). La unidad estructural del hígado son los hepatocitos que se encuentran formando trabéculas de una sola célula de espesor separadas por los sinusoides, que en conjunto forman el parénquima. A través de los sinusoides se encuentra el espacio perisinusoidal (espacio de Disse) ubicado entre el endotelio sinusoidal y los hepatocitos (Ross y cols. 2005; Tanaka y cols. 2011). El núcleo de los hepatocitos está ubicado en el centro de la célula y su tamaño varía, algunos de estos núcleos son diploides y su vida media es de por lo menos 150 días (Ross y cols. 2005; Welsch y Sobotta 2009).

En términos de una unidad funcional existen tres maneras de describir la estructura del hígado: el lobulillo clásico, el lobulillo portal y el ácino hepático (Figura 3).



**Figura 3.** Representación del lobulillo clásico, portal y ácino hepático.

En el lobulillo clásico, los hepatocitos adoptan una disposición radial, desde la vena central en el cual, desembocan los sinusoides hacia la periferia del lobulillo. En los ángulos se encuentran los espacios portales o de Kiernan, que consisten en tejido conjuntivo laxo estromal caracterizados por la presencia de triadas portales (Ross y cols. 2005). El lobulillo portal, es el conducto interlobulillar de la triada portal del lobulillo clásico. Sus bordes externos son líneas imaginarias trazadas entre las tres venas centrolobulillares más cercanas a esa triada portal que definen un bloque de tejido triangular con porciones de los tres lobulillos clásicos que secretan la bilis y drenan en su conducto biliar axial (Ross y cols. 2005). El ácino hepático, ocupa parte de dos lobulillos clásicos contiguos. Los hepatocitos en cada ácino se describen dispuestos en tres zonas elípticas concéntricas que de acuerdo al flujo sanguíneo sinusoidal en las tres zonas varía el gradiente de oxígeno, la actividad metabólica de los hepatocitos y la distribución de las enzimas hepáticas. Las células de la zona 1 son las primeras en recibir oxígeno, nutrientes y toxinas desde la sangre sinusoidal y son más activos en la gluconeogénesis y en el metabolismo oxidativo de la energía, además de ser las primeras en exhibir alteraciones morfológicas tras la obstrucción de la vía biliar, también son las últimas en morir si hay trastornos de la circulación y son las primeras en regenerarse. Mientras que, los hepatocitos de la zona 3, son más activos

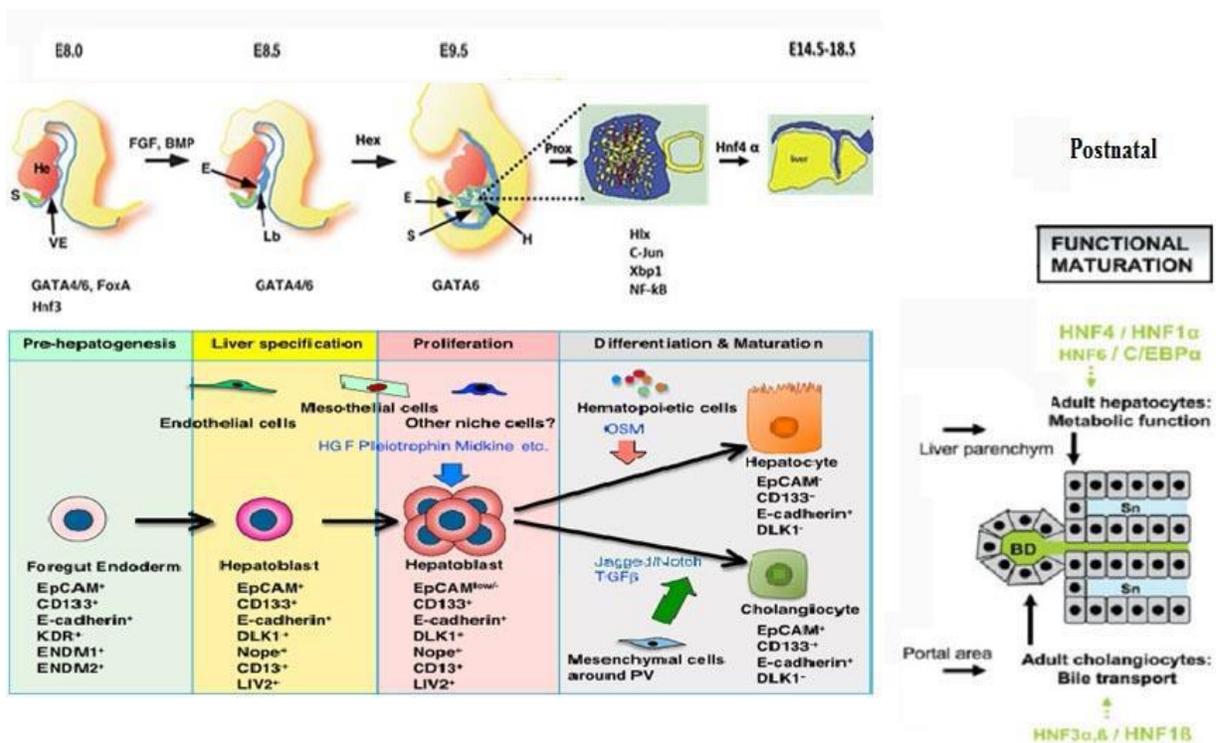
en la glucólisis, lipogénesis y requieren menos oxígeno además de ser los primeros en acumular lípidos (Ross y cols. 2005; Macías-Rodríguez y Torre 2009).

En el hígado hay una doble irrigación que tiene un componente venoso dado por la vena porta (alrededor del 75%) de la que recibe sangre venosa y un componente arterial dado por la arteria hepática de la cual recibe sangre oxigenada (25% de su irrigación). Las ramas de ambos vasos entran en los sinusoides, donde los hepatocitos capturan el oxígeno, los nutrimentos y ciertas sustancias tóxicas, que junto con las ramas de drenaje de la vía biliar son denominadas triada portal. Los compuestos que producen los hepatocitos, se secretan en la sangre a través de los sinusoides que desembocan en la vena central (Ross y cols. 2005; Welsch y Sobotta 2009).

### **1.5 Organogénesis del hígado**

El desarrollo embrionario de los hepatocitos, se origina a partir de los hepatoblastos que se derivan del endodermo definitivo (Zhao y Duncan 2005). En roedores se ha observado que alrededor del día embrionario 7, el endodermo definitivo emerge de la línea primitiva para reemplazar el endodermo extraembrionario del saco vitelino. Posteriormente el endodermo se invagina para formar la vena porta en la parte anterior de la región del embrión en desarrollo que en última instancia definirá el intestino anterior. Aproximadamente en el día embrionario 8.0, la pared ventral del endodermo del intestino anterior se coloca adyacente al corazón, y son señales del corazón las que promueven el inicio del desarrollo del endodermo hacia una formación hepática. El endodermo responde a esta inducción mediante la generación del primordio hepático primario que puede ser identificado como una consecuencia anatómica de la pared ventral del intestino anterior aproximadamente durante el día 8.5-9.0. Alrededor del día 9.5 la membrana basal que rodea el primordio hepático se pierde, y las células deslaminadas del primordio invaden el septum transversal del mesénquima que rodea los hepatoblastos (Duncan 2003; Zhao y Duncan 2005). Factores de crecimiento de fibroblastos (*FGF 1 y 2*) junto con la proteína morfogenética ósea (*BMP*) participan en el desarrollo hepático en el endodermo primario ventral (Jung y cols. 1999) y en particular se ha mostrado que contribuyen a cambios en la morfología celular y proliferación. Por otro lado, el *hex* es esencial para la expansión de la población de hepatoblastos nacientes en el desarrollo del primordio hepático. *GATA4* y *FoxA* participan en el desarrollo del endodermo y la migración de las células hepáticas al septum

transverso mientras que, *GATA6* sirve para la expansión del primordio hepático y la diferenciación de hepatoblastos nacientes. Por otro lado, la expresión de *Prox* promueve la expansión de hasta 84 veces el volumen del hígado entre el día 13.5 y 20.5 en embriones de ratas contribuyendo significativamente a la arquitectura morfológica del hígado (Zhao y Duncan 2005, Miyajima y cols. 2014; Figura 4). Finalmente, es hasta la etapa postnatal cuando se da el establecimiento del ducto biliar de colangiocitos y hepatocitos maduros con capacidad funcional metabólica, regulada por vías de señalización intra y extracelular que incluyen factores de transcripción y crecimiento, citosinas y hormonas (Snykers y cols. 2009).



**Figura 4.** Desarrollo embrionario del hígado en roedores. Endodermo definitivo (área azul), corazón (he), septum transverso (S), endodermo ventral (VE), yema del hígado (Lb), células endoteliales (E), hepatoblastos (H), vena porta (PV).

Adicionalmente, el estilo de vida y la dieta, en el periodo prenatal y postnatal también han sido asociados con modificaciones epigénéticas que hacen susceptibles a órganos de padecer ciertas patologías (Mehedint y Zeisel 2013). El término epigénética es conocido como todas las alteraciones en la expresión de un gen o fenotipos celulares que incluyen todos los

cambios mitóticamente heredados en la expresión génica, no codificados en el ácido desoxirribonucleico (DNA) (Whayne 2014).

Además, se ha mostrado que el estilo de vida y los hábitos alimentarios son capaces de promover la activación de señales inflamatorias, proliferación celular, apoptosis, alteraciones del metabolismo de lípidos y glucosa en hígado (Mehedint y Zeisel 2013). Estudios en modelos animales, han expuesto que ratas que consumen una dieta rica en grasa durante el periodo prenatal promueven la transcripción del gen *Pck1* y un aumento de la expresión del mRNA de los genes *G8Pasa*, *Cebpa*, *Srebp-1a* y *Pgcl1* con un aumento de glucosa sérica al día 21 de edad (Strakousky y cols. 2011). Mientras que, una restricción proteínica durante la gestación disminuye la expresión del gen *Lxra*, con aumento de la *G6pasa* y de la *11 $\beta$ -Hsd1* en hígado de ratas adultas, las cuales participan en el metabolismo de la glucosa y síntesis de ácidos grasos (Cha y Repa 2007; Vo y cols. 2013). Similar a lo que ocurre con dietas altas en grasa/azúcar durante la gestación y lactancia en ratas Sprague-Dawley las cuales en el día postnatal 1 aumentan la cantidad de triglicéridos y glucógeno hepático, glucosa e insulina séricas observándose afectadas la expresión de genes *FAT/CD36*, *PPAR $\gamma$* , *Cpt1a*, *apoB100*, *InsR*, *LepR*, *IGFBP2* y *FGF21*, mientras que en el día postnatal 21 hay un aumento de triglicéridos hepáticos y disminución de insulina (Kjaerdaard y cols. 2014). Algo similar ocurre durante la vida postnatal, donde dietas altas en grasa/carbohidratos y estímulos como el estrés provocan una mayor expresión de genes relacionados con el metabolismo de ácidos grasos (Motoyama y cols. 2009; Renaud y cols. 2014). Sin embargo, no hay trabajos donde se estudien los efectos del estrés y una dieta rica en carbohidratos en el periodo posterior al destete y hasta la edad adulta, etapa considerada crítica en el desarrollo.

### **1.6 Metabolismo de carbohidratos y glucocorticoides**

El hígado interviene de forma directa en el metabolismo de los carbohidratos. Convierte la glucosa en glucógeno para almacenarla en el interior del hepatocito (glucogénesis), en ausencia de glucosa es capaz de transformar los aminoácidos y los lípidos en ésta (gluconeogénesis) y despolimeriza el glucógeno en glucosa (glucogénolisis) e hidroliza la glucosa a piruvato (glucólisis) para ser usado en otras vías metabólicas (Dvorkin y cols. 2010). En condiciones

normales, durante el consumo de alimento, la insulina secretada en las células  $\beta$  pancreáticas, captura la glucosa para ser transportada hacia el hígado inhibiendo la glucogenólisis y la gluconeogénesis (Vegiopoulos y Herzig 2007). Por otra parte, la fructosa particularmente importante debido a la gran cantidad de sacarosa presente en la dieta humana, es primero fosforilada a fructosa 1-fosfato (fructoquinasa hepática) donde es degradada por la aldosa hepática; los productos dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído son utilizados para formar glucosa por la vía de la gluconeogénesis (Vegiopoulos y Herzig 2007). Estas triosas fosfato podrán entrar en la vía glicolítica hasta formar piruvato y oxidarse posteriormente a Acetil CoA. En el hígado el Acetil CoA proporciona carbonos para la síntesis de ácidos grasos, triglicéridos y colesterol, estimulando las vías glicolíticas y lipogénicas en la célula hepática (Esquivel-Solís y Gómez-Salas 2007). Una de las características destacadas del metabolismo del hígado, es la capacidad para la síntesis de *novo* de glucosa durante el ayuno o en condiciones de estrés, con el fin de proporcionar glucosa a los diferentes tejidos extrahepáticos, ya que durante estas etapas los ácidos grasos libres o precursores de los aminoácidos se canalizan en la vía de la gluconeogénesis (Vegiopolus y Herzig 2007).

Para llevar a cabo la gluconeogénesis, se necesita la presencia de tres enzimas: piruvato carboxilasa (PC), el cual convierte el piruvato en oxaloacetato, la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCK), que actúa descarboxilando el oxaloacetato a fosfoenolpiruvato, y la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa), que hidroliza a la glucosa-6-fosfato en glucosa libre donde los glucocorticoides contribuyen al desequilibrio de la gluconeogénesis y la hiperglucemia (Vegiopoulos y Herzig 2007, Nader y cols. 2012). Debido a que los glucocorticoides estimulan la gluconeogénesis hepática por la activación del receptor a glucocorticoides que aumenta la regulación de la expresión de la PEPCK y la G6Pasa. Además, también suprimen la entrada de glucosa dependiente de insulina e inhiben la síntesis de glucógeno, que resulta en una reducida sensibilidad a la insulina y elevada producción de glucosa hepática. En apoyo a lo anterior, la sobreexpresión de H6PDH (hexosa-6-fosfato-deshidrogenasa), PEPCK y G6Pasa se han encontrado aumentadas en pacientes con diabetes mellitus tipo 2, donde fue encontrado un aumento de glucocorticoides (Chandramouli y cols. 2011). Por otra parte, Cassuto y cols. (1997) mostraron que la actividad de la PEPCK es sólo estimulada por los glucocorticoides en el hígado

y riñón, pero suprimida en tejido adiposo, mientras que otros estudios sugieren que la expresión de esta enzima es estimulada en tejido adiposo visceral, hígado y riñón (London y cols. 2007; Chandramouli y cols. 2011). Por lo que, en condiciones donde está elevado el cortisol, el hígado que tiene un tiempo de tránsito sinusoidal relativamente prolongado, puede captar una cierta cantidad de cortisol fijado a su globulina de unión, además de la captación de la hormona libre y de la unida a albúmina que aumentan la gluconeogénesis (Rodes y cols. 2001; Opherk y cols. 2004; Vegiopoulos y Herzig 2007).

Los glucocorticoides también participan de manera importante en el metabolismo de tejido adiposo, debido a que activan a la lipoprotein lipasa (LPL), que promueve el almacenamiento de grasa (Devlin 2000; Arnaldi y cols. 2010; Spencer y Tilbrook 2011), y la liberación de ácidos grasos de los adipocitos a través de la activación de la lipasa sensible a hormonas (HSL), una enzima clave responsable de la movilización de ácidos grasos, inhibida por la insulina (Björntorp 1995). Este aumento en la circulación de ácidos grasos libres puede restringir la utilización de glucosa (Spencer y Tilbrook 2011), causando resistencia a la insulina (Adams y cols. 2005; Arthur y Mccollough 2006; Nseir y cols. 2010). El efecto de insulino-resistencia no es generalizado, por lo que el hígado capta la mayor cantidad de glucosa y ácidos grasos que promueven la lipogénesis hepática de *novo* con el subsecuente aumento del flujo de lipoproteínas (principalmente VLDL). Finalmente, este aumento de ácidos grasos inicia a acumularse en vesículas intracelulares desarrollándose así la esteatosis hepática (Tiniakos y cols. 2010; Nader y cols. 2012).

Por otra parte, los glucocorticoides hormonas diabetogénicas pueden provocar la disminución de la entrada de glucosa e incrementar la producción de glucosa hepática por la estimulación de la gluconeogénesis e inhibir la secreción de insulina (McMahon y cols. 1988; Fernando y cols. 2013). Debido a que la sobreexpresión del receptor de glucocorticoides provoca una disminución del transportador GLUT-2, el cual facilita el ingreso de la glucosa como respuesta al incremento de la glicemia tanto en células  $\beta$  pancreáticas como en hepatocitos (Bermúdez y cols. 2007; Scorletti y cols. 2011). En el páncreas el GLUT-2 facilita la entrada de glucosa a la célula  $\beta$  que aumenta la liberación de insulina por la generación de ATP, a través del aumento de ATP/ADP, que conduce al cierre de canales de potasio provocando una

despolarización de la membrana por la apertura de canales de calcio seguido de la exocitosis de los gránulos secretores de insulina. En apoyo a lo anterior estudios *in vitro* han demostrado la disminución de la liberación de insulina causada por la dexametasona en los islotes pancreáticos asociada con una disminución de GLUT-2 y un aumento de la actividad en la glucosa-6-fosfatasa (Delaunay y cols. 1997). Por lo que, condiciones donde se encuentran niveles elevados de glucocorticoides como en el síndrome de Cushing se han asociado con resistencia a la insulina, diabetes, hipertrigliceridemia e hipertensión arterial (Nader y cols. 2012) además del desarrollo de esteatosis hepática (Pinheiro y cols. 2009; Arnaldi y cols. 2010). Aunque los mecanismos subyacentes de la progresión de la enfermedad del hígado graso no alcohólico no son claros, la resistencia a la insulina, la obesidad y factores dietéticos parecen jugar un rol clave en su desarrollo (Nseir y cols. 2010).

En particular Opherk y cols. (2004), han mostrado la participación de los glucocorticoides en el metabolismo de glucosa hepático, inactivando el gen del receptor de glucocorticoide en el hepatocito de ratones con diabetes inducida. Observaron que la ausencia del receptor de glucocorticoide en el hepatocito, evita el desarrollo de hiperglucemia en diabetes mellitus II inducida, probablemente al dañarse el proceso de la gluconeogénesis, sugiriendo que la disminución de la función del receptor de glucocorticoide en hígado durante el metabolismo de la glucosa puede controlar la hiperglucemia diabética. De tal manera que, utilizando antagonistas del receptor de glucocorticoide en hígado, disminuye los niveles de hiperglucemia y dislipidemias en modelos animales con diabetes mellitus II (Vegiopoulos y Herzig 2007).

De manera específica se ha mostrado que el consumo de sacarosa en la rata adulta produce esteatosis hepática (Bacon y cols. 1984; Huang y cols. 2007) y el aumento del contenido de grasa visceral (El Hafidi y cols. 2001; Alexander y cols. 2004, London y cols. 2007, Pérez-Torres y cols. 2009) pero no el aumento de los niveles de glucocorticoides (Fuente-Martín y cols. 2012; Corona-Pérez 2013). Adicionalmente, se ha sugerido que una alimentación con sacarosa puede tener un impacto sobre el metabolismo de los glucocorticoides debido a sus efectos sobre la actividad de la 11 $\beta$ -HSD1, que resulta en un

incremento en la actividad de los glucocorticoides (London y Castonguay 2009; Chandramouli y cols. 2011). Pero también el estrés puede aumentar la actividad de la enzima 11 $\beta$ -HSD1 (Fernando y cols. 2013; Altuna y cols. 2006). La inducción de distintos tipos de estrés por pocas horas en ratas macho Sprague-Dawley causa un incremento en la actividad de la 11 $\beta$ -HSD1 en hígado debido a un incremento en NADPH, así como una reducción de pH debido a la glucólisis anaerobia que ocurre durante situaciones de estrés. El NADPH generado por la hexosa 6-fosfato deshidrogenasa (H6PHD), actúa como un cofactor para la 11 $\beta$ -HSD1 mientras que un pH bajo favorece su acción reductasa, ambos incrementan la acción catalítica de conversión de glucocorticoides inactivos a glucocorticoides activos (Brown y cols. 1993; Nashev y cols. 2007).

### **1.7 Esteatosis hepática no alcohólica**

La esteatosis hepática no alcohólica es una enfermedad metabólica caracterizada por la presencia de vacuolas llenas de triglicéridos en el citoplasma de los hepatocitos (Burt y cols. 1998; Tiniakos y cols. 2010). Se ha asociado con la presencia de resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2, obesidad y dislipidemias, cuadro clínico del síndrome metabólico (Loria y cols. 2005; Alkhoury y cols. 2010).

Según la morfología y tamaño de las vacuolas se distinguen dos tipos de esteatosis que pueden indicar acumulación crónica o aguda de lípidos (Brunt 2001):

- **Microvesicular:** En este proceso los hepatocitos están ocupados por numerosas vacuolas pequeñas de lípidos que dejan el núcleo en el centro de la célula proporcionándoles un aspecto espumoso (Fong y cols. 2000; Welsch y Sobotta 2009). Es asociada con un defecto de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos libres (Brunt 2001).
- **Macrovesicular:** Existe una única vacuola de grasa de gran tamaño que desplaza el núcleo a la periferia del hepatocito (Fong y cols. 2000; Welsch y Sobotta 2009). Resulta de un incremento deliberado de la oxidación y disminución en la secreción de lípidos en el hígado (Brunt 2001).

Según el porcentaje de hepatocitos afectados (Adams y cols. 2005; Tiniakos y cols. 2010), se clasifica en:

- Grado 0: Menor o igual al 5% de los hepatocitos afectados.
- Grado 1. De 5 a 33% de los hepatocitos afectados.
- Grado 2. De un 34% a un 66% de los hepatocitos afectados.
- Grado 3: Más del 66% de los hepatocitos afectados.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Modelos animales**

#### **2.1.1 Consumo de carbohidratos y esteatosis hepática**

En modelos animales, el consumo de carbohidratos a distintas concentraciones y tiempo de exposición han sido asociados con la presencia de obesidad, alteraciones metabólicas y el desarrollo de la enfermedad del hígado graso no alcohólico durante la edad adulta (El Hafidi y cols. 2001; 2004; Alexander y cols. 2004; Kawasaki y cols. 2009; Pérez-Sánchez 2011). Estudios realizados en ratas macho Wistar alimentadas con una dieta alta en sacarosa (68%) durante 5 semanas mostraron dislipidemia, esteatosis hepática y resistencia a la insulina (Huang y cols. 2007). Por otra parte, en ratas macho Wistar alimentadas con sacarosa al 5% durante dos meses, hubo altos niveles de triglicéridos, aumento en el área total de los hepatocitos y esteatosis hepática (Pérez-Sánchez 2011). Mientras que, Bacon y cols. (1984) mostraron en ratas macho Sprague-Dawley que consumieron sacarosa del 40-50% una disminución del peso corporal y del hígado en comparación con las ratas que consumieron 20-35% de sacarosa o dieta Chow durante tres semanas. Sin embargo, la concentración de triglicéridos hepáticos fue mayor en las ratas que consumieron de 25 a 50% de sacarosa, observándose esteatosis hepática en todas las concentraciones de sacarosa. Aunado a ello, Roncal-Jiménez y cols. (2011) mostraron en la rata macho Sprague-Dawley alimentada con una dieta alta en sacarosa (40%) durante 4 meses, el desarrollo de hígado graso. En apoyo a lo anterior, estudios realizados en ratones macho de la cepa C57BL/6 alimentados con una dieta alta en sacarosa (65%) durante 6 semanas muestran un desarrollo de obesidad, esteatosis hepática y resistencia a la insulina, destacando el papel de la apoptosis en el reclutamiento de macrófagos del tejido adiposo e inflamación, contribuyendo a la resistencia a la insulina y acumulación de lípidos hepáticos (Alkhoury y cols. 2010). Cabe

mencionar que todos estos estudios han sido realizados durante la edad adulta y no han analizado la participación de los glucocorticoides. En nuestro laboratorio hemos mostrado en ratas macho Wistar que el consumo de sacarosa (30%) a temprana edad durante tres meses provoca un proceso inflamatorio progresivo seguido de una esteatosis hepática grado 1, aunque la concentración de corticosterona fue disminuida (Corona-Pérez 2013). Estos resultados, nos hacen sugerir que no precisamente se necesita de corticosterona para inducir esteatosis hepática, sin embargo, es posible proponer que la presencia de corticosterona podría influir en potenciar la esteatosis hepática.

Como se mencionó anteriormente la enzima  $11\beta$ -HSD1 participa de manera importante en la síntesis local de glucocorticoides. En apoyo a ello, London y cols. (2007) han mostrado la expresión de la enzima hexosa-6-fosfato-deshidrogenasa (H6PDH) y  $11\beta$ -HSD1 en hígado y tejido adiposo visceral en ratas macho adultas Sprague-Dawley que consumen sacarosa al 16 y 32%. Por otro lado, se ha mostrado en ratones transgénicos ApoE-HSD1, que la sobreexpresión de la enzima  $11\beta$ -HSD1 y el subsecuente aumento en los niveles de glucocorticoides son suficientes para provocar resistencia a la insulina, esteatosis hepática e incremento en la síntesis de lípidos hepáticos (Paterson y cols. 2004; Vegiopoulos y Herzig 2007).

### **2.1.2 Glucocorticoides y esteatosis hepática**

Niveles elevados de glucocorticoides han sido asociados con el desarrollo de esteatosis hepática (Paterson y cols. 2004, Vegiopoulos y Herzig 2007; Arnaldi y cols. 2010). En la rata macho Sprague-Dawley, se ha mostrado que el tratamiento con dexametasona (un glucocorticoide sintético) durante 7 días aumenta la concentración de ácidos grasos libres en plasma, triglicéridos, VLDL y colesterol, lo que provoca la acumulación intracelular de lípidos en hígado (Cole y cols. 1982). Mientras que Pinheiro y cols. (2009) mostraron que en la rata macho adulta de la cepa Wistar a las que les administró dexametasona durante un mes, desarrollan hiperglicemia, menor tolerancia a la glucosa, elevación de colesterol, LDL, VLDL y triglicéridos, disminución del HDL, presencia de esteatosis hepática e hipotrofia muscular. Por el contrario, en modelos animales de obesidad, dislipidemia y esteatosis hepática como en el

ratón db/db, ob/ob y KKA (y) los niveles de glucocorticoides han sido encontrados elevados (Vegiopoulos y Herzig 2007).

### **2.1.3 Efectos del estrés en hígado**

Los informes clínicos sugieren una estrecha interacción entre los factores de estrés y las enfermedades del hígado (Djordjevic y cols. 2010). Dado que el hígado juega un rol indispensable en la respuesta adaptativa al estrés, promoviendo compuestos ricos en energía, tales como glucosa y lípidos necesarios para la adaptación del organismo (Sapolsky y cols. 2000).

Estudios realizados en ratas machos Wistar durante la edad adulta utilizando un modelo de inmovilización (2h al día, durante 5 días consecutivos) como estrés crónico, han mostrado una disminución de peso corporal y de ingesta de alimento, con una reducción de glucógeno en hígado e insulina en plasma (sin variaciones en los niveles de glucosa). Mientras que, el estrés agudo (inmovilización por 30 minutos) aumenta los niveles de corticosterona, insulina, gliceroI, cuerpos cetónicos y glucosa (Ricart-Jané y cols. 2002; Djordjevic y cols. 2010). Por otra parte, un estudio realizado en la rata macho Wistar utilizando 21 días de aislamiento social como modelo de estrés crónico, mostró una disminución de corticosterona sérica y glucosa y un aumento del estado pro-oxidativo del hígado (Djordjevic y cols. 2010).

Motoyama y cols. (2009) estudiaron el efecto del estrés por aislamiento social por 4 semanas sobre el metabolismo de lipídico hepático en ratones macho de la cepa BALB/c, encontrando que la vía del receptor activado por proliferadores de peroxisomas subtipo alfa (PPAR $\alpha$ ) fue notablemente disminuido, y la biosíntesis de lípidos controlada por elementos de enlace reguladores de esteroides factor I (SREBP-1) fue significativamente aumentada. Por otra parte, el grupo de Sakakibara y cols. (2012) estudiaron el efecto del estrés por aislamiento social sobre la biosíntesis de lípidos y sus efectos en el hígado durante 13 semanas en ratones macho de la cepa C57BL/6J de 4 semanas de edad encontrando un incremento en el peso corporal, peso del hígado y grasa visceral con cambios histológicos en los hepatocitos por acumulación de grasa, acompañada de un aumento de corticosterona sérica en la semana 1, sin embargo una disminución gradual de la hormona fue mostrada posiblemente debido a la habituación de los

animales a la exposición de estrés crónico. Adicionalmente, revelaron una disminución de triglicéridos en plasma sugiriendo que se debe a una acumulación de triglicéridos en hígado. Además, la disminución de ácidos grasos libres en plasma pudo ser debido al alto potencial de inhibición de la lipoproteína lipasa (LPL) ante las condiciones de estrés, sugiriendo que la exposición a estrés crónico por estrés social puede incrementar el riesgo de hipertrofia por la acumulación de grasa hepática (Sakakibara y cols. 2012).

Por otro lado, estudios en humanos y modelos animales, así como en cultivos de tejidos, tienen reportado que la exposición al estrés y elevados niveles de glucocorticoides incrementan la generación de especies reactivas de oxígeno (Arcego y cols. 2013) que causan daño a estructuras celulares tales como las proteínas, lípidos, membranas y ácido desoxirribonucleico (DNA) (Valko y cols. 2007). También la respuesta adaptativa al estrés involucra importantes cambios en la función mitocondrial, lo que les permite ajustar la bioenergética, termogénesis, oxidación y/o respuesta de apoptosis (Manoli y cols. 2007).

#### **2.1.4 Sacarosa más estrés en hígado**

Uno de los pocos modelos donde han analizado el efecto del consumo de sacarosa (30%) más estrés crónico (frío a 4°C) es el realizado por Bell y cols. (2002) en la rata macho Sprague-Dawley adulta durante doce días, donde observan que las ratas consumen mayor cantidad de agua con sacarosa y disminuyen el consumo de alimento. Sin embargo, su ingesta calórica aumenta y disminuye su peso corporal. Es decir, la cantidad de tejido adiposo aumenta con la sacarosa y disminuye con la exposición al frío. No hay diferencias en el peso de las adrenales. Mientras que, con el frío las concentraciones plasmáticas de los triglicéridos y glicerol disminuyen hay un aumentó en la cantidad de ácidos grasos libres en plasma, de manera contraria a las ratas que consumen sacarosa. La ingesta de sacarosa no tuvo ningún efecto sobre la corticosterona en plasma mientras que, el frío, aumentó su concentración. La concentración de insulina y leptina disminuyeron en los animales expuestos al frío en comparación a los animales que consumieron sacarosa donde sí aumentaron dichos parámetros. De modo que los cambios inducidos por la exposición al frío fueron atenuados por el consumo de sacarosa reduciendo la secreción de corticosterona inducida por el estrés. Sugiriendo que la ingesta de

sacarosa inhibe los efectos del estrés, ya que los individuos pueden habituarse regulando el estrés a través de la manipulación de un nutriente.

Por otro lado, el estrés por aislamiento entre los días 21 y 28 de edad induce un desbalance oxidativo hepático debido al incremento en la producción de especies reactivas, así como una disminución en la actividad de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa y catalasa). Adicionalmente, al término del periodo se proporciono una dieta palatable (sacarosa o grasa) hasta el día 60, encontrando que los efectos del estrés son aumentados por una dieta rica en grasa en comparación con lo que sucede con una dieta alta en carbohidratos. Por lo que, sugiriendo que los estresores durante la vida temprana pueden programar el desarrollo y metabolismo en la edad adulta (Arcego y cols. 2014).

Cabe resaltar que en los trabajos anteriormente citados no se ha investigado de manera sistemática la relación entre el consumo de sacarosa más estrés sobre los niveles de corticosterona y el desarrollo de esteatosis hepática desde una temprana edad. Recientemente en nuestro laboratorio, utilizando el modelo de consumo con sacarosa al 30% desde los 21 días de edad en la rata macho Wistar durante tres meses, mostramos un daño hepático caracterizado por un proceso inflamatorio y esteatosis hepática grado 1 acompañado de una disminución de los niveles de corticosterona sérica (Corona-Pérez 2013) y un aumento de tejido adiposo, triglicéridos y VLDL (Díaz-Aguila 2012). Dado que se han relacionado los glucocorticoides con el desarrollo de esteatosis hepática, a nosotros nos interesa saber si el consumo de sacarosa más estrés, nos puede aumentar de manera fisiológica las concentraciones de corticosterona y con ello potenciar el efecto de la sacarosa sobre el desarrollo de esteatosis hepática desde una temprana edad.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La obesidad es una enfermedad crónica reconocida como un problema de salud pública (Marti y cols. 2008). En México su prevalencia ha aumentado con rapidez; tanto en niños como en adolescentes y adultos (ENSANUT 2016). Recientemente, se ha señalado su importancia en el desarrollo de hígado graso no alcohólico (Nseir y cols. 2010; Agius 2013), a través de la correlación con los niveles elevados de cortisol presentes en orina y suero en pacientes obesos adultos (Altuna y cols. 2006). Por otra parte, se ha mostrado que el aumento de la producción hepática de cortisol en los obesos con síndrome metabólico no se acompaña de hipercortisolismo sistémico, porque ambos orígenes del cortisol circulante, suprarrenal y hepático, están en equilibrio dinámico (Rosenstock y cols. 2010). Sin embargo, los mecanismos subyacentes de la progresión de la enfermedad del hígado graso no alcohólico no son claros.

Se ha sugerido que factores ambientales y hábitos alimentarios, como el estrés (Czech y cols. 2013; Liu y cols. 2014), y el consumo de bebidas azucaradas (Manti y cols. 2014), son altamente implicados en la prevalencia de obesidad (Kyrou y cols. 2006; Klump y cols. 2007) y el metabolismo de los glucocorticoides debido a sus efectos sobre la actividad de la  $11\beta$ -HSD1 (London y Castonguay 2009; Chandramouli y cols. 2011), la cual ha sido asociada recientemente con la presencia del síndrome metabólico (Czegle y cols. 2012). En el hígado, la activación de la enzima  $11\beta$ -HSD1 amplifica la síntesis local de glucocorticoides, su acción sobre la lipogénesis hepática (Silva y Duran 2014) y el aumento de lípidos hepáticos asociados con el aumento de la síntesis y secreción de VLDL (Adiels y cols. 2006). Sin embargo, la relación entre el estrés, los glucocorticoides, y el metabolismo de carbohidratos desde una temprana edad hasta la edad adulta no ha sido estudiada.

Actualmente, se desconoce si la ingesta de sacarosa y estrés crónico pueden potenciar el desarrollo del hígado graso no alcohólico. Debido a esto, el objetivo del presente estudio se centra en analizar los componentes adyacentes a la evolución y desarrollo de el hígado graso no alcohólico en ratas, desde el destete hasta la edad adulta; con el fin de proveer una mejor comprensión de los acontecimientos de la vida temprana, promoviendo medidas preventivas durante la infancia y disminuir la vulnerabilidad a los trastornos relacionados a la edad adulta.

#### **4. HIPÓTESIS**

El consumo de sacarosa a temprana edad más estrés aumenta los niveles de corticosterona sérica y potencia el desarrollo de esteatosis hepática en la rata macho.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Analizar el efecto del consumo de sacarosa a temprana edad más estrés sobre el aumento de los niveles de corticosterona sérica y la potenciación del desarrollo de esteatosis hepática en la rata macho.

#### **5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

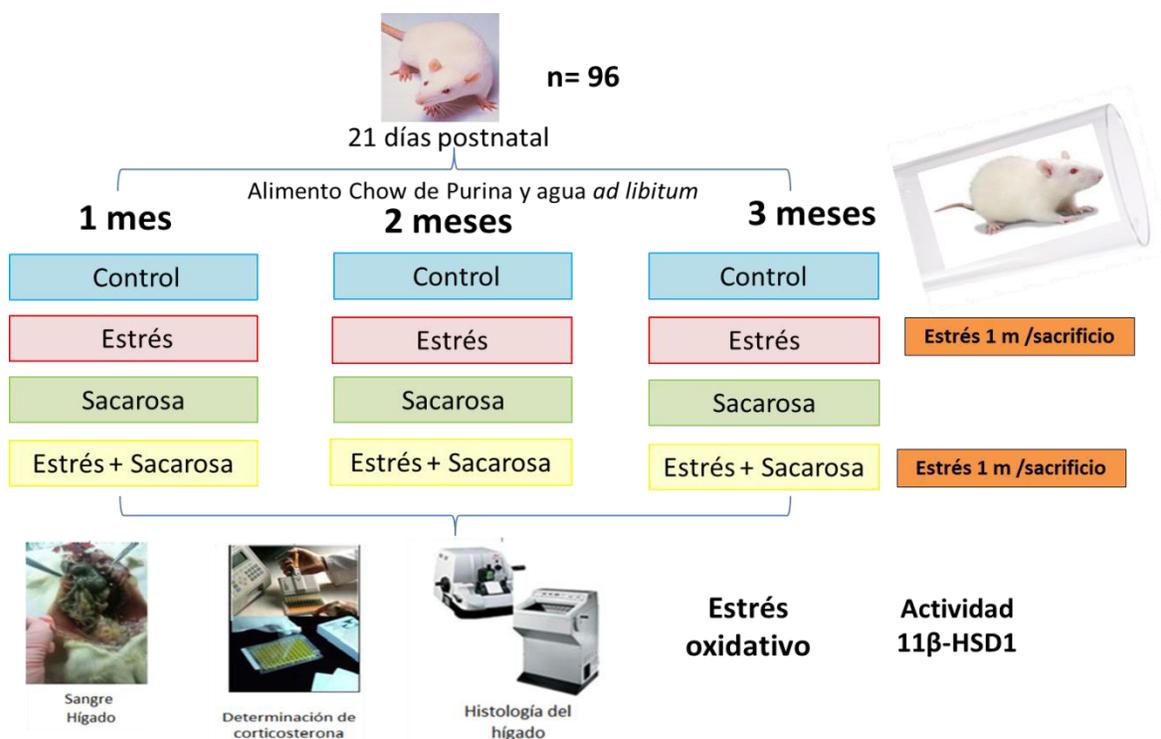
- a) Determinar la concentración de corticosterona sérica en función del tiempo y tratamiento
- b) Evaluar la organización histológica hepática
- c) Determinar los niveles de triglicéridos hepáticos
- d) Evaluar la actividad enzimática de la  $11\beta$ -HSD1 en hígado
- e) Evaluar el daño oxidativo hepático

Adicionalmente se realizó la cuantificación de tejido adiposo que servirá para la interpretación de los resultados.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Manejo de los animales

Se utilizó 96 ratas machos de la cepa Wistar de 21 días de edad. Al día del destete se tomaron ratas machos procedentes de madres diferentes. Las ratas se colocaron aleatoriamente en jaulas independientes mantenidas en condiciones de bioterio, con un fotoperiodo de 12/12 h, con ciclo luz-oscuridad invertido y temperatura de  $20 \pm 2$  °C. Las ratas se dividieron en 4 grupos experimentales: ratas que consumen agua simple (C), agua simple + estrés crónico (E), agua azucarada 30% (A30) y estrés crónico + agua azucarada 30% (E + A30) con una duración del periodo experimental de uno, dos y tres meses. Las ratas fueron expuestas a estrés un mes antes del sacrificio en los grupos correspondientes (Figura 5).



**Figura 5.** Diseño experimental: n=8 animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple+estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E + A30, estrés crónico + sacarosa al 30%.

## 6.2 Protocolo de la dieta

Todas las ratas fueron alimentadas con dieta normal Chow 5001 de Purina (Tabla 1). Los grupos experimentales recibieron 30% de sacarosa estándar comercial en el agua que consumieron, las ratas del grupo control consumieron agua simple. El consumo de alimento y agua fue *ad libitum*. Durante el periodo experimental, se hizo un registro diario del peso corporal, consumo de alimento y agua. El consumo de alimento y agua fue medido colocando una cantidad conocida en cada jaula obteniendo la cantidad remanente 24 horas después.

<b>Nutrimento</b>	<b>Porcentaje (%)</b>	<b>Kcal</b>
Proteínas	29	98.6
Lípidos	13	44.2
Carbohidratos	58	197.2
Total	100	340

**Tabla 1.** Aporte calórico y nutrimental por cada 100 gramos de alimento de dieta Chow 5001 de Purina.

## 6.3 Estrés

Para someter las ratas a estrés, se colocaron en tubos de plástico de diferentes tamaños, fijados con cinta adhesiva en el exterior, un extremo se mantuvo abierto para que la rata pudiera respirar, las ratas fueron expuestas a 1h diaria de estrés por la mañana (entre 11:00 y 12:00) durante 5 días a la semana hasta concluir el experimento (sin estrés los fines de semana) (Macedo y cols. 2012).

## 6.4 Obtención de kilocalorías (kcal) consumidas en el alimento

Para la obtención de kcal consumidas por el alimento:

- 1.- Se obtuvo la ingesta de alimento por semana de vida de cada individuo.
- 2.- Posteriormente se eligió un día al azar para promediar y se obtuvo los gramos de alimento consumidos por grupo por semana.

3.- Estos gramos de alimento se multiplicaron por 3.4 que son las kcal que nos proporciona 1g de alimento Chow 5001.

### **6.5 Obtención de kilocalorías (kcal) consumidas en el agua**

Para la obtención de kcal por el consumo de agua se realizó lo siguiente:

- 1.- Se obtuvo la ingesta de agua por semana de vida de cada individuo.
- 2.- Posteriormente todas las ingestas se promediaron para obtener el volumen (ml) consumido por grupo por semana.
- 3.- Este volumen se multiplicó por 30g de azúcar y se dividió entre 100 ml de agua para obtener los gramos de azúcar consumidos.
- 4.- Estos gramos fueron multiplicados por 4 que son las kcal que nos proporciona un gramo de azúcar para obtener las kcal consumidas en el agua.

### **6.6 Obtención de muestras sanguíneas, hígado y tejido adiposo**

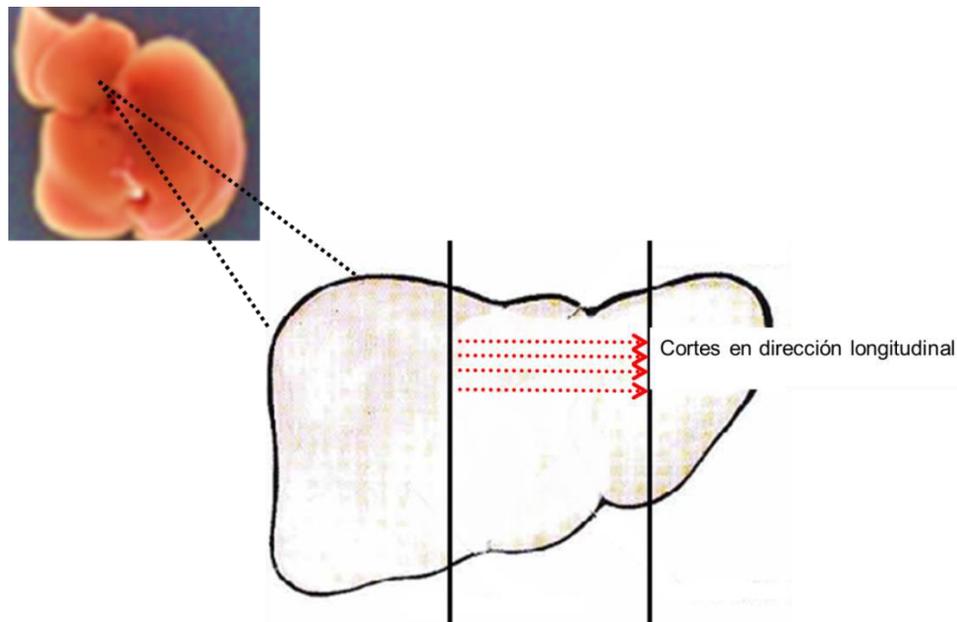
Al término del periodo experimental previo al sacrificio, las ratas fueron dejadas en ayuno, para lo cual se les retiró el alimento a las ocho de la noche. Las ratas del grupo A30 se les retiró el agua azucarada, colocándoles agua simple para cumplir un ayuno de doce horas. Al día siguiente, a las ocho de la mañana a cada rata se le midió la glucosa sérica con un analizador Accutrend GCT, Roche Diagnostics. Posteriormente, los animales fueron sacrificados por decapitación para colectar dos tubos (13 x 100mm) de sangre. La sangre se dejó reposar en baño maría durante 15 minutos, después se centrifugaron a 2500 rpm durante 15 minutos. El suero fue separado en alícuotas de 300  $\mu$ L, las cuales se conservaron en congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis de corticosterona. La rata decapitada inmediatamente se colocó en posición supina, se realizó una incisión longitudinal sobre la línea media ventral, desde la cavidad abdominal hasta el dorsal del pene. El hígado y el tejido adiposo visceral (pericardio, visceral, perirrenal y gonadal) fueron extraídos y pesados. El índice de adiposidad fue calculado como tejido adiposo total (g) dividido entre el peso corporal (g) x 100.

## **6.7 Determinación de corticosterona**

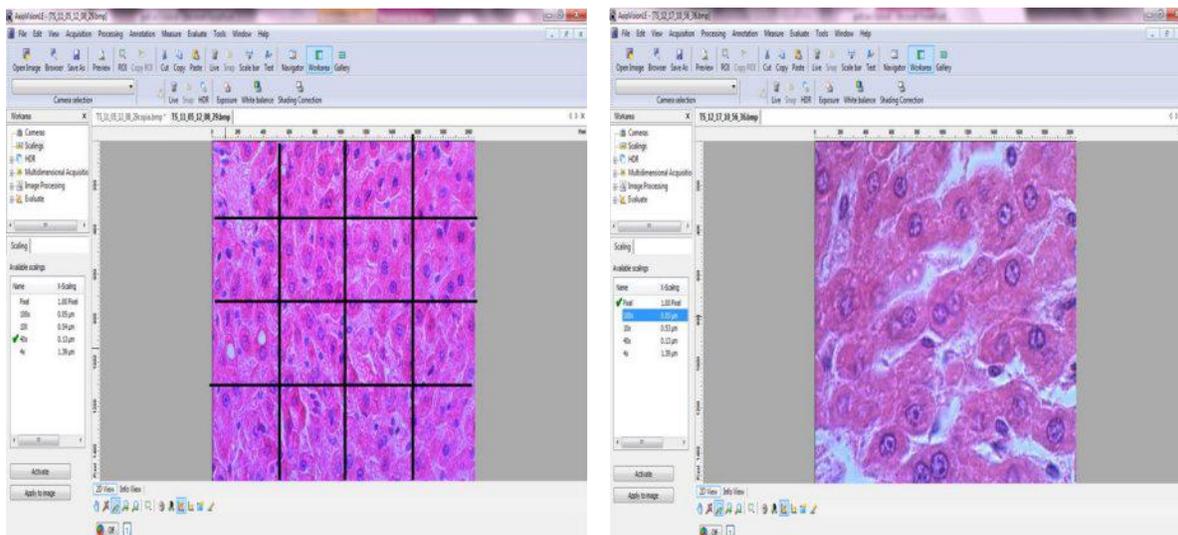
El análisis de corticosterona sanguínea se realizó por el método de ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) por medio de kits disponibles comercialmente, Kit Enzyme Immunoassay, compañía Assay Desing No.900-097. Los estándares y las muestras se corrieron por duplicado.

## **6.8 Análisis histológico del hígado**

A partir de una porción del lóbulo menor del hígado (Figura 6), los tejidos se procesaron con Bouin durante 24 h. Posteriormente, el tejido fue deshidratado con alcohol etílico en concentraciones ascendentes desde 60, 80, 96 y 100%, aclarado en xileno y fue incluido en paraplast X-tra. La otra porción del lóbulo menor fue sumergida en sacarosa al 30% como medio de crio-protección. Se obtuvieron cortes histológicos longitudinales de 7 y 15  $\mu\text{m}$  de espesor con un micrótopo y un criostato, respectivamente. Los cortes de cada animal se colocaron en portaobjetos independientes, cuatro cortes por laminilla. Una laminilla fue teñida con hematoxilina-eosina (tiñe citoplasma y núcleo). Posteriormente se tomaron fotografías con una cámara OLYMPUS de 5.1 mega píxeles montada en un microscopio óptico Zeiss Imager A.1 (400 y 1000 aumentos totales). El análisis del área/ densidad nuclear y células binucleadas (40x) se realizó en una cuadrícula de 4x4 midiendo las células que estaban dentro de los cuatro cuadros centrales tomando de referencia la vena central, mientras que el área nuclear (100x) se midió por campo (Figura 7) utilizando un analizador de Imágenes AxioVision REL 4.6 (Zeiss Inc 2007). Para evaluar la presencia de lípidos y el grado de inflamación en el hígado, se utilizó una escala numérica de 0-3 donde el grado 0, indica que el tejido no tiene lípidos o inflamación; en el nivel 1, las áreas dañadas son escasas; para el grado 2, la presencia de lípidos e inflamación es moderada y finalmente en el grado 3 de inflamación la presencia de lípidos fue abundante (Romero-Sarmiento y cols. 2012). Adicional a ello, la actividad de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAS) fue determinada a través del grado de esteatosis, hepatocitos balonizados e inflamación lobular (Brunt 2007, Tiniakos y cols. 2010; Jácome-Sosa y cols. 2014). La segunda laminilla fue teñida con rojo oleoso para determinar el contenido de grasa en la célula hepática. Adicionalmente, se realizó la tinción de tricrómica de Masson para evidenciar la presencia de fibrosis.



**Figura 6.** Obtención de cortes de hígado para análisis estadístico.



**Figura 7.** Medición del área / número de núcleos de hepatocitos y área nuclear

### 6.9 Número de células inmunes dentro de los sinusoides

La presencia de células inmunes fue evaluada en cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina (H-E). Se cuantificó la presencia de células inmunes, y de manera particular de neutrófilos dentro de los sinusoides. El análisis se llevó a cabo en 10 campos a 100x cercanos a la vena central hepática. Agregado a ello, una nueva serie de portaobjetos fueron teñidos con la

técnica de azul Alcian pH 2.5 para evidenciar la presencia de mastocitos alrededor de la vena central.

### **6.10 Tinción rojo oleoso**

Los cortes obtenidos del criostato se enjuagaron con alcohol isopropílico al 60%, posteriormente se agregó el tinte de rojo oleoso por 45 minutos. Enseguida se lavaron con agua destilada y se procedió hacer la contratinción con solución de Mayer's por 5 minutos. Finalmente se procedió a lavar con agua destilada y montar con glicerina.

### **6.11 Medición del contenido de grasa y triglicéridos hepáticos**

Los triglicéridos hepáticos fueron medidos por el método de Folch con algunas modificaciones. Las muestras de tejido hepático congelado (aproximadamente 0.5 g cada uno) del lóbulo medio se homogenizaron en 5.4 ml de cloroformo/metanol (2: 1; v / v; JT Baker, México) y se agitaron en vórtex. Las fases orgánica e inorgánica fueron separados por la adición de 1.8 ml de NaCl al 0.7% (JT Baker, México). Las muestras se centrifugaron a 1200 RPM durante 15 min a 4°C. La fase orgánica se transfirió a un nuevo tubo, se evaporó y peso. Las muestras fueron resuspendidas en isopropanol + Tritón X-100 al 10%. La cantidad de triglicéridos hepáticos se midió usando un kit comercial (Elitech Clinical Systems, México). El contenido de grasa hepática fue reportado como g/g peso húmedo del hígado, y los niveles de triglicéridos hepáticos fueron definidos como mg triglicéridos / g de tejido hepático.

### **6.12 Contenido de glucógeno hepático**

El contenido de glucógeno hepático se determinó en los grupos de dos y tres meses, a través del método de hidrólisis ácida (Passonneau y Laurderdale 1974, Zhang 2012) con ligeras modificaciones. Para cada muestra, se prepararon 200µL de HCl 2 M (J. T. Baker, México) en un tubo Eppendorf de 1,5 ml como control para medir la glucosa libre, el HCl 2 M se sustituyó con NaOH 2 M (J. T. Baker, México). Previamente los tubos se calentaron en agua hirviendo durante 5 min, y se centrifugaron brevemente. Posteriormente, las muestras congeladas de hígado (0,1 g cada una, aproximadamente) se colocaron en hielo seco y se transfirieron a los tubos con HCl o NaOH y se homogenizaron. Los tubos fueron sellados herméticamente y se

pusieron a hervir las muestras en agua durante 1 h, agitando vigorosamente los tubos cada 10 minutos durante todo el proceso. Finalmente, se centrifugaron a 10,000 xg durante 5 min. El sobrenadante del producto de hidrólisis se analizó usando un kit comercial (Stanbio Glucosa liquicolor, México). El contenido de glucógeno en hígado fue calculado como mmoles de unidades glucosiladas / kg de peso de hígado húmedo.

### **6.13 Inmunohistoquímica de 3-Nitrotirosina para la determinación de daño oxidativo**

Para la aplicación de esta técnica se utilizaron cortes histológicos incluidos en paraplast X-tra de animales de un mes, los cuales fueron hidratados a través del proceso inverso al de deshidratación. A continuación, se prosiguió al destape de antígenos con una solución de citrato de sodio 10 mM (pH 6.0) por tres días. Las peroxidasas endógenas fueron bloqueadas con peróxido de hidrógeno (3%) durante 30 minutos. Posteriormente se lavaron con buffer de fosfatos salino (PBS 100 mM). Las uniones inespecíficas fueron bloqueadas con suero de cabra al 5 % por 1 hr. La aplicación del anticuerpo primario purificado de ratón monoclonal anti-nitrotirosina (chemicon millipore, # de catálogo MAB5404), a una dilución 1:200, a 4°C durante la noche. Posteriormente, se eliminó el exceso del anticuerpo primario con PBS-Tritón. Se incubó con el anticuerpo secundario del kit (starr trek universal HRP detection) durante 20 min a 4°C. Se lavó con PBS-Tritón (0.3%) para después incubar con avidina y posteriormente revelar con Diaminobencidina (DAB, 1:20). Se contrastó con hematoxilina de Mayer's y después se deshidrataron los tejidos y se montaron con entellan. Los cortes de tejido fueron observados en un microscopio óptico y se tomaron fotografías de las áreas marcadas para 3-NTyr (color marrón).

### **6.14 Determinación de peroxidación de lípidos**

La peroxidación de lípidos se determinó utilizando el ensayo descrito por Luna-Moreno y cols. (2007), en los animales de dos y tres meses, con el fin de identificar la vía que estaría siendo afectada por el proceso de estrés oxidativo. La lipoperoxidación se determinó mediante dos técnicas independientes: TBARS para cuantificación de dialdehído malónico (MDA) y la de dienos conjugados (DC). La cuantificación de MDA se realizó con la técnica del ácido tiobarbitúrico, por espectrofotometría. Se homogenizó 0.5 gramos de hígado en 2500µl de

buffer 10 mM-2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (Tris) – HCl (pH 7.4; 1:10; p/v). Posteriormente, se utilizó 1mg de proteína de cada muestra y se incuban en 1 ml de Tris 0.5 M, pH: 7.4 durante 30 min a 37° C en baño María. Después se adicionó 1.5 ml de ácido acético al 20% (ajustada a pH 2.5 con KOH), 1.5 ml de ácido tiobarbitúrico al 0.8 % y 0.5 ml de agua desionizada. Las muestras se hirvieron durante 45 minutos y luego se añadió 1 ml de KCl al 1.2 % a cada muestra. El complejo coloreado que se formó se extrajo con una solución de piridina-butanol (1:15, v/v) y se cuantificó a 532 nm. El MDA fue utilizado como estándar (coeficiente de extinción:  $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ). La peroxidación de los lípidos *in vivo* se determinó midiendo la absorción UV a 233 nm de dienos conjugados en los extractos de lípidos (cloroformo-metanol 2:1, v/v) resuspendidos en ciclohexano en todas las muestras.

### **6.15 Determinación del contenido de carbonilos**

La presencia de grupos carbonilo de las proteínas se identificaron por espectrofotometría (Levine et al. 1990) en los grupos de 2 y 3 meses, como resultados complementarios de la lipoperoxidación. Brevemente, 1 mg de proteína (usando el método de Lowry) se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se añadió ácido tricloroacético 0,5 ml de 20% para precipitar. Posteriormente se añadieron 0,5 ml de 10 mM de 2,4-dinitrofenilhidrazina en HCl 2M. La mezcla se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y se agito cada 10 min durante todo el proceso. Posteriormente, se añadieron 0,5 ml de ácido tricloroacético al 20% y se centrifugó a 11.000 xg durante 3 min, y se tiro el sobrenadante. Los pellets se lavaron 3 veces con 1 ml de etanol-acetato de etilo (1: 1 v / v) para eliminar el reactivo libre, dejando que la muestra reposar 10 min (entre cada centrifugación se tiro el sobrenadante). El precipitado de la proteína se resuspendió en 0,6 ml de solución de guanidina 6 M con 20 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 2,3 ajustado con ácido trifluoroacético), y se incubó a 37 ° C durante 15 min. Se elimino cualquier residuo insoluble por centrifugación a 11.000 xg durante 3 min. El producto se analizó en un espectrofotómetro (Novaspec II) a 360 nm utilizando el coeficiente de extinción molar como 22, 000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. El contenido de proteína carbonilo se calculó a través de la densidad óptica entre 0.022 y se expresó como nmoles / mg de proteína.

### **6.16 Actividad de la 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (11 $\beta$ -HSD1)**

La actividad enzimática se determinó utilizando el ensayo descrito por Luna-Moreno y cols. (2012). Se transfirió proteína microsomal (30 mg) a tubos de vidrio, que contienen 700  $\mu$ l de PBS. Los espacios en blanco contenían 100  $\mu$ l de solución de albúmina de suero bovino (1 mg/ml preparada en PBS). Cada conjunto triplicado de tubos se pre-incubaron durante 30 minutos a 37°C en baño de agua. Para iniciar el ensayo, cada tubo recibió 4 mM de NADPH (Sigma) y 100  $\mu$ l de PBS que contienen 3700 Bq (0.1 mCi) [1,2-3 H] cortisona (Perkin Elmer) y cortisona no marcada (Sigma), cada uno a una concentración de esteroides final de 100 nM. Los tubos fueron devueltos al baño de agua durante 60 min, y las reacciones se terminaron mediante la adición de 2 ml de cloroformo enfriado con hielo (JT Baker) a cada tubo. Para dividir las fases orgánicas y acuosas, estos tubos se centrifugaron a 1000 g durante 30 min. Después de aspirar la fracción sobrenadante acuoso, los extractos orgánicos se evaporaron durante la noche a temperatura ambiente. Los residuos de esteroides se resuspendieron en 20 ml de acetato de etilo que contenía 1 mM-corticosterona o cortisona (Sigma) y se resolvieron por TLC, usando placas de TLC de sílice 60 (Merck) en una atmósfera de 92:8 (v/v) de cloroformo-95% (v/v) de etanol (Merck). Los puntos correspondientes a la corticosterona se desprendieron y el [3H] corticosterona se cuantificó usando un TLC scanner radiocromatograma Bioscan 200 (LabLogic). La concentración de proteína se midió utilizando el método de Bradford.

### **6.17 Análisis estadístico**

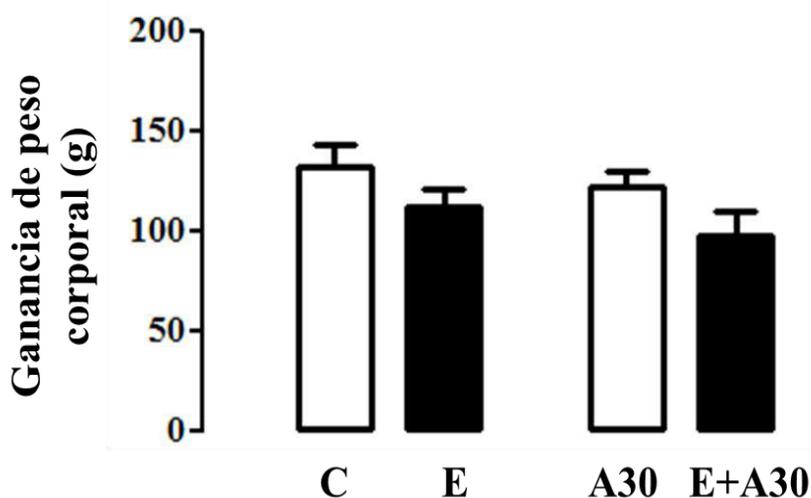
Los valores obtenidos se analizaron en una base de datos por medio del programa GB-STAT 6.0 a través de una ANOVA de dos vías y Newman Keuls como prueba post-hoc. El análisis de la evaluación histológica se realizó a través de una prueba de Chi-cuadrada y Fisher. En todos los casos fue aceptada una  $p \leq 0.05$  como diferencias significativas.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 PRIMER MES

#### 7.1.1 Ganancia de peso corporal

La ganancia de peso corporal no fue afectado por la dieta alta en sacarosa (ANOVA de dos vías,  $F_{(1,1,31)}=1.30, p=0.26$ ); el estrés crónico ( $F_{(1,1,31)}=4.64, p>0.05$ ) ni por la interacción ( $F_{(1,1,31)}=0.12, p=0.73$ ; Figura 8).

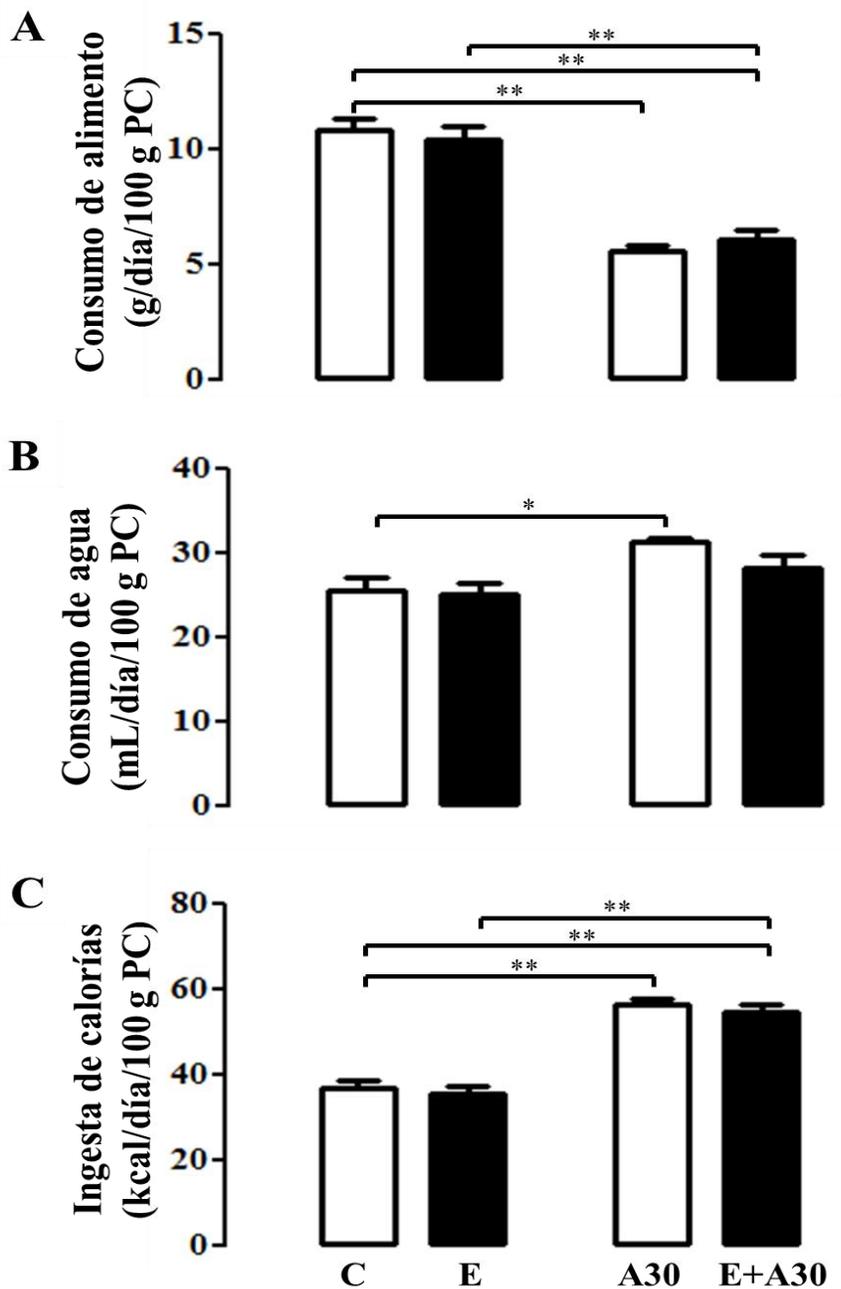


**Figura 8. Ganancia de peso corporal.** Se muestra la media  $\pm$ e.e. No se encontraron diferencias significativas. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc. n=8 animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico + sacarosa al 30%.

#### 7.1.2 Consumo de alimento, agua y kilocalorías

Los grupos A30 y E+A30 consumieron menor cantidad de alimento que los grupos C y E por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)}=107.1, p<0.01$ ), sin efecto por el estrés crónico ( $F_{(1,1,31)}=0.07, p=0.80$ ) y la interacción de ambos factores ( $F_{(1,1,31)}=0.67, p=0.42$ ; Figura 9-A). De la misma manera, el consumo de agua fue afectado por el consumo de sacarosa, mostrando un mayor consumo en los animales del grupo A30 respecto al grupo C. Mientras que, el consumo de agua fue similar en los grupos E y E+A30 (dieta alta en sacarosa,  $F_{(1,1,31)}=11.47, p<0.05$ ; estrés crónico,  $F_{(1,1,31)}=1.83, p=0.19$ ; interacción,  $F_{(1,1,31)}=0.94, p=0.34$ ; Figura 9-B). En consecuencia la ingesta calórica total fue mayor en los grupos A30 y E+A30 por la dieta alta en sacarosa

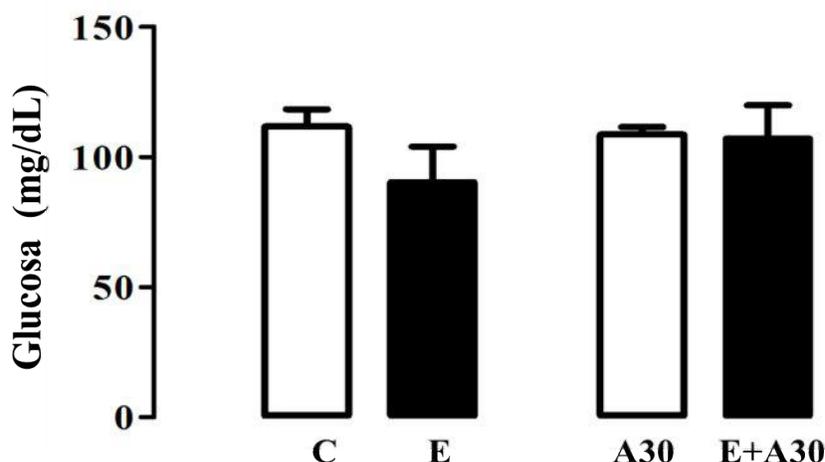
( $F_{(1,1,31)}=120.26, p<0.01$ ); sin efecto del estrés crónico ( $F_{(1,1,31)}=1.11, p=0.30$ ) ni la interacción de ambos factores ( $F_{(1,1,31)}=0.05, p=0.83$ ; Figura 9-C).



**Figura 9. Consumo de alimento, agua y kilocalorías.** Se muestra la media  $\pm$ e.e. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ . El consumo de sacarosa afecta el consumo de alimento, agua y calorías. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc.  $n=8$  animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico + sacarosa al 30%.

### 7.1.3 Niveles de glucosa sérica

Los niveles de glucosa en sangre no fueron afectados por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,27)}=0.47$ ,  $p=0.50$ ), el estrés crónico ( $F_{(1,1,27)}=1.30$ ,  $p=0.27$ ), ni la interacción de ambos factores ( $F_{(1,1,27)}=0.97$ ,  $p=0.33$ ; Figura 10).



**Figura 10. Niveles de glucosa sérica.** Se muestra la media  $\pm$ e.e. No se encontraron diferencias significativas. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc. n=7 animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico+ sacarosa al 30%.

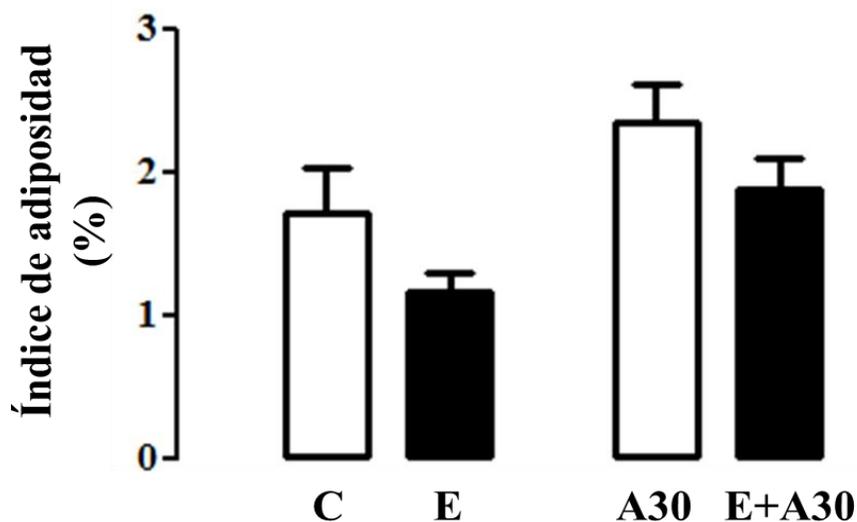
### 7.1.4 Índice de adiposidad

En la Tabla 2 se muestra el peso del tejido adiposo pericardio, abdominal, perirrenal y gonadal por cada 100 g de peso corporal. Podemos observar que la cantidad de tejido adiposo abdominal y perirrenal se ve afectado por la dieta alta en sacarosa.

Tejido adiposo (mg/ 100 g PC)	C	E	A30	E+A30
Pericardio	193.7 $\pm$ 27.68	247.4 $\pm$ 37.67	240.1 $\pm$ 21.16	266.3 $\pm$ 30.73
Abdominal	522.3 $\pm$ 140.9 <sup>ab</sup>	288.3 $\pm$ 42.06 <sup>a</sup>	857.1 $\pm$ 204.6 <sup>b</sup>	766.7 $\pm$ 112.6 <sup>b</sup>
Perirrenal	128.4 $\pm$ 28.43 <sup>a</sup>	175.6 $\pm$ 30.12 <sup>ab</sup>	321.7 $\pm$ 60.69 <sup>b</sup>	274.4 $\pm$ 43.29 <sup>ab</sup>
Gonadal	873.6 $\pm$ 200.9	457.5 $\pm$ 64.81	922.4 $\pm$ 170.5	569 $\pm$ 91.92

**Tabla 2. Peso de tejido adiposo.** Los datos son expresados como la media $\pm$ e.e en miligramos (mg) por cada 100 g de peso corporal. Letras diferentes  $p<0.05$ . El contenido de tejido adiposo es afectado por el consumo de sacarosa. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post hoc. n=6-8 animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico + sacarosa al 30%.

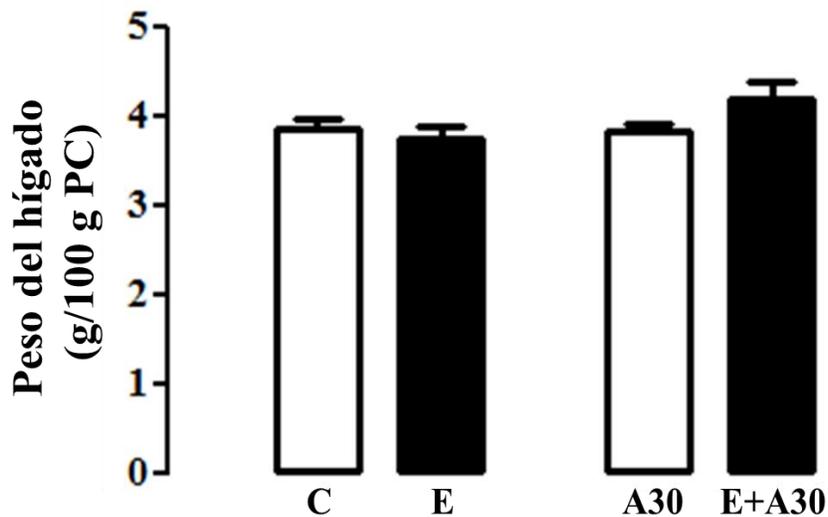
Sin embargo, el índice de adiposidad no fue afectado por dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,25)}=7.29$ ,  $p>0.05$ ), el estrés crónico  $F_{(1,1,25)}=1.46$ ,  $p=0.24$ , o la interacción de los dos factores ( $F_{(1,1,25)}=0.08$ ,  $p=0.78$ ; Figura 11).



**Figura 11. Índice de adiposidad.** Se muestra la media  $\pm$ e.e. No se encontraron diferencias significativas. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc. n=6-8 animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico+ sacarosa al 30%.

### 7.1.5 Peso del hígado

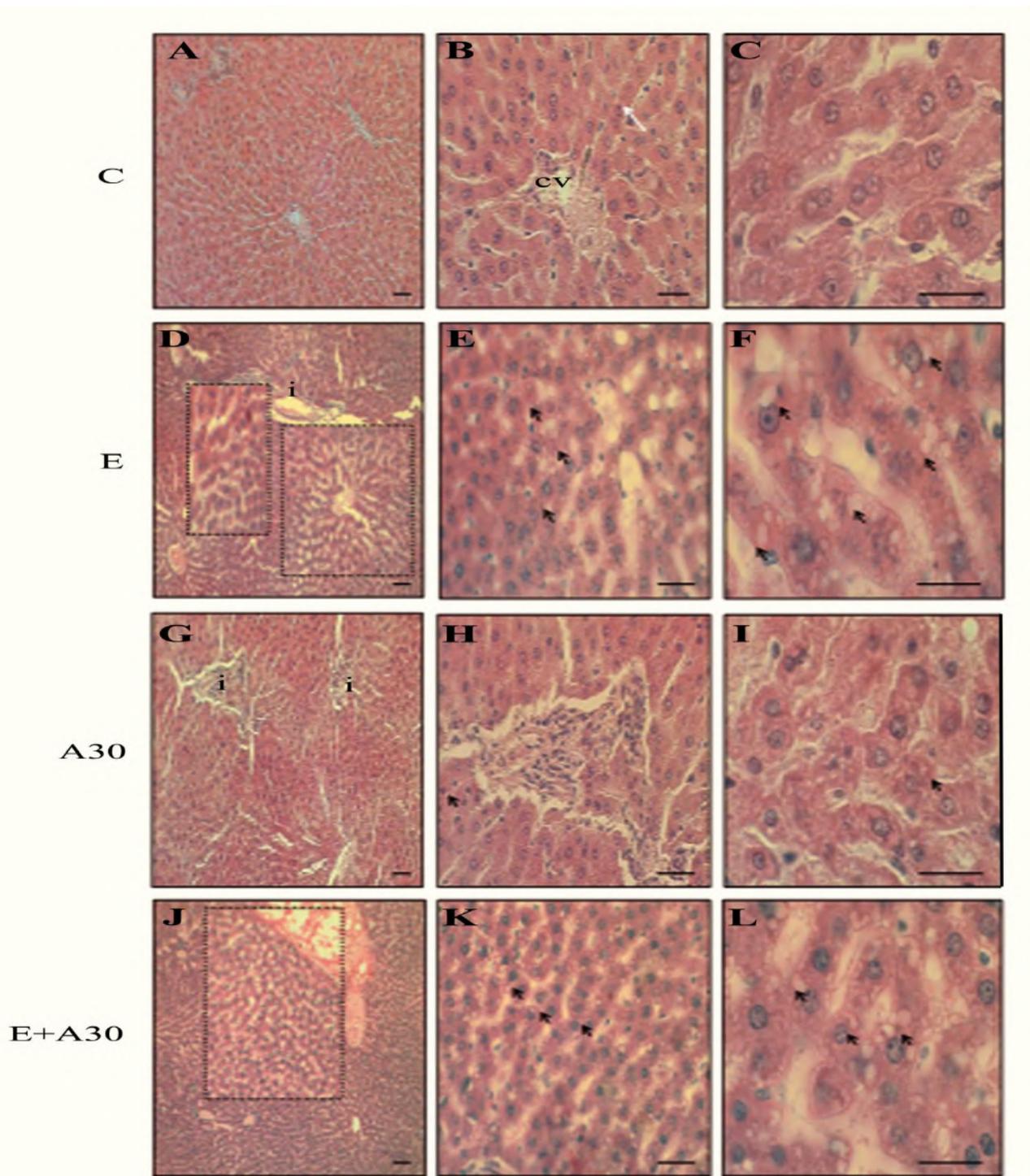
El peso del hígado no fue afectado por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)}=0.13$ ,  $p=0.72$ ), el estrés crónico ( $F_{(1,1,31)}=0.13$ ,  $p=0.72$ ), o la interacción ( $F_{(1,1,31)}=1.15$ ,  $p=0.29$ ; Figura 12).



**Figura 12. Peso del hígado.** Se muestra la media  $\pm$ e.e por cada 100g de peso corporal. No se encontraron diferencias significativas entre grupos. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc. n=8 animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico + agua azucarada al 30%.

#### 7.1.6 Análisis histológico del hígado

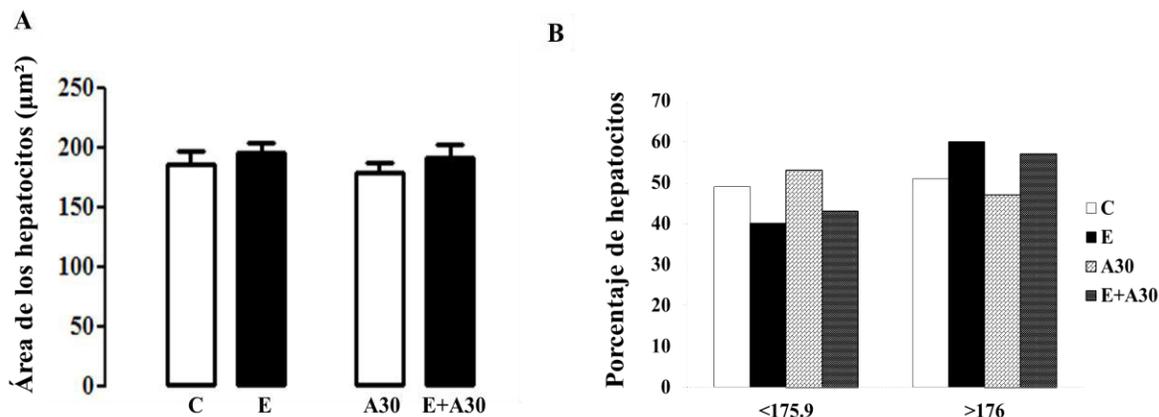
En las fotomicrografías de los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina se observa en las ratas **C** la presencia de un parénquima conservado con núcleos y citoplasma bien definidos conservando la forma y orientación de los cordones hepáticos (Figura 13 A-C). Mientras que, en los animales **E** se observan zonas con presencia de macro y micro vesículas de grasa (esteatosis), hepatocitos en forma de balón y evidencia de un proceso inflamatorio debido a la proliferación de células granulosas (Figura 13 D-F). Por otra parte, en las ratas **A30** se observa además de un proceso inflamatorio la presencia de un número pequeño de micro vesículas de grasa alrededor del núcleo en algunos hepatocitos (Figura 13 G-I). Mientras que, en los animales **E+A30** observamos que las zonas con acumulación de grasa son menores (Figura 13 J-L).



**Figura 13. Fotomicrografías histológicas del hígado.** El grupo control consumo agua simple (C, A-C), agua simple + estrés crónico (E, D-F), sacarosa al 30% (A30, G-I), estrés crónico + sacarosa al 30% (E+A30, J-L) Teñidas con hematoxilina- eosina. Se muestra la vena central (VC), cordones hepáticos (*flecha blanca*); micro y macro vesículas de grasa (*flecha negra*) y proceso inflamatorio (I). Barras 50  $\mu\text{m}$  (A,D,G,J), 10  $\mu\text{m}$  (B,E,H,K) y 20 $\mu\text{m}$  (C,F,I,L).

### 7.1.7 Área de los hepatocitos

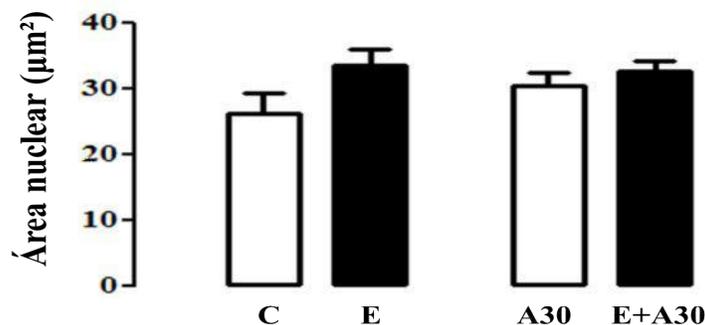
El área de los hepatocitos no fue afectada por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)}=0.35, p=0.56$ ), el estrés crónico ( $F_{(1,1,31)}=1.34, p=0.27$ ) o la interacción de ambos factores ( $F_{(1,1,31)}=0.03, p=0.87$ ; Figura 14-A). Similar resultado fue encontrado en el porcentaje de hepatocitos (Figura 14-B).



**Figura 14. Tamaño de los hepatocitos.** Área del citoplasma (A), se muestra la media  $\pm$ e.e. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc. Porcentaje de hepatocitos por rango de área (B), Chi-cuadrada. No se encontraron diferencias significativas. n=8 animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico + sacarosa al 30%.

### 7.1.8 Área nuclear

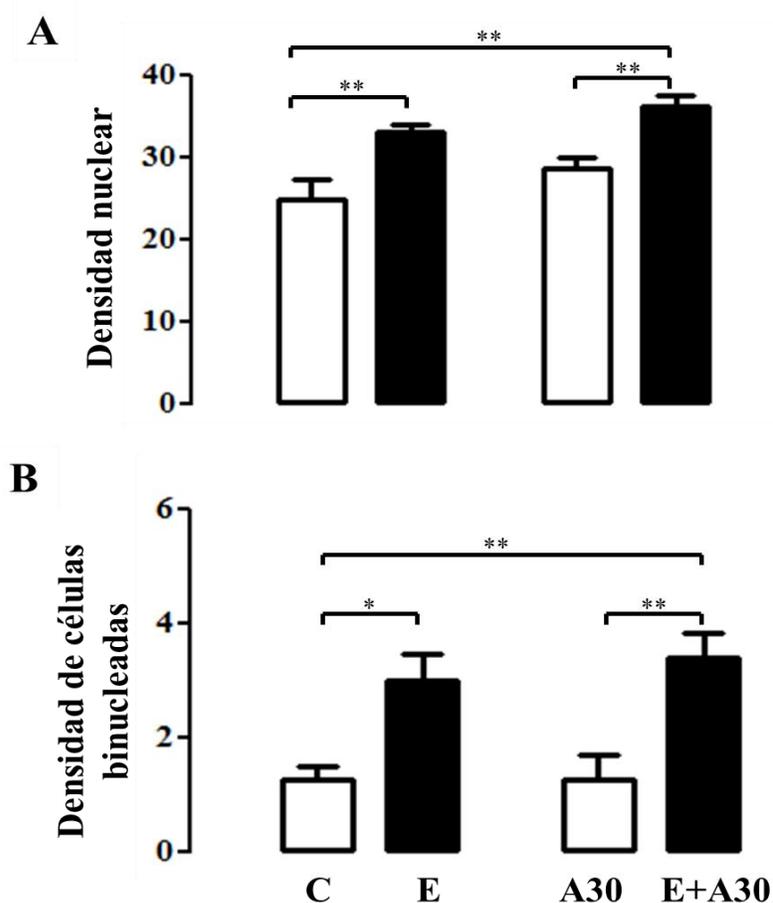
El área nuclear no fue afectada por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)}=0.42, p=0.52$ ), el estrés crónico ( $F_{(1,1,31)}=4.44, p>0.05$ ), o la interacción de ambos factores ( $F_{(1,1,31)}=1.41, p=0.24$ ; Figura 15).



**Figura 15. Área de los núcleos.** Se muestra la media  $\pm$ e.e. No se encontraron diferencias significativas. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc. n=8 animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple+estrés; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés+sacarosa al 30%.

### 7.1.9 Densidad nuclear

La densidad nuclear no fue afectada por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)}=4.34, p>0.05$ ). Sin embargo; el estrés crónico aumenta la densidad nuclear ( $F_{(1,1,31)}=23.64, p<0.01$ ), mientras la interacción de los dos factores no afecta ( $F_{(1,1,31)}=0.02, p=0.88$ ; Figura 16-A). De manera similar, la densidad de células binucleadas no fue afectada por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)}=0.20, p=0.66$ ). La densidad de células binucleadas aumenta por el estrés ( $F_{(1,1,31)}=21.63, p<0.01$ ) en los grupos E y E+A30 respecto al grupo C. Sin interacción entre ambos factores ( $F_{(1,1,31)}=0.20, p=0.66$ ; Figura 16-B).



**Figura 16. Densidad de núcleos.** Densidad nuclear (A) y densidad de células binucleadas (B). Se muestra la media  $\pm$ e.e. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ . Se encontraron diferencias significativas por el estrés. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc.  $n=8$  animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple +estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico + sacarosa al 30%.

La tabla 3 muestra el análisis semi-cuantitativo realizado en el tejido hepático donde se puede observar el grado de actividad del hígado graso no alcohólico (NAS) por la presencia de grasa en los hepatocitos, inflamación y hepatocitos balonizados inducidos por la dieta, el estrés y la interacción entre los dos factores. El grupo E muestra un grado 3 de esteatosis asociado con un grado 3 de inflamación y grado 2 de hepatocitos balonizados, mientras la dieta revierte el efecto del estrés en el grupo E+A30 donde podemos observar un grado 1 de esteatosis asociado a grado 1 de inflamación y grado 2 de hepatocitos balonizados. El grupo A30 solo presenta grado 2 de inflamación y grado 2 de hepatocitos balonizados.

Grupo	C		E		A30		E+A30	
	Grado	No. casos	Grado	No. casos	Grado	No. casos	Grado	No. casos
<b>Esteatosis</b>	0	(8/8)	3 <sup>#</sup>	(5/8)	0	(8/8)	1 <sup>&amp;</sup>	(4/8)
<b>Inflamación</b>	0	(8/8)	3 <sup>#</sup>	(8/8)	2 <sup>#</sup>	(8/8)	1 <sup>&amp;\$</sup>	(3/8)
<b>Hepatocitos balonizados</b>	0	(8/8)	2 <sup>#</sup>	(3/8)	2 <sup>#</sup>	(3/8)	2	(4/8)
<b>NAS</b>	0		8		4		4	

**Tabla 3.** Evaluación histológica de la actividad del hígado graso no alcohólico (NAS), esteatosis, inflamación y hepatocitos balonizados C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico + sacarosa al 30%.

<sup>#</sup>p<0.0001 vs group C.

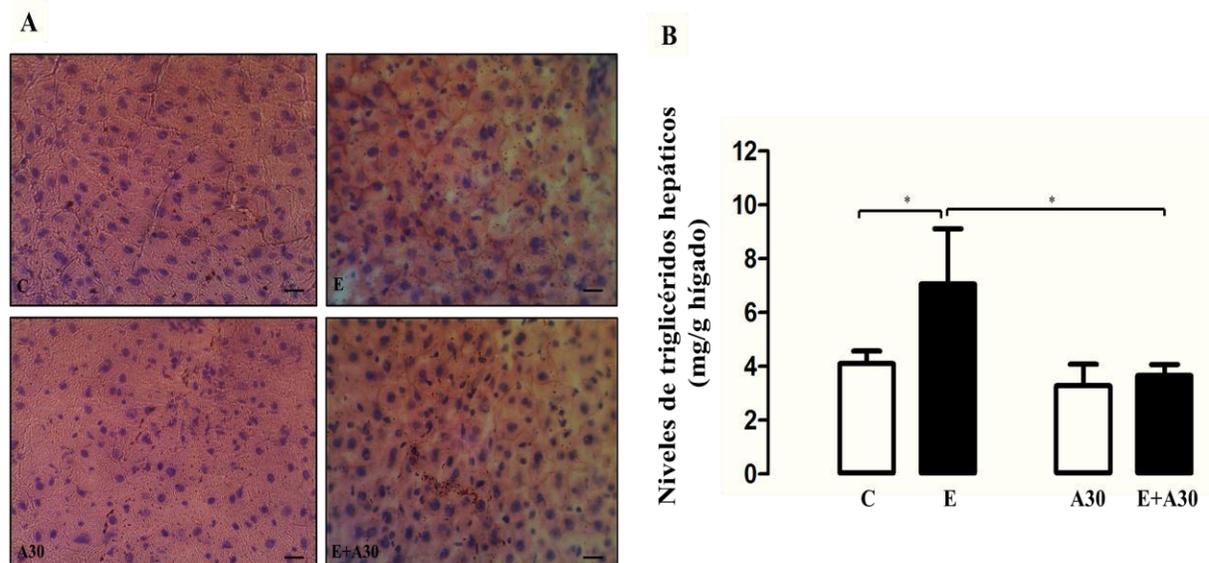
<sup>\$</sup>p<0.0001 vs group St.

<sup>&</sup>p<0.0001 vs group S30.

### 7.1.10 Acumulación de triglicéridos hepáticos

En las fotomicrografías de los cortes histológicos teñidos con rojo oleoso se observa la presencia de lípidos dentro de los hepatocitos en los animales E, A30 y E+A30 (Figura 17-A). Adicionalmente el análisis de los niveles de triglicéridos en hígado mostraron una que cantidad de triglicéridos dentro de los hepatocitos no es afectado por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,26)}=6.51$ ,  $p<0.05$ ). Sin embargo, los niveles de triglicéridos hepáticos aumentados en el grupo E

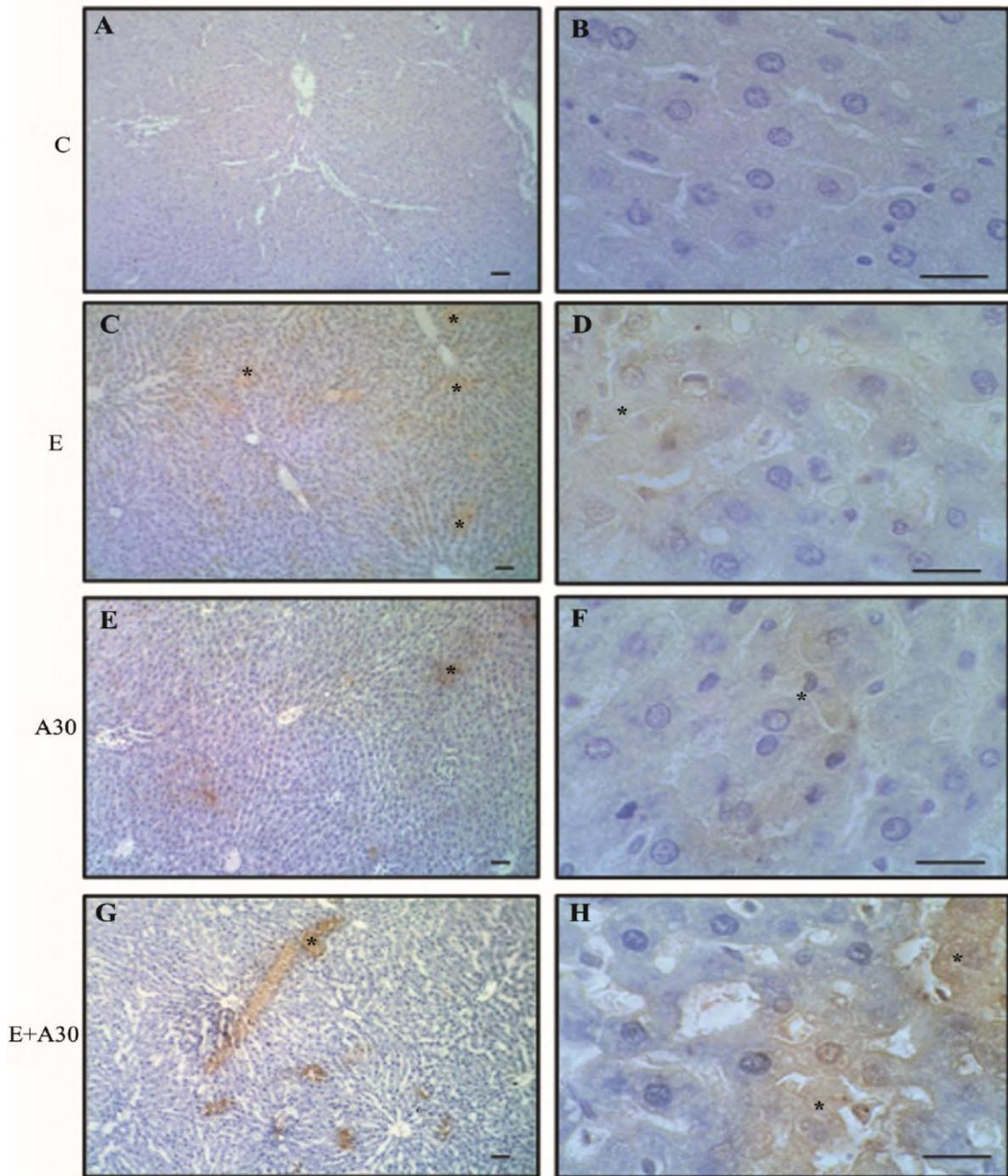
( $F_{(1,1,26)}=2.82, p>0.05$ ) en comparación con los grupos C y E+A30; observándose una clara disminución debido a la interacción de ambos factores ( $F_{(1,1,26)}=4.38, p<0.05$ ; Figura 17-B).



**Figura 17. Acumulación de grasa hepática.** Presencia de vesículas de grasa en hígado (A). El color rojo indica la presencia de grasa dentro de los hepatocitos. Teñidas con rojo oleoso. Barra=10 $\mu$ m. Niveles de triglicéridos hepáticos (B). Se muestra la media  $\pm$ e.e. \* $p<0.05$ . El estrés aumento los niveles de triglicéridos hepáticos. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc. n=5-8 animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico + sacarosa al 30%.

### 7.1.11 Daño oxidativo hepático

En las fotomicrografías de los cortes histológicos de hígado, podemos observar que la 3-NTyr estuvo ausente en el grupo C (Figura 18A, B). En el grupo E, una intensa tinción citoplasmática de 3NTyr fue observada comparado con el grupo C (Figura 18-C, D). En el grupo A30 podemos observar menor intensidad de la 3-NTyr en comparación con el grupo E (Figura 18-E, F). Mientras que, en el grupo E+A30 se observa un alto marcaje de 3-NTyr en comparación con los grupos E y A30 (Figura 18-G, H).

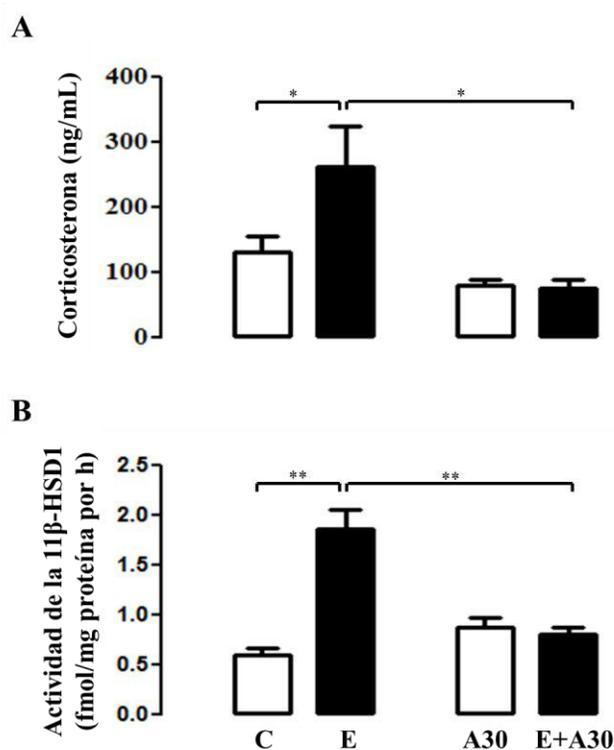


**Figura 18. Inmunohistoquímica contra 3-NTyr.** El grupo control consumió agua simple (C, A-B); agua simple + estrés crónico (E, C-D), sacarosa al 30% (A30, E-F), estrés crónico + sacarosa al 30% (E+A30, G-H) El color marrón indica la presencia de estrés oxidativo. Barras 50  $\mu$ m (A,D,G,J), 10  $\mu$ m (B,E,H,K) y 20 $\mu$ m (C,F,I,L).

### 7.1.12 Corticosterona y 11 $\beta$ -HSD1

El grupo E tuvo un incremento de los niveles de corticosterona en suero comparado con el grupo C. Mientras que, los grupos C y A30 tuvieron una concentración similar. Sin embargo, la interacción entre el estrés crónico y la dieta (E+A30) disminuye los niveles de corticosterona en suero comparado con el grupo E (dieta alta en sacarosa,  $F_{(1,1,23)}=11.39, p<0.05$ ; estrés crónico,  $F_{(1,1,23)}=3.09, p>0.05$ ; interacción,  $F_{(1,1,23)}=3.54, p<0.05$ ) (Figura 19-A).

Por otro parte, el estrés crónico promovió el incremento de la actividad de 11 $\beta$ -HSD-1 hepática comparado con el grupo C. Mientras que, la actividad de la 11 $\beta$ -HSD-1 fue similar entre los grupos C y A30. Remarcablemente, la interacción entre la dieta y el estrés crónico (grupo E+A30) disminuyeron la actividad de la 11 $\beta$ -HSD1 (dieta alta en sacarosa,  $F_{(1,1,28)}=8.71, p<0.01$ ; estrés crónico,  $F_{(1,1,28)}=15.83, p<0.01$ ; interacción,  $F_{(1,1,28)}=36.39, p<0.01$ ; Figura 19-B).

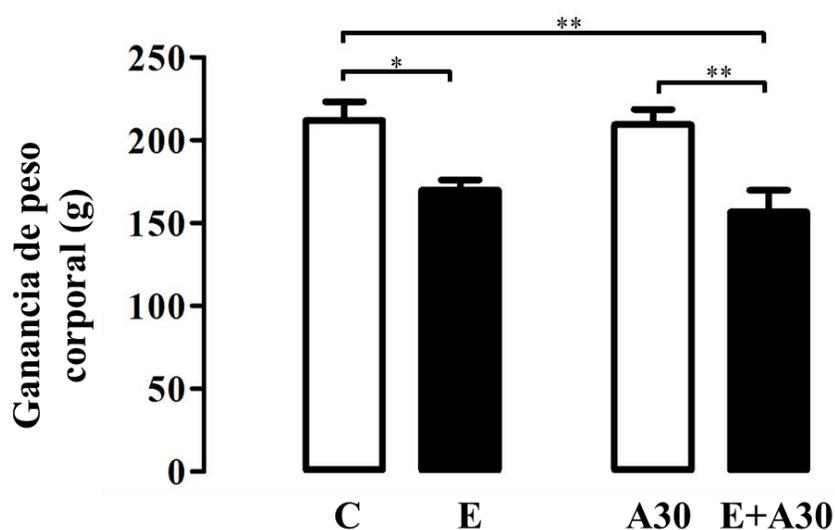


**Figura 19. Corticosterona y 11 $\beta$ -HSD1.** Se muestra la media  $\pm$ e.e. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ . Se encontraron diferencias significativas por el estrés y el consumo de sacarosa. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc. n=6-8 animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico + sacarosa al 30%.

## 7.2 SEGUNDO MES

### 7.2.1 Ganancia de peso corporal

La ganancia de peso corporal no fue afectado por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)}= 0.60$ ,  $p=0.45$ ). El estrés crónico ( $F_{(1,1,31)}= 21.35$ ,  $p<0.05$ ) disminuye la ganancia de peso corporal en el grupos E comparado con el grupo C. Sin embargo, en el grupo E+A30 fue mucho mayor la pérdida de peso corporal en comparación con los grupos C y A30 sin interacción entre los dos factores ( $F_{(1,1,31)}= 0.26$ ,  $p=0.61$ ; Figura 20).

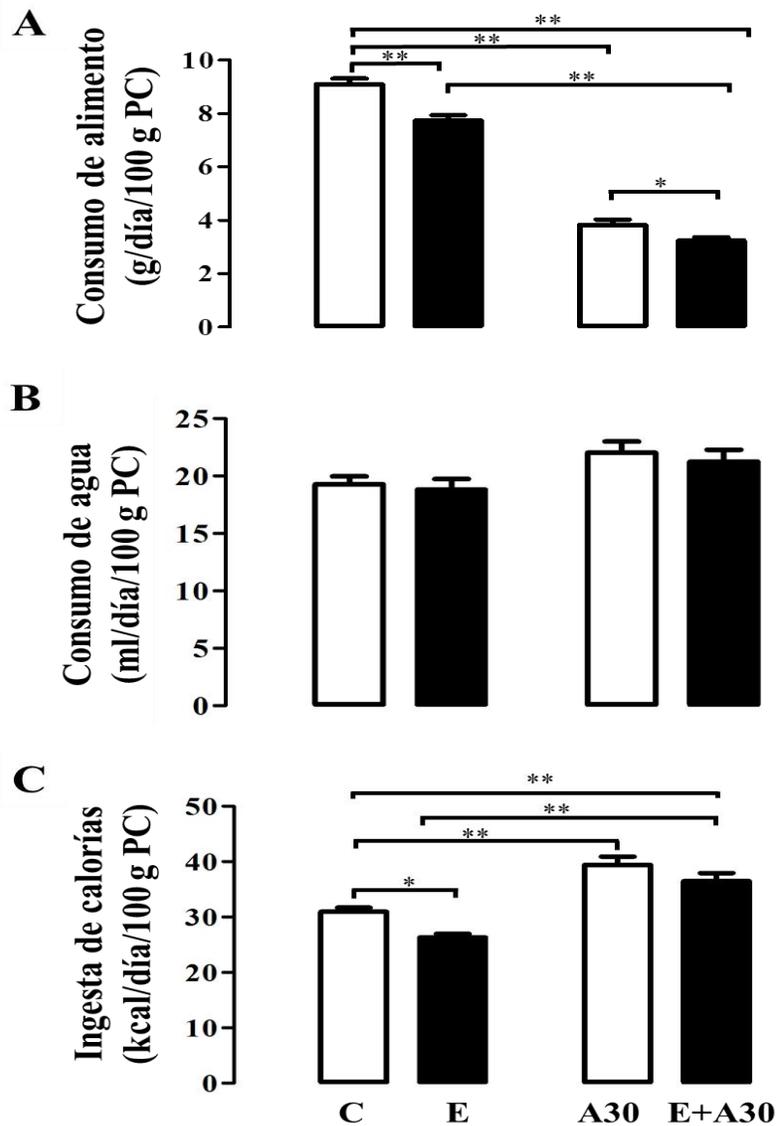


**Figura 20. Ganancia de peso corporal.** Se muestra la media  $\pm$ e.e. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ . Se encontraron diferencias significativas por el estrés. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc.  $n=8$  animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico + sacarosa al 30%.

### 7.2.2 Consumo de alimento, agua y kilocalorías

El consumo de alimento fue menor en los animales de los grupos de A30 y E + A30 en comparación con el grupo C por efecto de la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)}= 639.32$ ,  $p<0.01$ ). El estrés crónico también afecta el consumo de alimento ( $F_{(1,1,31)}= 25.57$ ,  $p<0.01$ ) comparado con el grupo C. De la misma manera la interacción entre ambos factores afecta el consumo de alimento en grupo E+A30 ( $F_{(1,1,31)}= 4.05$ ,  $p<0.05$ ; Figura 21-A). Por otro lado, el consumo del agua no fue afectado por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)}= 7.82$ ,  $p>0.05$ ), el estrés crónico ( $F_{(1,1,31)}= 0.46$ ,  $p=0.50$ ) ni por la interacción ( $F_{(1,1,31)}= 0.03$ ,  $p=0.86$ ; Figura 21-B). Sin embargo, el

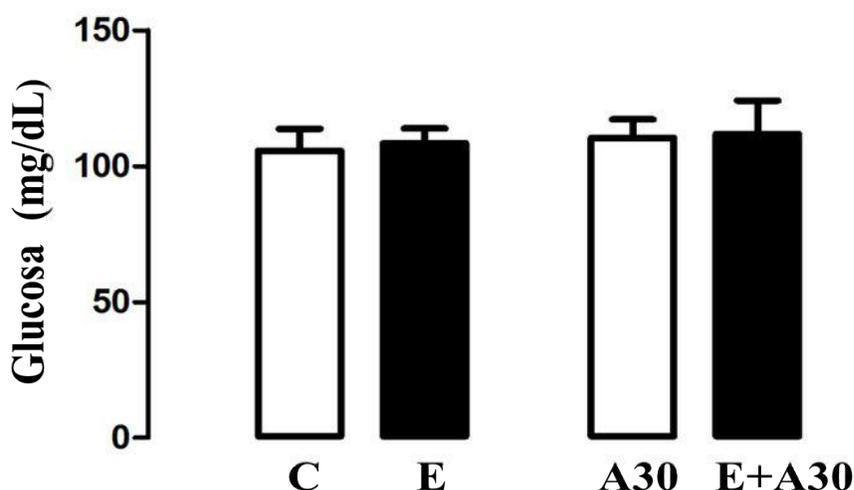
consumo de calorías fue afectado por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)}=64,79$ ,  $p<0.01$ ). De manera similar, el estrés crónico ( $F_{(1,1,31)}=10.78$ ,  $p<0.05$ ) disminuyó el consumo de calorías en el grupo E. Por el contrario, la dieta alta en sacarosa y el estrés crónico aumentan el consumo de calorías en el grupo E+A30 comparado con el grupo E. Sin interacción entre ambos factores ( $F_{(1,1,31)}=0.54$ ,  $p=0.47$ ; Figura 21-C).



**Figura 21. Consumo de alimento, agua y kilocalorías.** Se muestra la media  $\pm$ e.e. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ . El consumo de sacarosa y estrés afectan la ingesta de alimento y calorías. ANOVA de dos vías, Newman Keuls posthoc.  $n=8$  animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico + sacarosa al 30%.

### 7.2.3 Niveles de glucosa sérica

Los niveles de glucosa en sangre no fueron afectados por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)}=0.22$ ,  $p=0.64$ ), el estrés crónico, ( $F_{(1,1,31)}=0.58$ ,  $p=0.81$ ), ni la interacción de ambos factores ( $F_{(1,1,31)}=0.006$ ,  $p=0.94$ ; Figura 22).



**Figura 22. Niveles de glucosa sérica.** Se muestra la media  $\pm$ e.e. No se encontraron diferencias significativas. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc. n=8 animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico+ sacarosa al 30%.

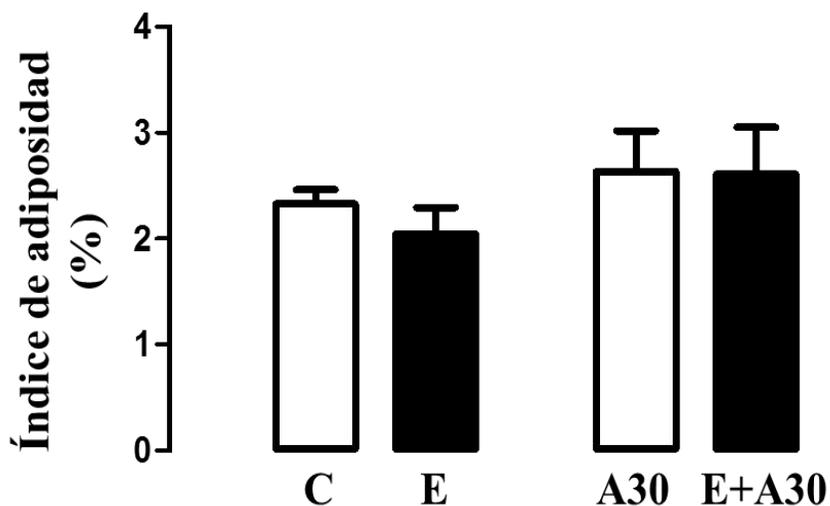
### 7.2.4 Índice de adiposidad

En la Tabla 4 se muestra el peso del tejido adiposo pericardio, abdominal, perirrenal y gonadal por cada 100 g de peso corporal. Podemos observar que la cantidad de tejido adiposo perirrenal aumenta debido al estrés crónico.

Tejido adiposo (mg/100 g PC)	C	E	A30	E+A30
Pericardio	158.9 $\pm$ 8.89	174 $\pm$ 25.98	178.1 $\pm$ 17.83	171.3 $\pm$ 15.05
Abdominal	976.9 $\pm$ 74.71	756.2 $\pm$ 99.96	1263 $\pm$ 252.2	1139 $\pm$ 221.3
Perirrenal	200.2 $\pm$ 23.75 <sup>a</sup>	410.7 $\pm$ 77.88 <sup>ab</sup>	284.8 $\pm$ 42.04 <sup>ab</sup>	550.6 $\pm$ 118.4 <sup>b</sup>
Gonadal	1061 $\pm$ 150.3	703.8 $\pm$ 94.74	1161 $\pm$ 177.4	748.9 $\pm$ 161.4

**Tabla 4. Peso de tejido adiposo.** Los datos son expresados como la media $\pm$ e.e en miligramos (mg) por cada 100 g de peso corporal. Letras diferentes  $p<0.05$ . El contenido de tejido adiposo es afectado por el estrés. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc. n=8 animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico + sacarosa al 30%.

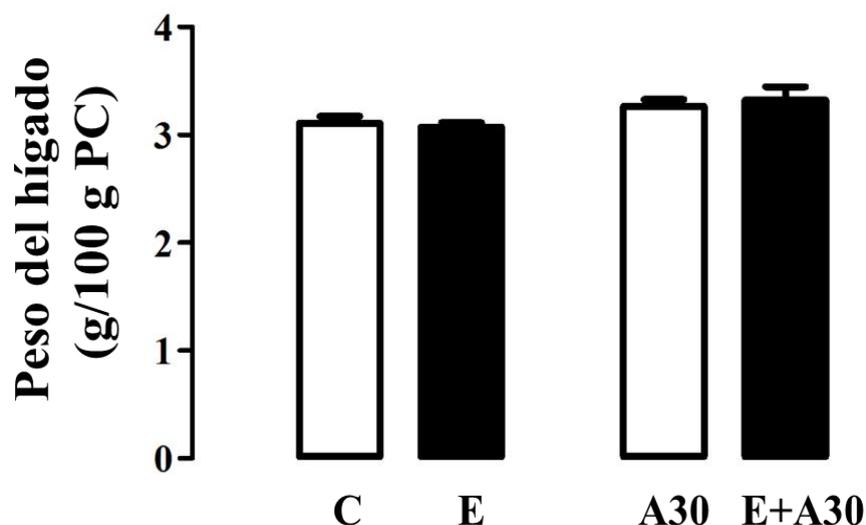
Aunque, el índice de adiposidad no es afectado por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)}=1.83, p=0.19$ ), el estrés crónico ( $F_{(1,1,31)}=0.22, p=0.64$ ), ni por la interacción de ambos factores ( $F_{(1,1,31)}=0.16, p=0.84$ ; Figura 23).



**Figura 23. Índice de adiposidad.** Se muestra la media  $\pm$ e.e. No se encontraron diferencias significativas entre grupos. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc. n=8 animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple+estrés; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés + sacarosa al 30%.

### 7.2.5 Peso del hígado

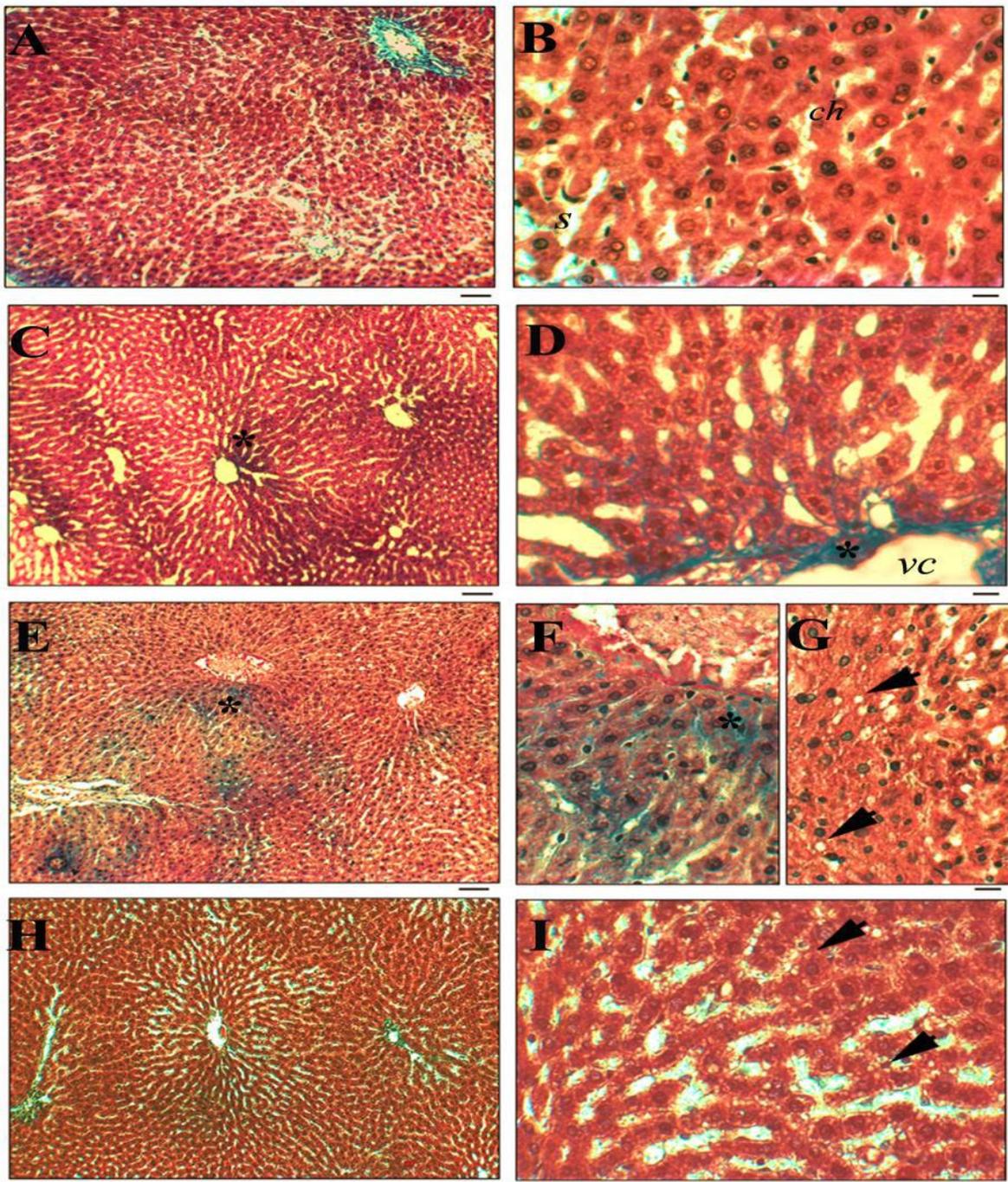
El peso del hígado no fue afectado por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)}=7.11, p>0.05$ ), estrés crónico ( $F_{(1,1,31)}=0.02, p=0.89$ ) ni por la interacción ( $F_{(1,1,31)}=0.43, p=0.52$ ; Figura 24).



**Figura 24. Peso del hígado.** Se muestra la media  $\pm$ e.e. por cada 100g de peso corporal. No se encontraron diferencias significativas entre grupos. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc. n=8 animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico + sacarosa al 30%.

### 7.2.6 Análisis histológico del hígado

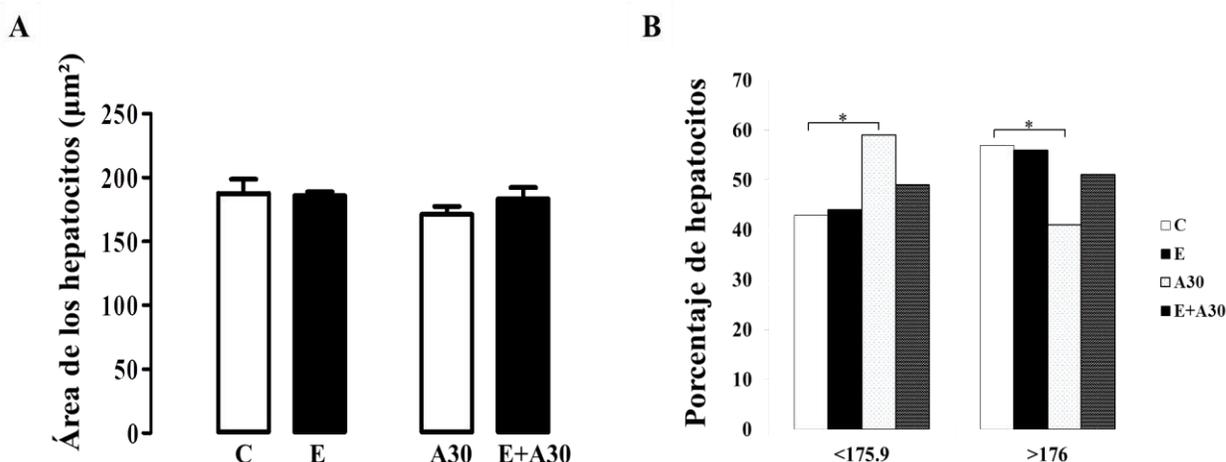
El arreglo característico de los cordones hepáticos, la presencia de núcleo y citoplasma bien definidos fueron observados en el grupo C (Figura 25 A-B). El grupo E mostró una ligera presencia fibras de colágeno en la región perinusoidal y pericentral de la zona 3 acinar del parénquima hepático, claros indicadores de una etapa temprana de una fibrosis de grado 1 en la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) (Fig. 25 C-D). Mientras que, en el grupo A30 se observó la presencia de vesículas de grasa en el citoplasma de los hepatocitos, una reorganización de las sinusoides de la zona cerca de la vena central y además una fibrosis perinusoidal densa y extensa en la zona 3, como indicadores de un estado de fibrosis moderada grado 1 (Fig. 25 E-G). El grupo de E + A30 mostró una mayor acumulación de grasa en el citoplasma (Fig. 25 H-D).



**Figura 25. Fotomicrografías histológicas del hígado.** Animales control (C, A-B), estrés crónico (E, C-D), sacarosa 30% (A30, E-G) y estrés crónico + sacarosa al 30% (E+A30, H-I). Se muestra la presencia de colágeno (\*) alrededor de la vena central (vc) y dentro de los sinusoides (s). La flecha blanca muestra la presencia de vesículas de grasa en el citoplasma de los hepatocitos. Teñidas con Tricrómica de Masson. Barras 50  $\mu\text{m}$  (A, C, E, H) y 10  $\mu\text{m}$  (B, D, E, G, I).

### 7.2.7 Área de los hepatocitos

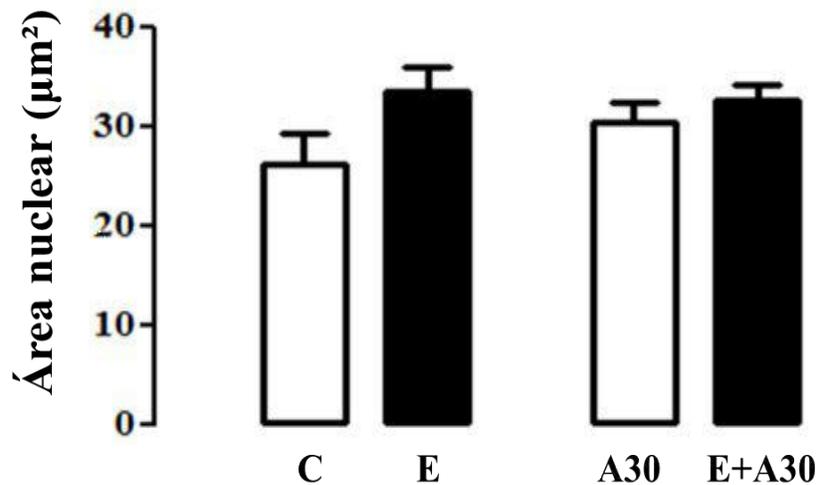
El área de los hepatocitos no fue afectada por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)}=1.43, p=0.24$ ), el estrés crónico ( $F_{(1,1,31)}=0.41, p=0.53$ ) ni la interacción de ambos factores ( $F_{(1,1,31)}=0.74, p=0.40$ ; Figura 26-A). Sin embargo, la dieta afectó el porcentaje de hepatocitos con un área  $<175.9\mu\text{m}^2$ , incrementando significativamente en el grupo A30 (59%) respecto al grupo C (43%;  $p<0.05$ ). Por el contrario, encontramos significativamente un menor porcentaje de hepatocitos  $>176\mu\text{m}^2$  en el grupo A30 (41%) respecto al grupo C (57%;  $p<0.05$ ). Sin mostrar diferencias entre los grupos E y E+A30 (Figura 26-B).



**Figura 26. Tamaño de los hepatocitos.** Área de los hepatocitos (A), se muestra la media  $\pm$ e.e. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc. Porcentaje de hepatocitos por rango de área (B), Chi-cuadrada seguida de una prueba de Fisher. Se encontraron diferencias significativas por el consumo de sacarosa. \* $p<0.05$ .  $n=8$  animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico + sacarosa al 30%.

### 8.2.8 Área nuclear

El área nuclear no fue afectada por la dieta ( $F_{(1,1,31)}=0.002, p=0.96$ ), el estrés crónico ( $F_{(1,1,31)}=1.03, p=0.32$ ) ni por la interacción de ambos factores ( $F_{(1,1,31)}=1.19, p=0.28$ ; Figura 27).

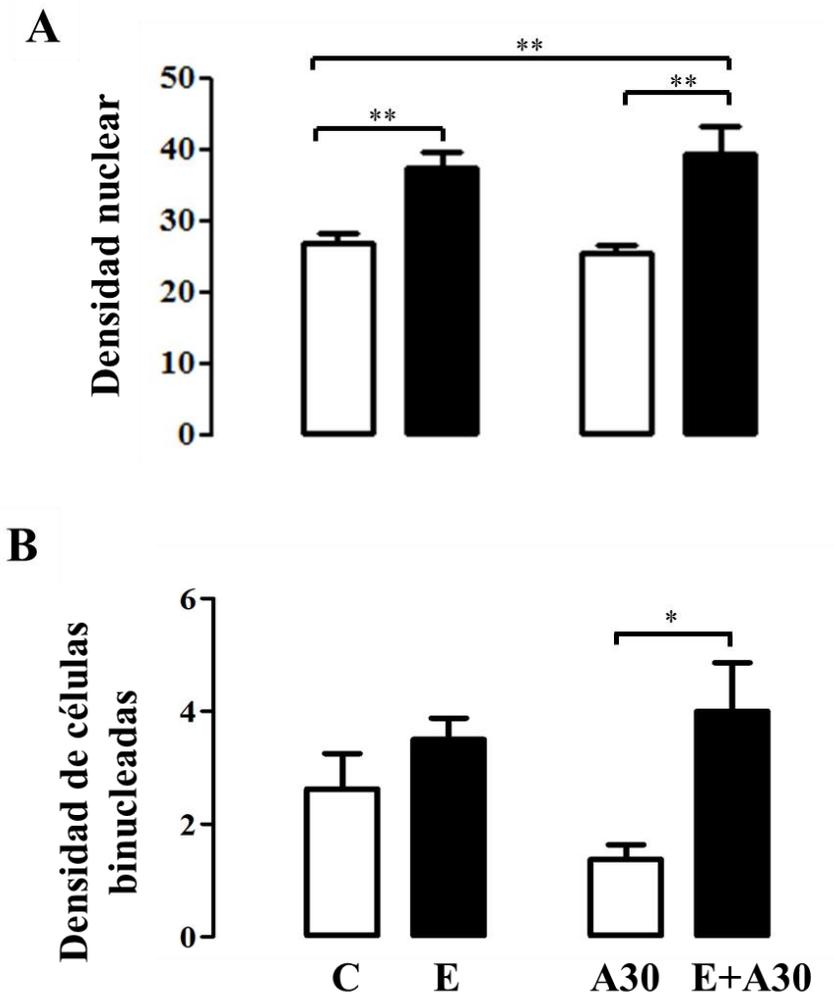


**Figura 27. Área de los núcleos.** Se muestra la media  $\pm$ e.e. No se encontraron diferencias significativas entre grupos. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc. n=8 animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E + A30, estrés crónico + sacarosa al 30%.

### 7.2.9 Densidad nuclear

La densidad nuclear no fue afectado por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)}=0.02, p=0.89$ ). Sin embargo, el estrés crónico ( $F_{(1,1,31)}=25.17, p<0.01$ ) provocó un aumento significativo en la densidad nuclear en los grupos E y E+A30 comparado con los grupos C y A30, sin interacción entre ambos factores ( $F_{(1,1,31)}=0.47, p=0.49$ ; Figura 28-A).

De la misma manera, la densidad de células binucleadas no fue afectada por la dieta ( $F_{(1,1,31)}=0.42, p=0.52$ ). Remarcadamente, el estrés crónico ( $F_{(1,1,31)}=9.06, p<0.05$ ) afectó la densidad de células binucleadas en el grupo E+A30 comparado con el grupo A30, sin mostrar interacción entre ambos factores ( $F_{(1,1,31)}=2.26, p=0.14$ ; Figura 28-B).

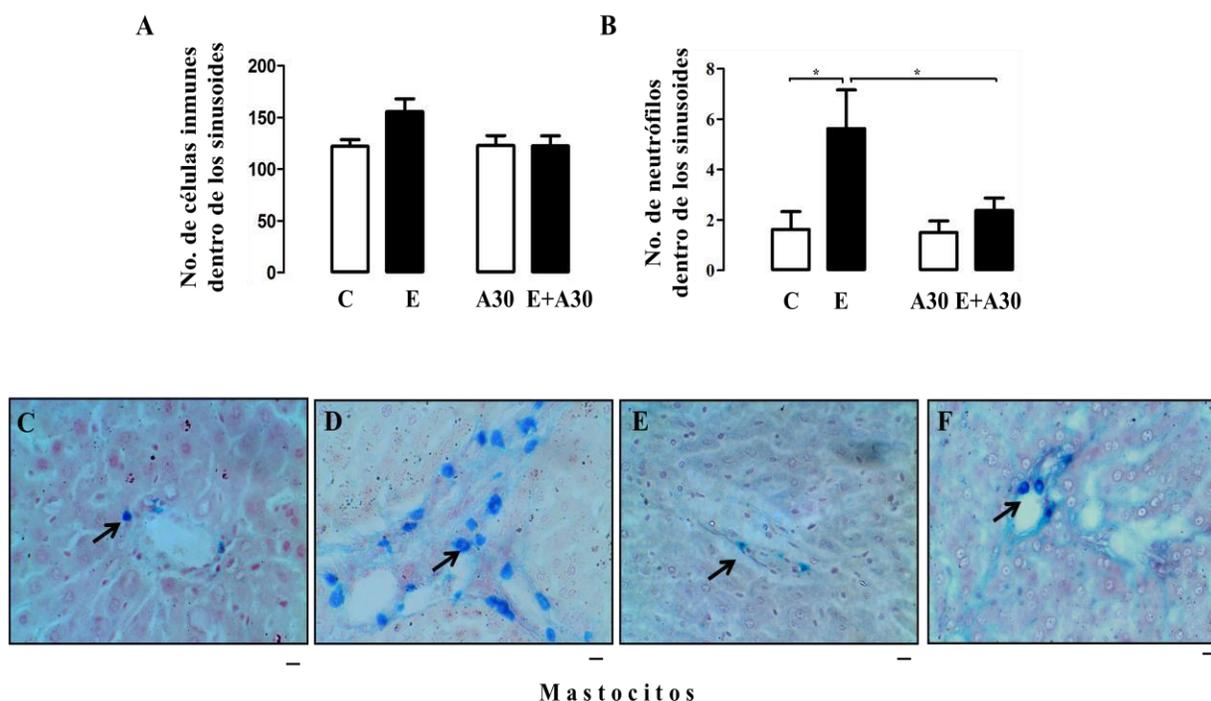


**Figura 28. Densidad de núcleos.** Densidad nuclear (A) y densidad de células binucleadas (B). Se muestra la media  $\pm$ e.e. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ . Se encontraron diferencias significativas por el estrés. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc.  $n=8$  animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico + sacarosa al 30%.

### 7.2.10 Infiltración de células inmunes dentro de los sinusoides

El número de células inmunes no se vio afectado por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)} = 2.70$ ,  $p = 0.11$ ), el estrés crónico ( $F_{(1,1,31)} = 2.83$ ,  $p = 0.10$ ), y la interacción entre ambos factores ( $F_{(1,1,31)} = 2.96$ ,  $p = 0.09$ ; Figura 29-A). Por otro lado, la infiltración de neutrófilos tampoco se vio afectado por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)} = 3.44$ ,  $p = 0.07$ ). Aunque, el estrés crónico ( $F_{(1,1,31)} = 7.17$ ,  $p < 0.05$ ) aumento significativamente la infiltración de neutrófilos dentro de los sinusoides en el grupo E respecto al grupo C. Mientras que, la interacción interacción entre el

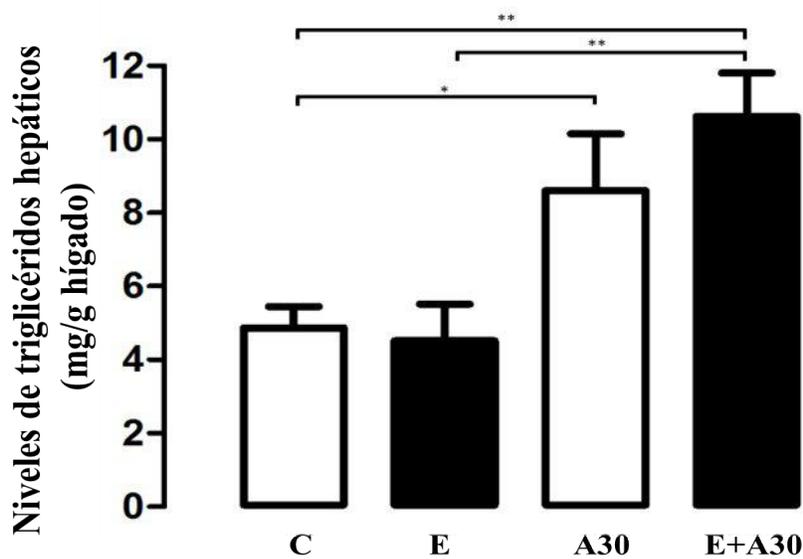
estrés crónico y la dieta alta en sacarosa (grupo E + A30) disminuyen significativamente el número de neutrófilos respecto al grupo E ( $F_{(1,1,31)} = 2.94$ ,  $p < 0.05$ , Figura 29-B). Adicionalmente, encontramos una mayor acumulación de mastocitos alrededor de la vena central del parénquima hepático en el grupo E y una presencia similar entre los grupos C, A30 y E + A30 (Figura 29 C-F).



**Figura 29. Infiltración de células inmunes.** Número de células inmunes (A) y neutrófilos (B) dentro de los sinusoides. Se muestra la media  $\pm$ e.e. \*  $p < 0.05$ . Se encontraron diferencias significativas por el estrés. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc.  $n=8$  animales/grupo. Animales control (C, C), estrés crónico (E, D), sacarosa 30% (A30, E) y estrés crónico + sacarosa al 30% (E+A30, F). La flecha evidencia la presencia de mastocitos alrededor de la vena central. Teñidas con Azul de Alcian. Barra 10  $\mu$ m.

### 7.2.11 Triglicéridos hepáticos

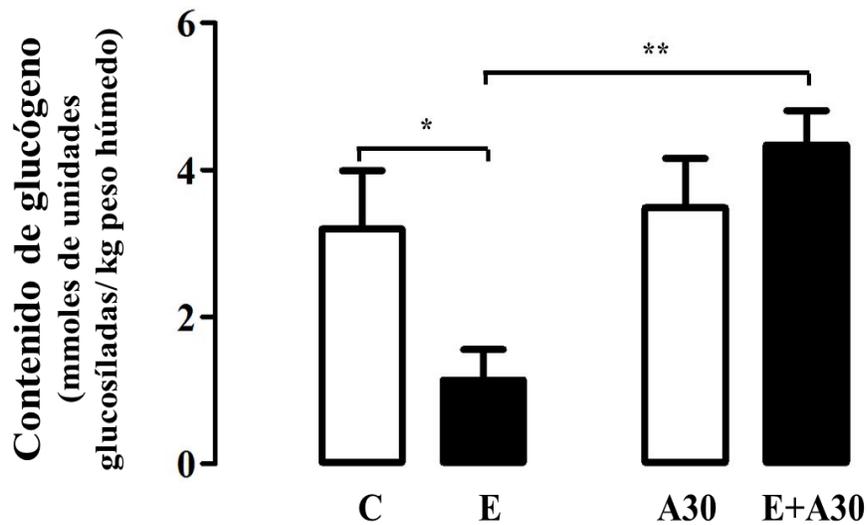
Los niveles de triglicéridos hepáticos fueron significativamente afectados por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,27)} = 19.08$ ,  $p < 0.05$ ) en los grupos A30 y E+A30 comparado con los grupos C. Mientras el estrés crónico no afecta ( $F_{(1,1,27)} = 0.55$ ,  $p = 0.46$ ) ni la interacción de ambos factores ( $F_{(1,1,27)} = 1.11$ ,  $p = 0.30$ ; Figura 30).



**Figura 30. Triglicéridos hepáticos.** Se muestra la media  $\pm$ e.e. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01. El consumo de sacarosa aumento los niveles de triglicéridos hepáticos. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc.  $n=7$  animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico +sacarosa al 30%.

### 7.2.12 Glucógeno hepático

El contenido de glucógeno hepático fue significativamente aumentado por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,23)}=8.27, p<0.05$ ). Aunque, el análisis estadístico del estrés crónico no mostro diferencias ( $F_{(1,1,23)}=0.99, p=0.33$ ) encontramos una disminución significativa entre el grupo E respecto al grupo C ( $p<0.05$ ). En contraste, la interacción entre el estrés crónico y la dieta alta en sacarosa (grupo E + A30) incremento el contenido de glucógeno respecto al grupo E ( $F_{(1,1,23)}=5.76, p<0.01$ ; Figura. 31).

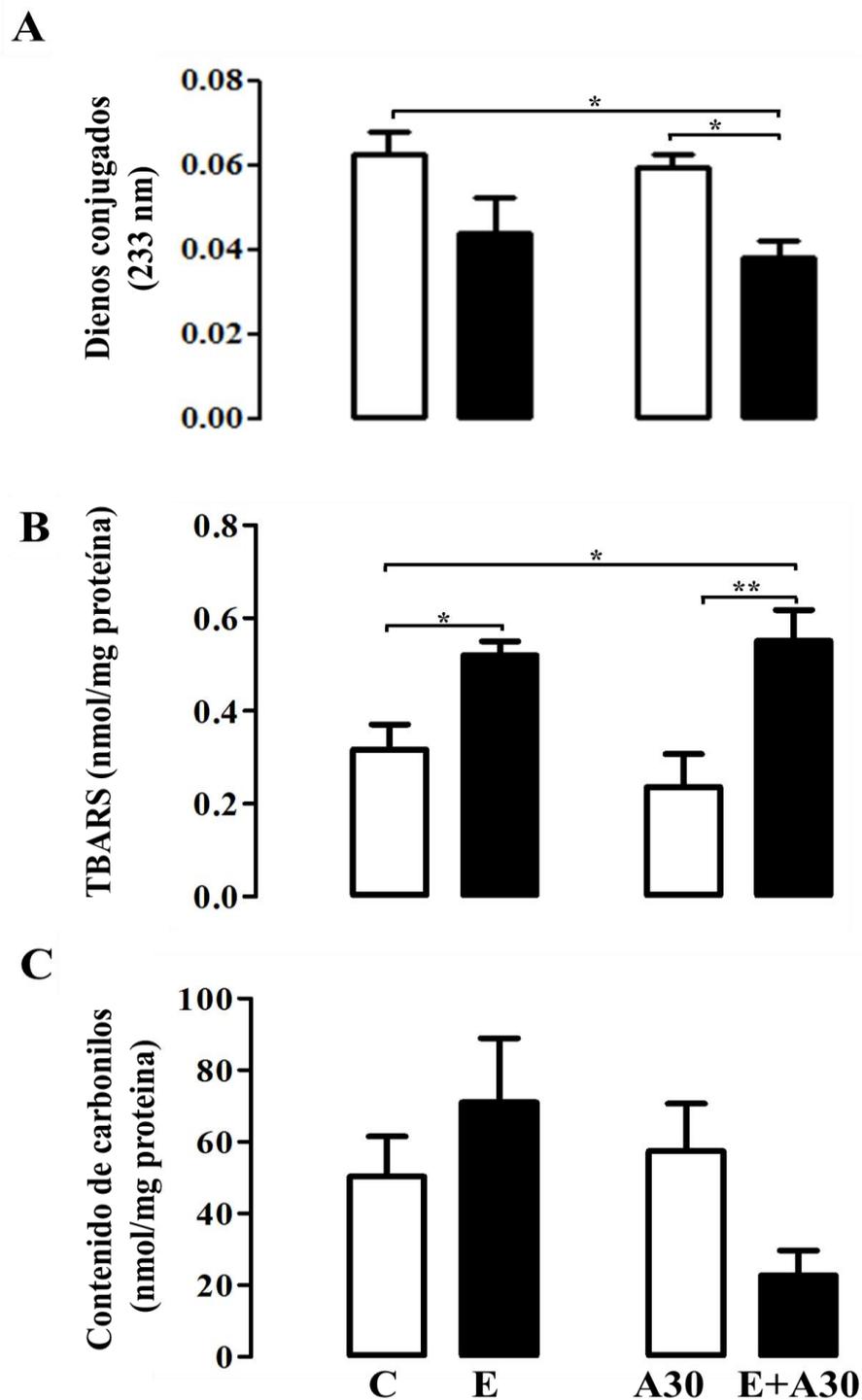


**Figura 31. Contenido de glucógeno hepático.** Se muestra la media  $\pm$ e.e. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ . El consumo de sacarosa y el estrés crónico afectaron el contenido de glucógeno hepático. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc.  $n=6$  animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico +sacarosa al 30%.

### 7.2.13 Daño oxidativo hepático

La dieta alta en sacarosa no afectó los dienos conjugados ( $F_{(1,1,31)}=1.01$ ,  $p=0.32$ ). Mientras el estrés crónico, induce una disminución ( $F_{(1,1,31)}=11.99$ ,  $p<0.05$ ) en el grupo E + A30 en comparación con los grupos C y A30, sin interacción entre ambos factores ( $F_{(1,1,31)}=0.11$ ,  $p=0.74$ ; Figura 32-A). De la misma manera la dieta ( $F_{(1,1,31)}=0.19$ ,  $p=0.66$ ) no afectó los niveles de TBARS. Mientras que, el estrés crónico ( $F_{(1,1,31)}=19.68$ ,  $p<0.05$ ) aumento los niveles de TBARS en los grupos E y E+A30 en comparación con el grupo C y A30, sin interacción entre ambos factores ( $F_{(1,1,31)}=0.96$ ,  $p=0.34$ ; Figura 32-B).

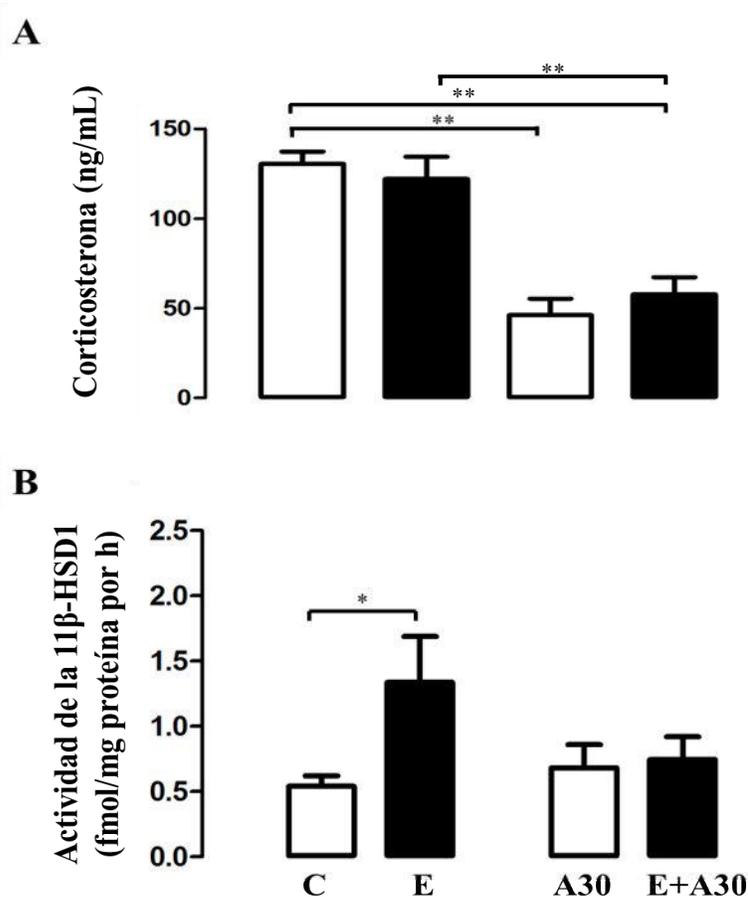
Sin embargo, el contenido de grupos carbonilo no fue afectado por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,23)}=2.55$ ,  $p=0.13$ ), el estrés crónico ( $F_{(1,1,23)}=0.23$ ,  $p=0.59$ ), ni la interacción de ambos factores ( $F_{(1,1,23)}=4.63$ ,  $p>0.05$ ; Figura. 32-C).



**Figura 32. Estrés oxidativo en hígado.** Dienos conjugados(A), TBARS (B) y carbonilos (C). Se muestra la media  $\pm$ e.e. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01. El estrés crónico promueve un aumento de la lipoperoxidación. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc. n=6-8 animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico +sacarosa al 30%.

### 7.2.14 Corticosterona y 11 $\beta$ -HSD1

La concentración sérica de corticosterona disminuye por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)}=15.81, p<0.01$ ) en los grupos A30 y E+A30 comparado con los grupos C y E. Mientras el estrés crónico ( $F_{(1,1,31)}=0.002, p=0.98$ ) no afectó los niveles de corticosterona ni la interacción entre ambos factores ( $F_{1,1,26}=0.15, p=0.69$ ; Figura 33-A). Por el contrario la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,23)}=0.66, p=0.42$ ) no afectó la actividad de la enzima 11 $\beta$ -HSD1 hepática. Mientras el estrés crónico promovió un aumento significativo ( $F_{(1,1,23)}=6, p<0.05$ ) de la actividad de la enzima 11 $\beta$ -HSD1 hepática respecto al grupo C, sin interacción de ambos factores ( $F_{(1,1,23)}=2.66, p=0.12$ ; Figura 33-B).

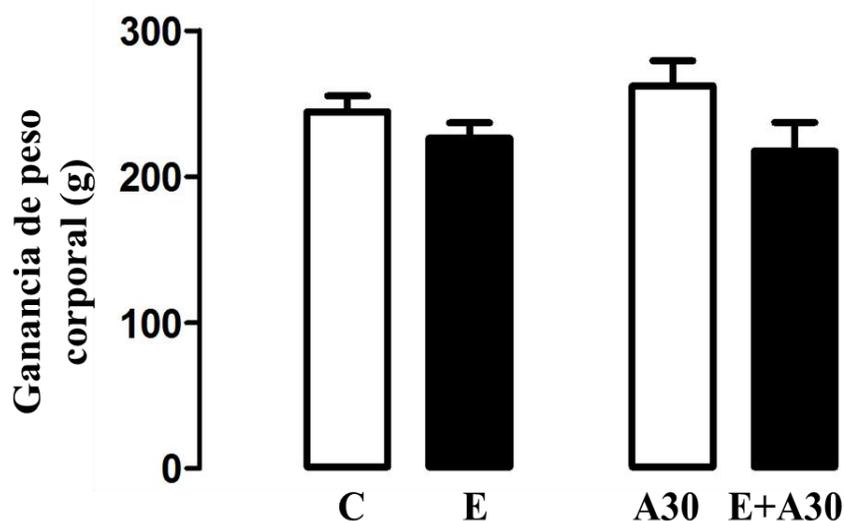


**Figura 33. Corticosterona y actividad de la 11 $\beta$ -HSD1.** Corticosterona sérica (A) y actividad hepática de la enzima 11 $\beta$ -HSD1 (B). Se muestra la media  $\pm$ e.e. \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ . Se encontraron diferencias significativas por el consumo de sacarosa y el estrés. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc. n=6-8 animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico + sacarosa al 30%.

## 7.3 TERCER MES

### 7.3.1 Ganancia de peso corporal

La ganancia de peso corporal no fue afectado por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)}=0.08, p=0.78$ ); el estrés crónico ( $F_{(1,1,31)}=4.30, p=0.05$ ) ni por la interacción ( $F_{(1,1,31)}=0.78, p=0.39$ ; Figura 34).

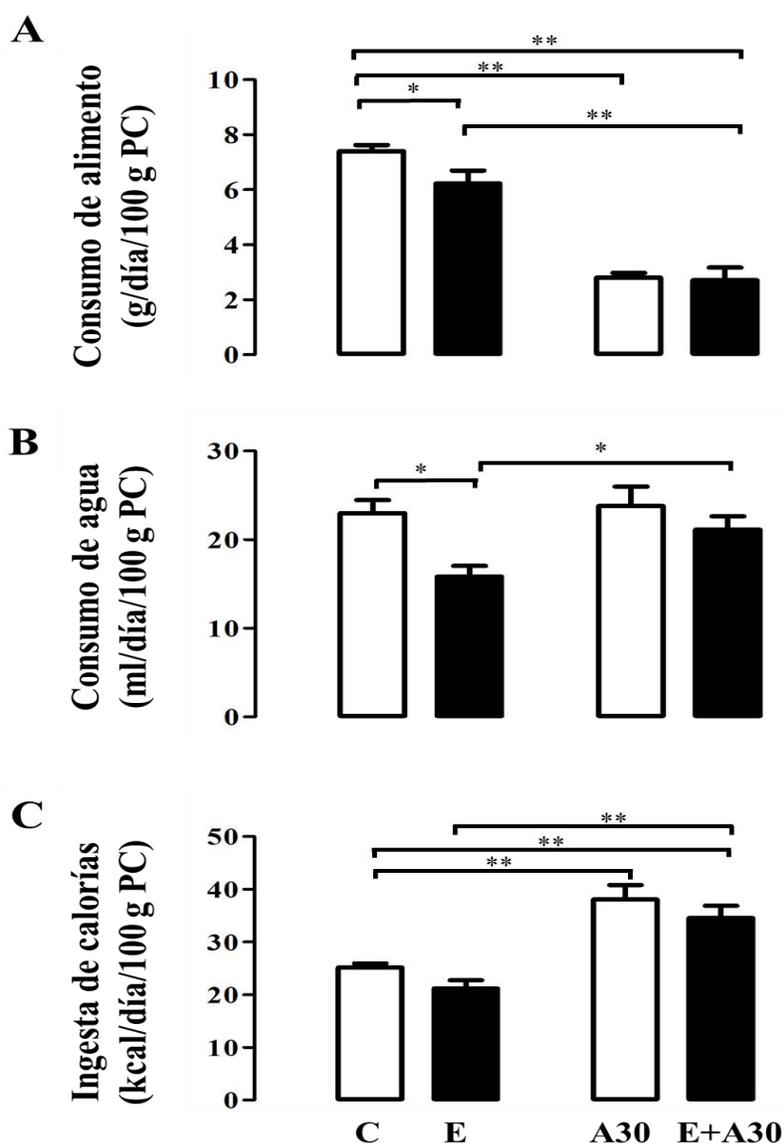


**Figura 34. Ganancia de peso corporal.** Se muestra la media  $\pm$ e.e. No se encontraron diferencias significativas. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc.  $n=8$  animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico + sacarosa al 30%.

### 7.3.2 Consumo de alimento, agua y kilocalorías

El consumo de alimento fue menor en los animales de los grupos de A30 y E + A30 en comparación con el grupo C por efecto de la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)}=129.22, p<0.01$ ). Sin embargo, a pesar de que el análisis estadístico no mostro diferencias significativas por el estrés crónico ( $F_{(1,1,31)}=3.13, p=0.09$ ) encontramos una disminución significativa en el grupo E comparado con el grupo C ( $p<0.05$ ). Sin mostrar interacción entre ambos factores ( $F_{(1,1,31)}=2.24, p=0.15$ ; Figura 35-A). Datos similares encontramos en el consumo de agua donde a pesar de que no se muestra un efecto significativo por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)}=3.47, p=0.07$ ), encontramos que el estrés crónico disminuye significativamente el consumo de agua ( $F_{(1,1,31)}=8.96, p>0.01$ ) y cuando se combinan ambos factores el efecto provocado por el estrés disminuye

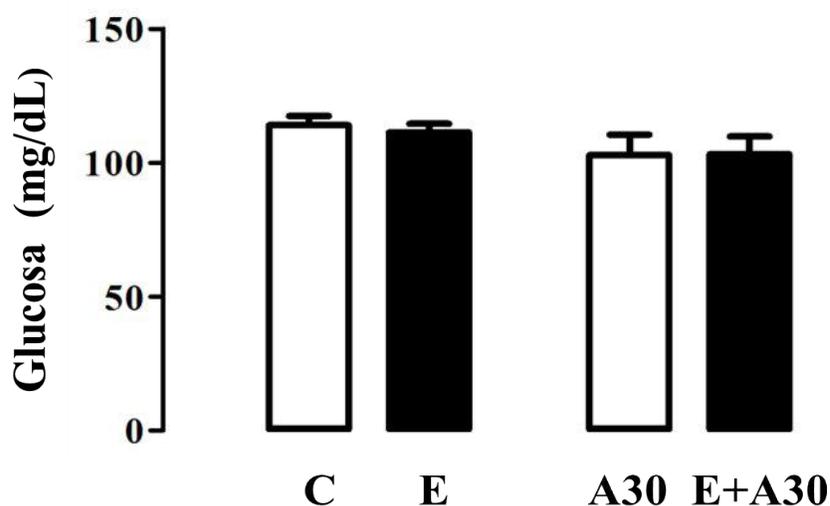
( $p < 0.05$ ) restaurando el consumo de agua. Sin mostrar una interacción entre ambos factores ( $F_{(1,1,31)} = 1.89$ ,  $p = 0.18$ ; Figura 35-B). Por el contrario, el consumo de calorías aumento por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)} = 38.55$ ,  $p < 0.01$ ) en los grupos A30 y E + A30. Mientras que, el estrés crónico ( $F_{(1,1,31)} = 4.47$ ,  $p > 0.05$ ) y la interacción de ambos factores ( $F_{(1,1,31)} = .26$ ,  $p = 0.87$ ) no afecto el consumo calórico (Figura 35-C).



**Figura 35. Consumo de alimento agua y kilocalorías.** Se muestra la media  $\pm$ e.e. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . Se encontraron diferencias significativas por la dieta y por el estrés. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc.  $n = 8$  animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico + sacarosa al 30%.

### 7.3.3 Niveles de glucosa sérica

Los niveles de glucosa en sangre no fueron afectados por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,29)}=2.94$ ,  $p=0.09$ ), el estrés crónico, ( $F_{(1,1,29)}=0.42$ ,  $p=0.84$ ), ni la interacción de ambos factores ( $F_{(1,1,29)}=0.08$ ,  $p=0.79$ ; Figura 36).



**Figura 36. Niveles de glucosa sérica.** Se muestra la media  $\pm$ e.e. No se encontraron diferencias significativas. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc.  $n=7$  animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico+ sacarosa al 30%.

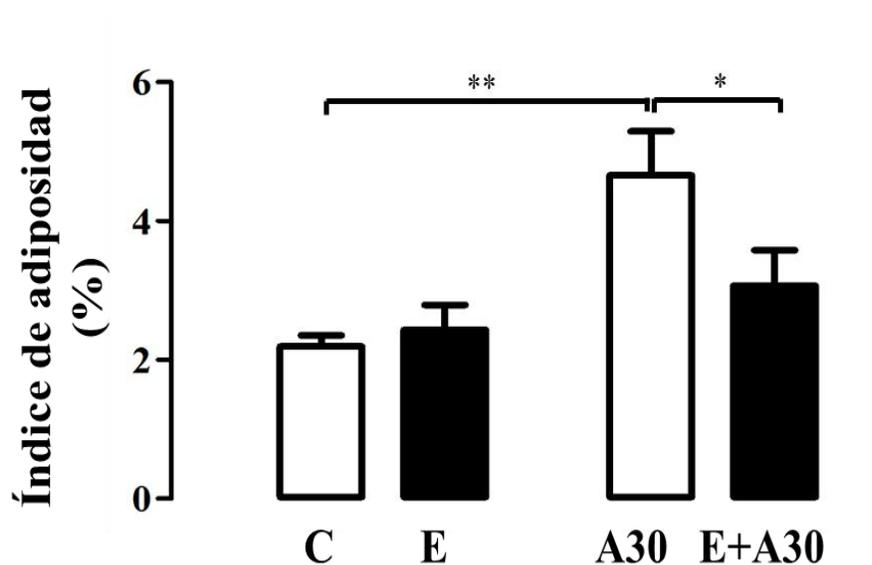
### 7.3.4 Índice de adiposidad

En la Tabla 5 se muestra el peso del tejido adiposo pericardio, abdominal, perirrenal y gonadal por cada 100 g de peso corporal. Podemos observar que la cantidad de tejido adiposo pericardio, abdominal y gonadal aumenta por la dieta alta en sacarosa, mientras que, el estrés crónico aumenta el tejido adiposo perirrenal, y la combinación del estrés crónico con la dieta disminuye en los efectos ocasionados por la dieta alta en sacarosa.

Tejido adiposo (mg/100 g PC)	C	E	A30	E+A30
Pericardio	116.5±15.24 <sup>a</sup>	130.3±25.98 <sup>a</sup>	179.9±14.47 <sup>b</sup>	140.2±13.78 <sup>a</sup>
Abdominal	996.9±119.1 <sup>a</sup>	929.1±140.2 <sup>a</sup>	2558±455.3 <sup>b</sup>	1170±209.7 <sup>a</sup>
Perirrenal	170±21.51 <sup>a</sup>	639.9±107.1 <sup>bc</sup>	402.6±48.65 <sup>ab</sup>	772.4±148.9 <sup>c</sup>
Gonadal	906±57.48 <sup>a</sup>	729.7±124.3 <sup>a</sup>	1520±163.7 <sup>b</sup>	984.5±203.7 <sup>a</sup>

**Tabla 5. Peso de tejido adiposo.** Los datos son expresados como la media±e.e en miligramos (mg) por cada 100 g de peso corporal. Letras diferentes p<0.05. El contenido de tejido adiposo es afectado por la dieta y el estrés. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc. n=8 animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico + sacarosa al 30%.

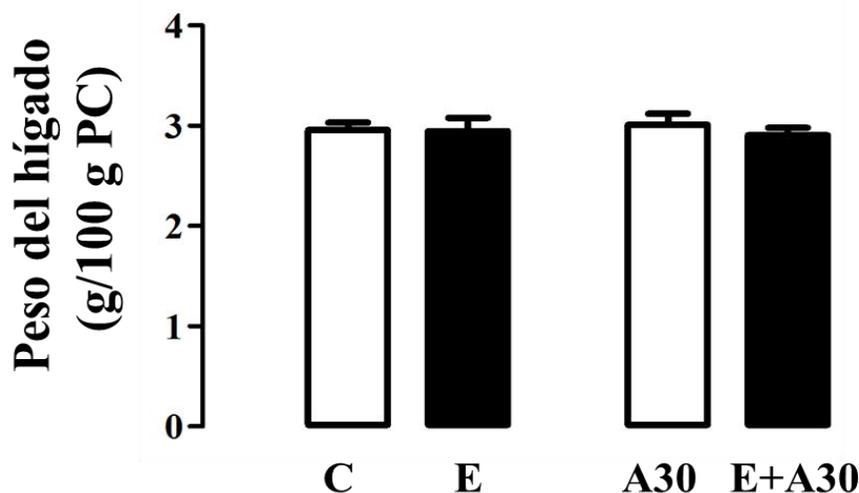
Remarcadamente, el índice de adiposidad aumento por efecto de la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)}=11.87, p<0.01$ ) en el grupo A30 respecto al grupo C, mientras que por el estrés crónico ( $F_{(1,1,31)}=2.25, p=0.15$ ) no fue afectado. Aunque, la interacción de ambos factores ( $F_{(1,1,31)}=4.11, p=0.05$ ) disminuye significativamente el índice de adiposidad en el grupo E + A30 (Figura 37).



**Figura 37. Índice de adiposidad.** Se muestra la media ±e.e. Se encontraron diferencias significativas por la dieta alta en sacarosa y por la interacción de ambos factores. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc. n=8 animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico+ sacarosa al 30%.

### 7.3.5 Peso del hígado

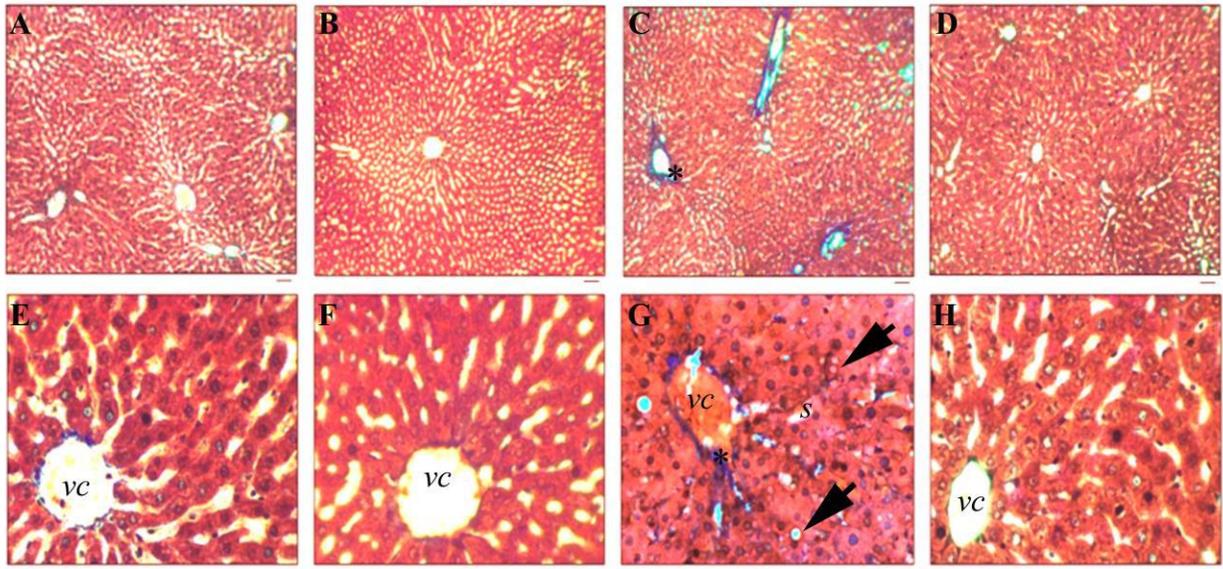
El peso del hígado no fue afectado por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)}=0.005$ ,  $p=0.95$ ), el estrés crónico ( $F_{(1,1,31)}=0.31$ ,  $p=0.58$ ) ni la interacción de ambos factores ( $F_{(1,1,31)}=0.21$ ,  $p=0.65$ ; Figura 38).



**Figura 38. Peso del hígado.** Se muestra la media  $\pm$ e.e. por cada 100g de peso corporal. No se encontraron diferencias significativas entre grupos. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc. n=8 animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico + sacarosa al 30%.

### 7.3.6 Análisis histológico del hígado

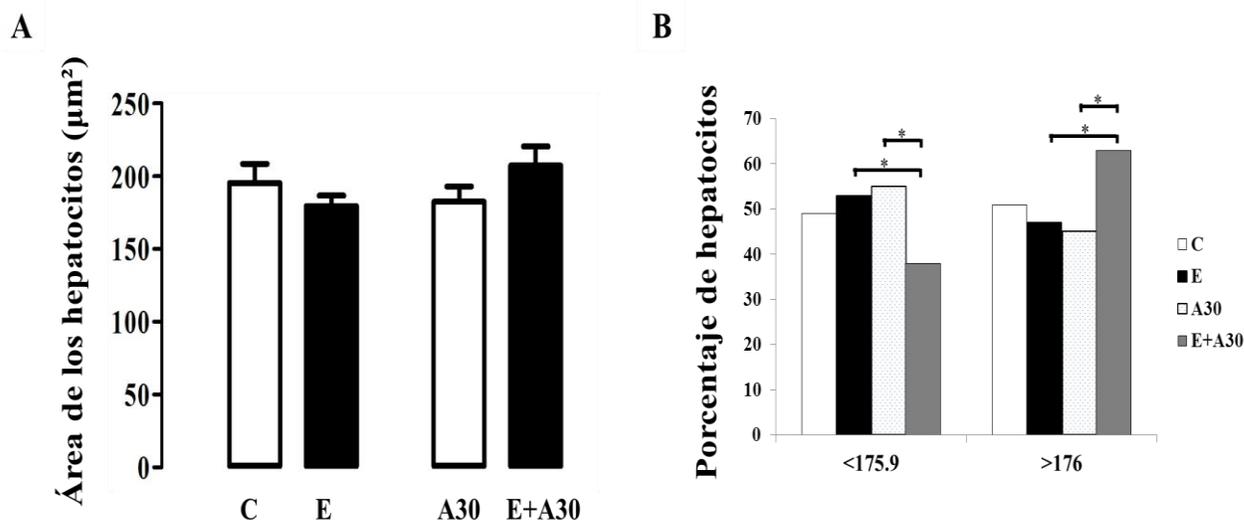
El arreglo propio del parénquima hepático se muestra en el grupo C (Figura 39-A). Características similares fueron observadas en el grupo E, donde el arreglo histológico de los cordones hepáticos y sinusoides no sufre modificaciones (Figura 39-B). Sin embargo, en el grupo A30 la ingesta de una dieta rica en sacarosa promovió la presencia de macro y microvesículas de grasa dentro del citoplasma de los hepatocitos acompañado de una densa acumulación de fibras de colágeno alrededor de la vena central acompañada de una congestión hepática dentro de los sinusoides (Fig. 39-C). Mientras que, en el grupo E +A30 se muestra una arquitectura normal del hígado (Figura 39-D).



**Figura 39. Fotomicrografías histológicas del hígado.** Animales control (C; A, E), estrés crónico (E; B, F), sacarosa 30% (A30; C, G) y estrés crónico + sacarosa al 30% (E+A30; D, H). Se muestra la presencia de colágeno (\*) alrededor de la vena central (vc) y dentro de los sinusoides (s) acompañada de una congestión hepática en los sinusoides. Las flechas muestran la presencia de vesículas de grasa. Teñidas con Tricrómica de Masson. Barras 10  $\mu\text{m}$  (A-D) y 50  $\mu\text{m}$  (E-H).

### 7.3.7 Área de los hepatocitos

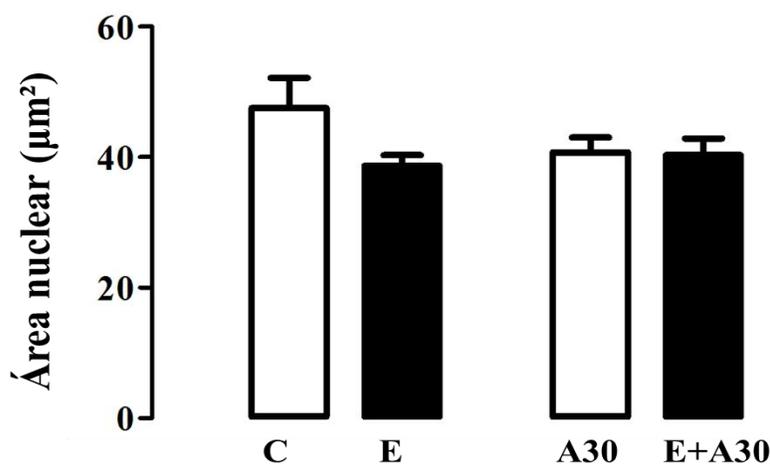
El área de los hepatocitos no fue afectada por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)}=0.45, p=0.51$ ), el estrés crónico ( $F_{(1,1,31)}=0.16, p=0.69$ ) ni la interacción de ambos factores ( $F_{(1,1,31)}=3.32, p=0.08$ ; Figura 40-A). Sin embargo, la combinación de factores disminuye significativamente el porcentaje de hepatocitos con un área  $<175.9\mu\text{m}^2$ , en el grupo E + A30 (38%) respecto al grupo E (43%) y al grupo A30 (55%;  $p<0.05$ ). Por el contrario, encontramos un mayor porcentaje de hepatocitos  $>176\mu\text{m}^2$  en el grupo E+A30 (63%) respecto al grupo E (47%) y al grupo A30 (45%;  $p<0.05$ ). Sin mostrar diferencias entre los grupos E y A30 respecto al grupo C (Figura 40-B).



**Figura 40. Tamaño de los hepatocitos.** Área de los hepatocitos (A), se muestra la media  $\pm$ e.e. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc. Porcentaje de hepatocitos por rango de área (B), Chi-cuadrada seguida de una prueba de Fisher. Se encontraron diferencias significativas por la combinación de ambos factores. \* $p < 0.05$ .  $n=8$  animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico + sacarosa al 30%.

### 7.3.8 Área nuclear

El área nuclear no fue afectada por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)}=0.74, p=0.40$ ), el estrés crónico ( $F_{1,1,31}=2.42, p=0.13$ ) ni la interacción de ambos factores ( $F_{(1,1,31)}=1.98, p=0.17$ ; Figura 41).

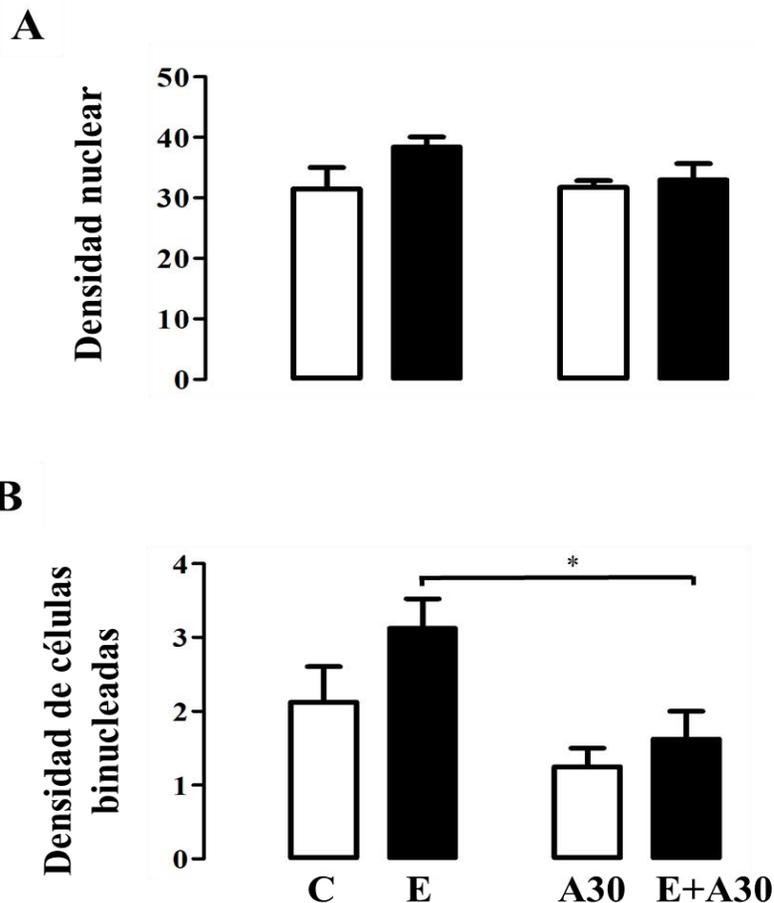


**Figura 41. Área de los núcleos.** Se muestra la media  $\pm$ e.e. No se encontraron diferencias significativas entre grupos. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc.  $n=8$  animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E + A30, estrés crónico + sacarosa al 30%.

### 7.3.9 Densidad nuclear

La densidad nuclear no fue afectada por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)}=1.11, p=0.30$ ), el estrés crónico ( $F_{(1,1,31)}=2.79, p=0.11$ ), ni la interacción de ambos factores ( $F_{(1,1,31)}=1.34, p=0.26$ ; Figura 42-A).

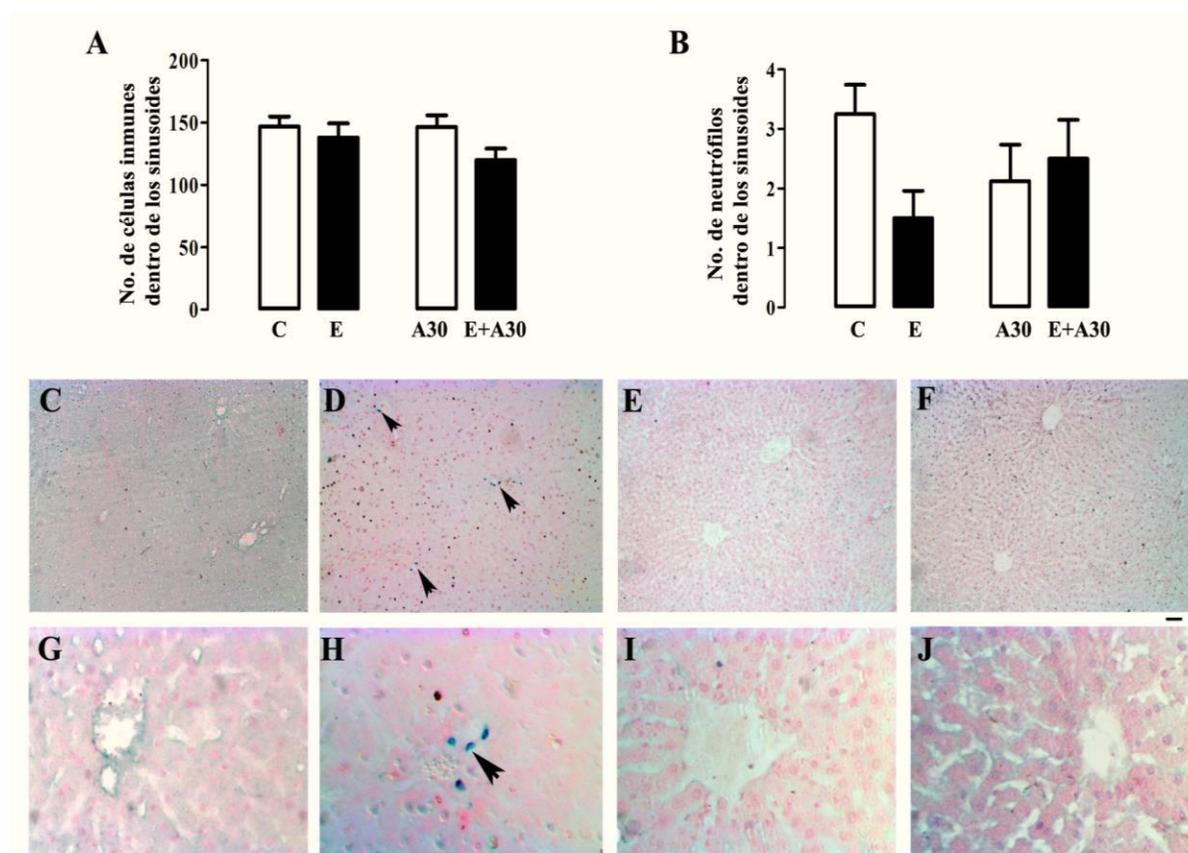
Sin embargo, la densidad de células binucleadas fue afectada por la dieta ( $F_{(1,1,31)}=9.54, p<0.05$ ) en el grupo E+A30 respecto al grupo E. Aunque, el estrés crónico ( $F_{(1,1,31)}=3.20, p=0.08$ ), ni la interacción de ambos factores ( $F_{(1,1,31)}=0.66, p=0.42$ ); mostraron cambios significativos en los grupos E y E+A30 respecto a los grupos C y A30, respectivamente (Figura 42-B).



**Figura 42. Densidad de núcleos.** Densidad nuclear (A) y densidad de células binucleadas (B). Se muestra la media  $\pm$ e.e. \*  $p<0.05$ . Se encontraron diferencias significativas por la dieta. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc.  $n=8$  animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico + sacarosa al 30%.

### 7.3.10 Infiltración de células inmunes dentro de los sinusoides

El número de células inmunes no se vio afectado por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)}=0.91$ ,  $p=0.35$ ), el estrés crónico ( $F_{(1,1,31)}=3.41$ ,  $p=0.08$ ), y la interacción entre ambos factores ( $F_{(1,1,31)}=0.84$ ,  $p=0.37$ ; Figura 43-A). De manera similar, la infiltración de neutrófilos dentro de los sinusoides tampoco fue afectada por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)}=0.01$ ,  $p=0.91$ ), el estrés crónico ( $F_{(1,1,31)}=1.50$ ,  $p=0.23$ ) y la interacción de ambos factores ( $F_{(1,1,31)}=3.59$ ,  $p=0.07$ , Figura 43-B). En contraste, una presencia evidente de mastocitos fue observada alrededor de la vena central en el grupo E. Mientras que, en los grupos C y A30 fue ausente. Resultados similares fueron encontrados en la combinación de ambos factores (grupo E+A30) donde el consumo de sacarosa inhibe el efecto del estrés (Figura 43 C-F).

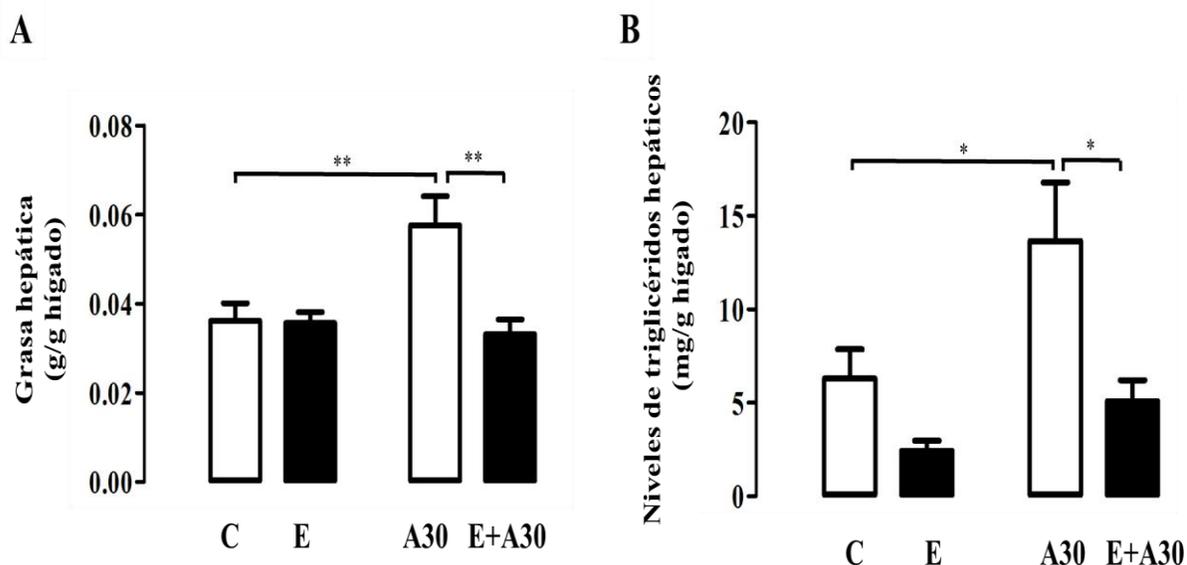


**Figura 43. Infiltración de células inmunes.** Número de células inmunes (A) y neutrófilos (B) dentro de los sinusoides. Se muestra la media  $\pm$ e.e. No se encontraron diferencias significativas. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc.  $n=8$  animales/grupo. Animales control (C; C, G), estrés crónico (E; D, H), sacarosa 30% (A30; E, I) y estrés crónico + sacarosa al 30% (E+A30; F, J). La flecha evidencia la presencia de mastocitos alrededor de la vena central. Teñidas con Azul de Alcian. Barra 50 $\mu$ m (C-F) y 10  $\mu$ m (G-J).

### 7.3.11 Contenido de grasa y triglicéridos hepáticos

El contenido de grasa en hígado se vio afectada por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,26)}= 4.70$ ,  $p<0.05$ ) en el grupo A30 en comparación con el grupo C. Por otro lado, aunque el análisis estadístico mostro cambios significativos por el estrés crónico ( $F_{(1,1,26)}= 8,02$ ,  $p<0.01$ ) no encontramos diferencias significativas entre el grupo E y el grupo C. Sin embargo, la combinación de ambos factores ( $F_{(1,1,26)}= 8,02$ ,  $p<0.01$ ) disminuye significativamente la acumulación de grasa hepática en el grupo E+A30 en comparación con el grupo A30 (Figura 44-A).

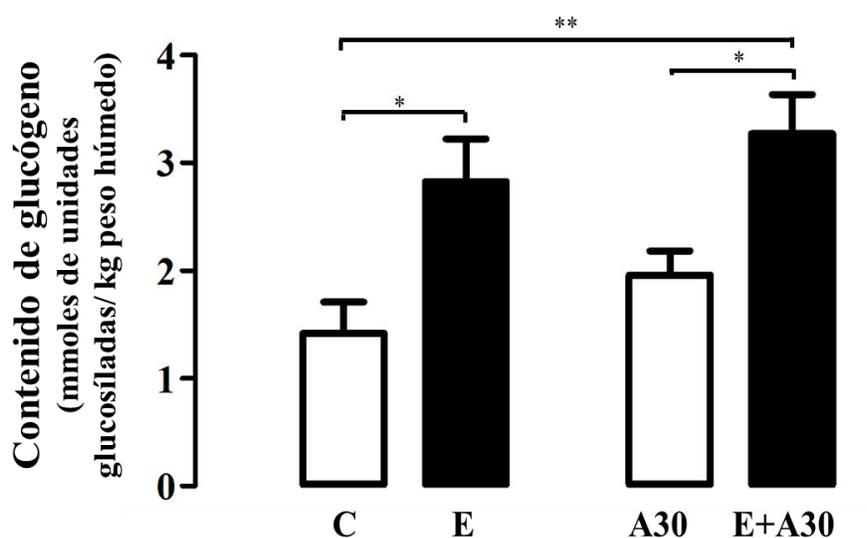
De manera similar, los niveles hepáticos de triglicéridos se vieron afectados por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,26)}= 6.98$ ,  $p<0.05$ ) en el grupo A30. Mientras el estrés crónico ( $F_{(1,1,27)}= 10.82$ ,  $p<0.05$ ) los disminuye en el grupo E+A30 en comparación con el grupo A30. Sin mostrar una interacción entre ambos factores ( $F_{(1,1,26)}= 1.54$ ,  $p=0.23$ ; Figura 44-B).



**Figura 44. Grasa (A) y triglicéridos (B) hepáticos.** Se muestra la media  $\pm$ e.e. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ . El consumo de sacarosa aumento los niveles de grasa y triglicéridos hepáticos. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc. n=6-7 animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico +sacarosa al 30%.

### 7.3.12 Glucógeno hepático

El contenido de glucógeno hepático no fue afectado por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,26)}= 2.08$ ,  $p= 0.16$ ). Sin embargo, el estrés crónico ( $F_{(1,1,26)}= 15.91$ ,  $p<0.01$ ) aumento significativamente el contenido de glucógeno en hígado en los grupos E y E+A30 en comparación con el grupo C y A30. Mientras que, la interacción entre ambos factores ( $F_{(1,1,26)}= 0.02$ ,  $p= 0.89$ ) no modificaron a acumulación de glucógeno en hígado (Figura. 45).



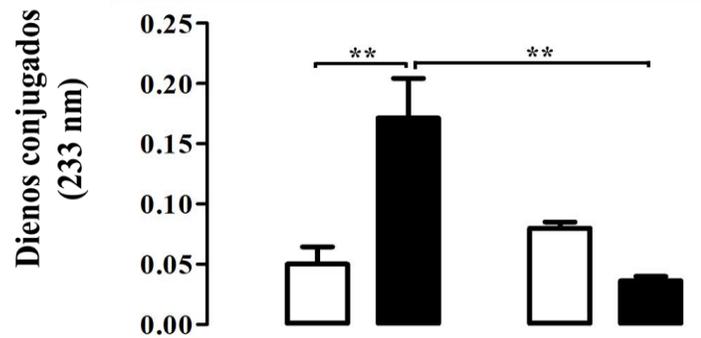
**Figura 45. Contenido de glucógeno hepático.** Se muestra la media  $\pm$ e.e. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ . El estrés crónico aumento significativamente el contenido de glucógeno hepático. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post-hoc.  $n=6-8$  animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico +sacarosa al 30%.

### 7.3.13 Daño oxidativo hepático

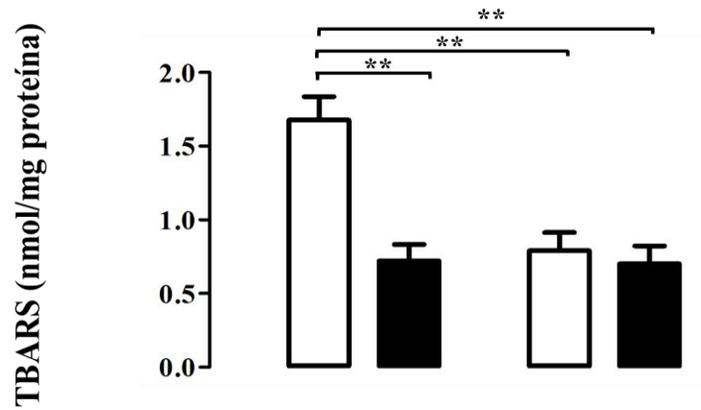
Aunque el análisis estadístico de los niveles de dienos conjugados muestran diferencias por el consumo de la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,26)}= 7.91$ ,  $p<0.01$ ), no encontramos diferencias significativas entre el grupo A30 respecto al grupo C. Sin embargo, el estrés crónico ( $F_{(1,1,26)}= 4.32$ ,  $p<0.01$ ) aumenta significativamente los niveles de dienos conjugados en el grupo E respecto al grupo C. Remarcablemente, el consumo de agua azucarada y el estrés crónico (E+A30) disminuyen significativamente los niveles de dienos conjugados ( $F_{(1,1,26)}= 19.52$ ,  $p<0.01$ ) en comparación con el grupo E (Figura 46-A). Por otra parte, los niveles de TBARS disminuyen por la dieta ( $F_{(1,1,27)}= 12.43$ ,  $p< 0.01$ ), el estrés crónico ( $F_{(1,1,27)}= 16.27$ ,  $p< 0.01$ ) y

la interacción de ambos factores ( $F_{(1,1,27)}= 11.21, p<0.01$ ) en los grupos E, A30 y E+A30 respecto al grupo C (Figura 46-B). De manera similar, el contenido de proteínas carbonilo se vio disminuido por la dieta ( $F_{(1,1,25)}= 36.16, p<0.01$ ) en el grupo A30 respecto al grupo C. Aunque, el análisis estadístico no mostro diferencias significativas por el estrés crónico ( $F_{(1,1,25)}= 28.64, p= 0.06$ ) encontramos una disminución significativa en el grupo E respecto al C ( $p<0.01$ ). Remarcablemente, la interacción entre ambos factores ( $F_{(1,1,25)}= 31.11, p<0.01$ ) disminuye significativamente el contenido de carbonilos en comparación con el grupo C sin mostrar diferencias entre el grupo E y A30 (Figura. 46-C).

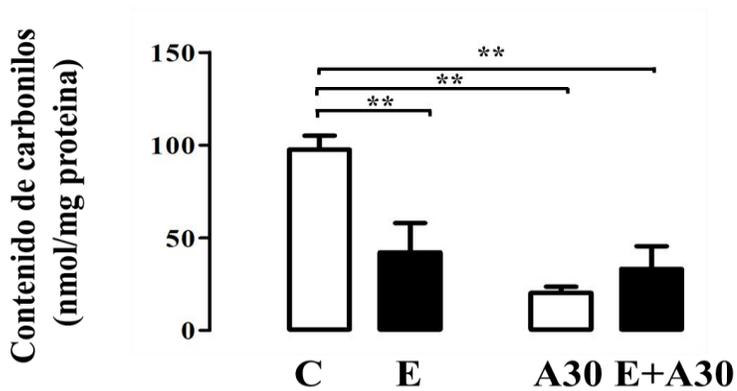
A



B



C

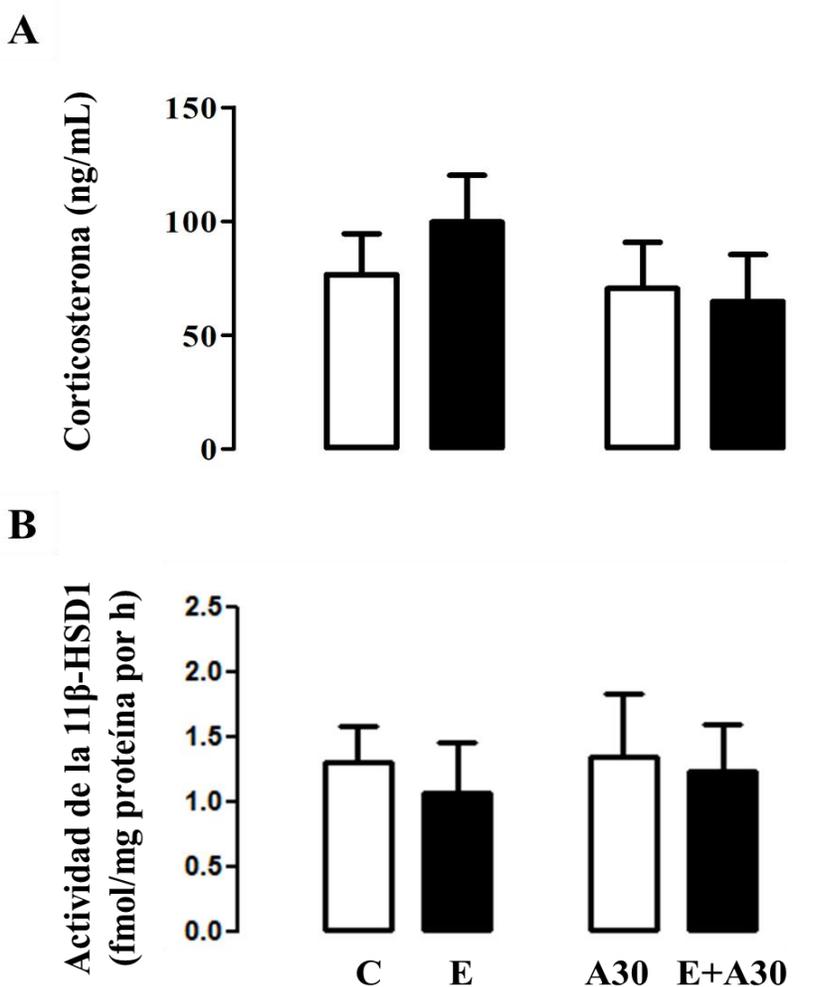


**Figura 46. Daño oxidativo en hígado.** Dienes conjugados(A), TBARS (B) y carbonilos (C). Se muestra la media  $\pm$ e.e. \*\*  $p < 0.01$ . Semuestran diferencias significativas por el estrés crónico y la dieta. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post hoc. n=6-8 animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico +sacarosa al 30%.

### 7.3.14 Corticosterona y 11 $\beta$ -HSD1

Los niveles de corticosterona sérica no fueron afectados por la dieta alta en sacarosa ( $F_{(1,1,31)}=1.07$ ,  $p=0.31$ ), el estrés crónico ( $F_{(1,1,31)}=0.19$ ,  $p=0.66$ ), ni la interacción de ambos factores ( $F_{(1,1,13)}=0.52$ ,  $p=0.47$ ; Figura 47-A).

De manera similar la actividad enzimática de la 11 $\beta$  HSD-1 no mostro cambios significativos por la dieta ( $F_{(1,1,27)}=0.08$ ,  $p=0.77$ ), el estrés crónico ( $F_{(1,1,27)}=0.21$ ,  $p=0.65$ ) y la interacción de ambos factores ( $F_{(1,1,27)}=0.02$ ,  $p=0.87$ ; Figura 47-B).



**Figura 47. Corticosterona y actividad de la 11 $\beta$ -HSD1.** Corticosterona sérica (A) y actividad hepática de la enzima 11 $\beta$ -HSD1 (B). Se muestra la media  $\pm$ e.e. No se encontraron diferencias significativas. ANOVA de dos vías, Newman Keuls post hoc. n=6-8 animales/grupo. C, grupo control (consumió agua simple); E, agua simple + estrés crónico; A30, sacarosa al 30%; E+A30, estrés crónico + sacarosa al 30%.

## **8. DISCUSIÓN**

### **8.1 Primer mes**

Nuestros datos muestran que la dieta alta en sacarosa reduce los niveles de triglicéridos hepáticos promovidos por el estrés crónico por restricción en ratas machos jóvenes. El estrés no afectó el peso corporal, la ingesta de alimento, el índice de adiposidad y el contenido de grasa visceral. Estos resultados concuerdan con otros estudios llevados a cabo en roedores, en los que el estrés crónico no afecta estas variables (Vargovic y cols. 2013; Bruder-Nascimento y cols. 2013; Arcego y cols. 2014; de Oliveira y cols. 2014). Por otra parte, el consumo de sacarosa al 30% durante 4 semanas disminuyó la ingesta de alimento y el aumento de la ingesta calórica sin afectar la ganancia de peso corporal y el índice de adiposidad en ratas macho recién destetados. Estos hallazgos son similares con otros estudios realizados en roedores, en el que la ingesta alta en sacarosa no afecta la ganancia de peso en el período inmediatamente al destete sino que promueve el aumento de peso durante el periodo post-pubertad (Velkoska y cols. 2008; Rodríguez y cols. 2009; Fuente-Martín y cols. 2012). En contraste con ratas macho jóvenes, el consumo de sacarosa aumenta la acumulación de grasa visceral en adultos (El Hafidi y cols. 2001; El Hafidi y cols. 2004; Alexander y cols. 2004; Díaz-Aguila y cols. 2015; Cervantes-Rodríguez y cols. 2014).

El estrés crónico aumenta los niveles de corticosterona en suero (Levin y cols. 2000). Nuestros resultados muestran que el consumo de sacarosa al 30% durante 4 semanas no altera los niveles de corticosterona sérica, pero es capaz de bloquear el efecto hipercortisolémico causado por el estrés crónico en ratas macho jóvenes. Tal modulación de la respuesta del estrés por la ingesta de carbohidratos se ha informado anteriormente (Levin y cols. 2000; Macedo y cols. 2012). Debido a que, ratas estresadas sometidas a una dieta hipercalórica son hiporresponsivas al estrés debido a que tienen una reactividad central reducida (Levin y cols. 2000), que concuerdan con los niveles de corticosterona sérica exhibidos por el grupo E+A30. Otros autores han demostrado las acciones moduladoras de la ingesta de carbohidratos sobre la respuesta basal y neuroendocrina, metabólica y de comportamiento al estrés (Laugero 2001; Pecoraro y cols. 2004). El aumento en la ingesta de comida palatable inducida por glucocorticoides (Pecoraro y cols. 2005) se ha asociado con la alimentación basada en

recompensa, que se ha sugerido como un medio para reducir la respuesta al estrés (Adam y Epel 2007). Este punto podría ser también importante para la retroalimentación de los glucocorticoides en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HPA) dependiendo de algunos aspectos del balance energético. Por lo tanto, cualquier cosa que altere el equilibrio de energía, ya sea antes, durante o después del estrés, podría también alterar la fisiología del HPA y otros sitios sensibles a glucocorticoides en el sistema nervioso central.

A pesar de que las respuestas metabólicas y endocrinas al estrés crónico en ratas alimentadas con una dieta alta en sacarosa son conocidas, los efectos sobre la función hepática no se han estudiado de forma sistemática (Bell y cols. 2002). El estrés incrementa la actividad de la enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (11 $\beta$ -HSD1) en el hígado, modulando el equilibrio entre la corticosterona y la cortisona mediante un mecanismo redox (Altuna y cols. 2006; Vasiljevic y cols. 2014) y el incremento de la concentración de glucocorticoides activos (Stimson y Walker 2007; London y Castonguay 2009). De hecho, la inducción de estrés por pocas horas puede aumentar la actividad hepática de la 11 $\beta$ -HSD1 por una concentración elevada de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) y un pH bajo, asociado con condiciones de glucólisis anaeróbica presentes durante situaciones de estrés (Altuna y cols. 2006). En este caso, el NADPH actúa como un cofactor de la 11 $\beta$ -HSD1, mientras que un pH bajo favorece su acción reductasa; ambos eventos aumentarán la acción catalítica para la conversión de glucocorticoides inactivos a activos (Brown y cols. 1993). Otros estudios, realizados en humanos y modelos animales, han reportado la interacción entre la dieta y la desregulación específica de glucocorticoides en tejidos observadas en la obesidad resultado de alteraciones en la 11 $\beta$ -HSD1 (London y Castonguay 2009; Kim y Choi 2013).

Nuestros resultados también muestran que el estrés crónico en ratas jóvenes conduce al desarrollo de esteatosis, inflamación y abalonamiento hepatocelular. Aunque, el grado de esteatosis coincidió con una disminución en el grado de inflamación en el grupo E+A30, esto no disminuyó el grado de abalonamiento hepatocelular. La acumulación de gotas de grasa en hepatocitos balonzados incluye anomalías del citoesqueleto (Hanada y cols. 2005, Albano y cols. 2005, Ji y Kaplowitz 2006, Puri y cols. 2008). De hecho, cada uno de estas características histológicas mostraron correlación independiente (Kleiner y cols. 2005). Además, el contenido

de grasa dentro de los hepatocitos balanceados en lugar de la del contenido total de grasa podría explicar la falta de correlación entre la esteatosis y hepatocitos balanceados (Chalasani y cols. 2008). Como lo es mostrado por nuestros resultados el efecto de ambos factores, el estrés y la sacarosa disminuyen el contenido de triglicéridos (TAG) hepáticos y los niveles elevados de corticosterona sérica asociados con la reducción de esteatosis.

El consumo de energía en la infancia y la adolescencia temprana es asociada con marcadores de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHNA) (Anderson y cols. 2015) y una alta cantidad de grasa en el hígado que pueden causar la sobreproducción de glucosa y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en humanos (Adiels y cols. 2006). El estrés crónico eleva el contenido hepático de VLDL e induce un alto grado de esteatosis acompañada de un aumento de la expresión de la proteína C reactiva en el hígado de ratas adultas alimentadas con una dieta alta en grasa y azúcar (Fu y cols. 2010; Han y cols. 2014). Además, la administración de dexametasona en ratas adultas alimentadas con una dieta alta en sacarosa aumenta la cantidad de TAG, ácidos grasos no esterificados y glicerol en hígado mientras que inhibe la hidrólisis de TAG por la lipoproteína lipasa (Franco-colín y cols. 2000). En contraste, el estrés crónico aminora la ganancia de peso, la hiperglucemia y la lesión hepatocelular inducida por una dieta alta en grasa o sacarosa en roedores adultos (Macedo y cols. 2012; Czech y cols. 2013; Packard y cols. 2014).

Aunque el estrés y la dieta por sí mismos aumentan la expresión de 3-NTyr en hígado, un claro efecto sinérgico se observó por la combinación de ambos factores. El estrés crónico en ratones aumenta la expresión hepática de moléculas inflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) y la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) (Czech y cols. 2013). Además, la esteatosis hepática en ratones alimentados con una dieta alta en grasa es asociada con una alta producción de especies reactivas de nitrógeno vinculados a alteraciones mitocondriales (Mantena y cols. 2009). Particularmente, el estrés puede inducir la desregulación del eje HPA aumentando la vulnerabilidad hacia trastornos metabólicos, incluyendo resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2 y la hiperlipidemia (Maniam y cols. 2009). Los glucocorticoides inducen estrés oxidativo en el hígado durante la respuesta adaptativa al estrés crónico físico y psicológico (Zafir y Banu 2009). El consumo de sacarosa también induce estrés

oxidativo en el hígado (Blouet y cols. 2007). Alteraciones metabólicas en los hígados de ratas Zucker son también asociados con el incremento de los niveles de estrés oxidativo, lo que afecta el metabolismo redox y que conduce a disfunciones mitocondriales (Raza y cols. 2015).

Nuestros resultados muestran que la ingesta de sacarosa reduce el nivel de corticosterona sérica, la actividad hepática de la  $11\beta$ -HSD1, la esteatosis hepática, y los niveles TAG hepáticos inducidos por el estrés crónico, pero potencia el estrés oxidativo. Esto sugiere que el período pre-puberal constituye una ventana crítica para las intervenciones estresantes durante el desarrollo, probablemente conduce a alteraciones durante la edad adulta que puede ser más pronunciadas cuando se presentó una malnutrición. Por ello es posible que la exposición al estrés puede ser un factor de riesgo para sufrir complicaciones metabólicas (por ejemplo, hígado graso) en niños. Nuestro estudio es relevante para el logro de una mejor comprensión acerca de los eventos de la vida temprana que podrían influir en el desarrollo y el metabolismo en el futuro, permitiendo así medidas preventivas durante la infancia para reducir la vulnerabilidad a los trastornos relacionados con el estrés al alcanzar la edad adulta.

## **8.2 Segundo mes**

Continuando con esta investigación hemos observado que el consumo de sacarosa durante dos meses tampoco afecta la ganancia de peso corporal. Estos resultados son similares a otros estudios realizados en roedores, en los que la ingesta elevada de sacarosa no afecta la ganancia de peso en el periodo inmediato al destete (El Hafidi y cols. 2001; 2004; 2006; Gao y cols. 2013; Díaz-Aguila y cols. 2015; Corona-Pérez y cols. 2015) aunque promueve la ganancia de peso corporal durante el periodo post-pubertad (Velkoska y cols. 2008; Rodríguez y cols. 2009; Fuente-Martín y cols. 2012). Sin embargo, el consumo de alimento disminuye por la dieta. Estos resultados son consistentes con otros estudios con una dieta alta en carbohidratos (El Hafidi y cols. 2001; 2004; 2006; Gao y cols. 2013; Díaz-Aguila y cols. 2015; Corona-Pérez y cols. 2015). Al respecto, se ha sugerido que las ratas, primero sacian su sed y posteriormente su hambre, obteniendo mayor ingesta calórica por el consumo de sacarosa contenida en el agua, por lo cual experimentan saciedad y comen menos (González 2011), cabe mencionar que los animales tienen una preferencia por las bebidas dulces (Martínez-Moreno y cols. 2009; Krolow y cols.

2013; Corona-Pérez y cols. 2015). En apoyo a ello, no hemos encontrado diferencias en el índice de adiposidad, probablemente por la regulación en la ingesta de alimento dependiendo del tipo de bebida (Martínez-Moreno y cols. 2009). En contraste con ratas macho jóvenes, el consumo de sacarosa aumenta la acumulación de grasa visceral en ratas adultas (El Hafidi y cols. 2001; El Hafidi y cols. 2004; Alexander y cols. 2004; Díaz-Aguila y cols. 2015; Cervantes-Rodríguez y cols. 2014).

Por otro lado, el estrés disminuye el peso corporal. Distintos resultados han sido encontrados en otros modelos de estrés. Debido a que la inducción de estrés en roedores jóvenes no modifica el peso corporal (Bruder-Nascimento y cols. 2013; Arcego y cols. 2014; Corona-Pérez y cols. 2015), mientras que en animales adultos el peso aumenta (Bartolomucci y cols. 2009; Sakakibara y cols. 2012) o disminuye (Ricart-Jané y cols. 2002; Bartolomucci y cols. 2009; Macedo y cols. 2012; de Oliveira y cols. 2014). Por lo que, es posible que la edad del animal modifique su respuesta ante el estrés (Doremus-Fitzwater y cols. 2009). Además, el estrés puede inducir un efecto catabólico o anabólico que se verá reflejado en la ganancia de peso corporal, ingesta de alimentos y el contenido de grasa, que dependerán de la duración y frecuencia del estresor (Michel y cols. 2005). En humanos, aproximadamente el 30% de la población sometida a estrés disminuye la ingesta de alimento y peso corporal (Epel y cols. 2004). Estudios en humanos y modelos animales han mostrado que el estrés puede llevar a un incremento y muchas veces a la disminución en la ingestión de alimento (Lo Sauro y cols. 2008; Block y cols. 2009). A pesar de estas modificaciones en los parámetros alimenticios no se modificó el índice de adiposidad. Similar a lo que ocurre en los animales jóvenes que son sometidos a estrés crónico durante 4 semanas (Corona-Pérez y cols. 2015).

No encontramos cambios en el peso del hígado. Por lo que se ha reportado, no necesariamente debe afectarse el peso del órgano para inducir un daño en el mismo ya sea durante la edad adulta (Kawasaki y cols. 2009; Fu y cols. 2010) o en la edad infante (Corona-Pérez y cols. 2015). Estudios realizados con dietas altas en grasa y carbohidratos muestran un aumento de triglicéridos en hígado (Fu y cols. 2010) y por otro lado el estrés (Corona-Pérez y cols. 2015). Claro, si la dieta es prolongada por supuesto induce un mayor daño hepático (Roncal-Jiménez y cols. 2011). Debido a que una dieta alta en carbohidratos incrementa la

lipogénesis de *novo* hepática (Scorletti y cols. 2011). En apoyo a ello, en nuestro modelo la dieta promovió un aumento de los niveles de triglicéridos hepáticos acompañado de un desarreglo de los cordones hepáticos y un proceso inflamatorio en los grupos A30 y E+A30. Así, los hepatocitos con grasa se hacen más grandes de aspecto globoso que ocasiona una distorsión sinusoidal, reduciendo el volumen y el flujo sanguíneo intrasinusoidal microvascular junto a la participación de otros tipos de células (células endoteliales sinusoidales y reclutamiento de células inflamatorias) que conducen a una desregulación del flujo sanguíneo microvascular y una disminución en el número de sinusoides perfundidos (Farrell y cols. 2008). A este respecto se ha sugerido que el acumulo de lípidos en tejido hepático puede modular la actividad biológica de las células de Kupffer en la enfermedad del hígado graso no alcohólico a través de varios de mecanismos (Baffy 2009; Tiniakos y cols. 2010). En apoyo a ello, nuestros datos muestran mayor peroxidación de lípidos en el hígado del grupo estresado. Estos datos son similares a lo ocurrido en animales infantes donde el estrés crónico promueve el desarrollo de estrés oxidativo (Corona-Pérez y cols. 2015). Es posible que la presencia de células del sistema inmune sean las responsables del estrés oxidativo en estos roedores (Uetake y cols. 2015). Además, los glucocorticoides también pueden inducir estrés oxidativo hepático durante la respuesta adaptativa al estrés (Zafir y Banu 2009). Contrario a otros trabajos realizados en ratas macho adultas con dietas ricas en sacarosa donde se observa la presencia de estrés oxidativo en hígado (Ruiz-Ramírez y cols. 2011), nuestros animales que consumieron sacarosa no presentaron aumento de TBARS, es posible que el aumento en los Dienos Conjugados presentes en el grupo A30 estén modulando la formación de malondialdehído en hígado (Luna-Moreno y cols. 2007).

El consumo de sacarosa al 30% no altera la corticosterona sérica y bloquea el efecto hipercortisolémico causado por el estrés crónico (Corona-Pérez y cols. 2015). La ingesta de dietas ricas en carbohidratos reduce la respuesta del eje al estrés (Arcego y cols. 2014). En nuestro modelo, el estrés crónico por restricción no elevó los niveles de corticosterona sérica. Datos similares son reportados en roedores adultos, donde el estrés crónico no altera los niveles de corticosterona sérica (Ricart-Jané y cols. 2002; Macedo y cols. 2012). Cabe resaltar que, en ratas la función del eje en edad juvenil es diferente comparada con la adulta y la habituación a estresores es menos eficiente (Doremus-Fitzwater y cols. 2009; Macedo y cols. 2012; Ricart-

Jané y cols. 2002; Arcego y cols. 2014). También es probable que alteraciones ocurridas en la zona fascicular de ambas glándulas donde se secretan los glucocorticoides promovidas por el estrés crónico altere la síntesis en los niveles de corticosterona (Díaz-Aguila y cols. 2015). Por otra parte, podría ser el resultado de un metabolismo alterado o un aumento en la captación de corticosterona por los tejidos periféricos (Martínez-Calejman y cols. 2012). Estudios recientes en humanos y roedores sugieren un papel importante de los órganos, más que los niveles de glucocorticoides en plasma en el desarrollo del síndrome metabólico intracelular a través de la reactivación de esteroides circulantes a través de la  $11\beta$ -HSD1 regulados por la dieta, género y hormonas (Paterson y cols. 2004). En nuestro estudio, el estrés crónico promovió el aumento de la actividad de la  $11\beta$ -HSD1 en hígado (Corona-Pérez y cols. 2015), se ha mostrado que su sobreexpresión puede normalizar la actividad del eje HPA ante una respuesta al estrés (Maniam y cols. 2014). Estas observaciones son similares a las que se encuentran en pacientes obesos, donde se encuentran niveles normales e incluso bajos de los glucocorticoides (Björntorp y Rosmond 2000; Stewart y Tomlinson 2002), sin embargo, se encuentra un incremento de los niveles de la  $11\beta$ -HSD1 en órganos como tejido adiposo e hígado (Kotelevtsev y cols. 1997; Staab y Maser 2010; Fernández-Vázquez y cols. 2011).

Con nuestros resultados estamos comprobando que tanto la corticosterona como los niveles de triglicéridos fueron afectados por la dieta alta en sacarosa pero no por el estrés. Es importante resaltar que el tiempo de consumo de sacarosa, es fundamental para provocar modificaciones histológicas y alteraciones funcionales en el hígado. Entonces, nuestros datos muestran que la acumulación de triglicéridos hepáticos promovidos por la ingesta de una dieta alta en sacarosa durante la edad juvenil no está asociado con los altos niveles de corticosterona,  $11\beta$ -HSD1 ni acumulación de tejido adiposo.

### **8.3 Tercer mes**

Como último punto de nuestra investigación encontramos que el consumo de sacarosa durante tres meses no afecta el peso corporal. A pesar de que estos animales disminuyen el consumo de alimento y su ingesta de agua es similar a los animales control, su aporte calórico total es mayor. Estos resultados son consistentes con otros estudios donde evalúan el efecto de una dieta alta en

carbohidratos durante la edad adulta (El Hafidi y cols. 2001, 2004, 2006, Gao y cols. 2012, Díaz-Aguila y cols. 2016). Al respecto se ha sugerido que la preferencia de los animales por el sabor dulce es innata y tienen a capacidad de modificar el tamaño y número de sus comidas ante modificaciones en el contenido calórico de sus dietas (Martínez-Moreno y cols. 2009). En apoyo a ello encontramos que el consumo de sacarosa promueve un mayor aumento del índice de adiposidad (Cervantes-Rodríguez y cols. 2014, Díaz-Aguila y cols. 2016). Sin embargo, no podemos considerarlas ratas obesas ya que no encontramos diferencias en el peso corporal. Aunque London y cols. (2007) consideran en su estudio que la rata obesa, es aquella que presenta mayor cantidad de tejido adiposo. Un dato interesante es que los animales a los que se les proporciona una dieta palatable disminuyen su actividad locomotora (Lalanza y cols. 2014), por lo que, es posible que el aumento de la ingesta calórica pueda estarse almacenando en mayor cantidad en masa grasa que en masa magra en la composición corporal. Sin embargo, no encontramos modificaciones en los niveles de glucosa sérica. Estas observaciones son semejantes a las descritas previamente en ratas adultas (El Hafidi y cols. 2001, Alexander y cols. 2004, Pérez-Torres y cols. 2009, Cervantes-Rodríguez y cols. 2014, Díaz-Aguila y cols. 2016).

Por otro lado, el estrés durante la edad adulta tampoco modifica el peso corporal. Similar a lo reportado por otros autores donde inducen estrés crónico desde el destete hasta la edad adulta (Bruder-Nascimento y cols. 2013). Por otra parte, el estrés crónico disminuyó el consumo de alimento y la ingesta de agua, sin afectar la ingesta calórica. Estudios en modelos animales revelan que el estrés puede afectar de manera diversa la ingesta de alimentos (Kopelman 2000; Michel y cols. 2003; Adam y Epel 2007), promoviendo la inhibición de la ingesta (Zeeni y cols. 2013). La aplicación crónica de un estresor induce habituación en roedores llevando a una disminución de la respuesta fisiológica y de conducta ante el estresor incluyendo atenuada hipofagia inducida por el estrés (Zeeni y cols. 2013). Al respecto se ha sugerido que la ingesta de alimento y el peso corporal son marcadores del grado de severidad del modelo de estrés (Adam y Epel 2007). Respecto a nuestros resultados es posible que el estrés no haya sido suficientemente severo para provocar cambios en el peso corporal o que se deba a una respuesta adaptativa, conforme a lo encontrado en animales adultos sometidos a estrés (Doremus-Fitzwater y cols. 2009; Macedo y cols. 2012; Ricart-Jané y cols. 2002; Arcego y cols. 2014). En

apoyo a lo anterior, no se modificó el índice de adiposidad, similar a lo reportado por otros autores (Macedo y cols. 2012; Bruder-Nascimento y cols. 2013; Corona-Pérez y cols. 2015). Un dato interesante fue que el estrés crónico fue capaz de revertir los efectos del consumo de sacarosa. Estudios previos han mostrado que el estrés crónico disminuye el índice de adiposidad promovido por la ingesta de una dieta hipercalórica, sugiriendo que el estrés crónico previene la aparición de la obesidad (Michel y cols. 2005; Bruder-Nascimento y cols. 2013).

En cuanto al peso del hígado no encontramos modificaciones por el consumo de sacarosa ni por el estrés. Esto concuerda con lo reportado por otros autores (Kawasaki y cols. 2009; Fu y cols. 2010; Corona-Pérez y cols. 2015). Sin embargo, el consumo de sacarosa promovió una mayor acumulación de grasa y triglicéridos hepáticos. Estos resultados son similares con otros estudios donde proporcionan sacarosa durante la edad adulta promoviendo la aparición de indicadores del síndrome metabólico (Huang y cols. 2007, Alkohuri y cols. 2010, Cervantes-Rodríguez y cols. 2014, Díaz-Aguila y cols. 2016), asociado a la enfermedad del hígado graso no alcohólico (Ahmed y cols. 2012). Ya que es bien sabido que la hiperinsulinemia causa hipertrigliceridemia e hígado graso (Möller y cols. 1991). Nosotros sugerimos que las alteraciones metabólicas que encontramos durante el tercer mes de consumo de sacarosa (concentraciones elevadas de triglicéridos y VLDL) (Díaz-Aguila y cols. 2016) podrían ser la causa de la acumulación de grasa hepática. Debido a que el aumento del consumo de calorías provenientes de la sacarosa, llevo al incremento de tejido adiposo y la resistencia a la insulina (Díaz-Aguila 2016), la cual no inhibe adecuadamente la lipasa sensible a hormonas (LSH) y la lipólisis en tejido adiposo se ve afectada aumentando la movilización de ácidos grasos (Adams y cols. 2005; Arthur y Mccollough 2006; Nseir y cols. 2010), por lo que el hígado capta la mayor cantidad de glucosa y ácidos grasos que promueven la lipogénesis hepática de *novo* con el subsecuente aumento del flujo de lipoproteínas (principalmente VLDL). Mientras que, el aumento de ácidos grasos libres en circulación son reesterificados en forma de triglicéridos dentro del hígado y almacenados en forma de vesículas de lípidos dentro de los hepatocitos desarrollando esteatosis hepática (Postic y Girard 2008; Tniakos y cols. 2010; Nader y cols. 2012). En apoyo a ello, se ha mostrado que una dieta alta en carbohidratos es capaz de aumentar la expresión de mRNA del ácido graso sintasa (FAS, por sus siglas en ingles), ATP citrato liasa

(ACL) y la disminución del enoil coahidratasa (ECoAH) enzimas que tienen que ver con la síntesis y oxidación de los ácidos grasos (Roncal-Jiménez y cols. 2011). También es posible que el aumento de insulina y glucosa estén estimulando la expresión de SREBP-1c (sterol regulatory element-binding protein 1c, por sus siglas en inglés) y de ChREPB (carbohydrate response element-binding protein, por sus siglas en inglés) respectivamente, estimulando el receptor X del hígado (LXR) que promueve la expresión de genes codificantes de proteínas lipogénicas (Cha y Repa 2007, Higuchi y cols. 2008). Mientras que, el estrés revierte el efecto del consumo de sacarosa sobre la histología del hígado, contrario a lo reportado por otros autores donde una dieta hipercalórica (grasa + carbohidratos) combinada con el estrés crónico agravan los signos de NAFLD (Fu y cols.2010).

Por otro lado, el estrés crónico promovió la acumulación de glucógeno hepático. Nuestros resultados difieren a lo reportado por otros autores donde el estrés crónico disminuye la cantidad de glucógeno hepático (Altuna y cols. 2006). Una posible explicación a nuestros resultados es que el incremento de glucógeno sea una consecuencia de la conservación de energía debido al incremento de la gluconeogénesis y glicólisis en respuesta a la reducción en la disponibilidad de algún nutriente (Vo y cols. 2013). En apoyo a ello se ha mostrado que el ayuno parcial prolongado seguido por una realimentación promueve un dramático incremento en el almacén de glucógeno en tejido adiposo (Carmean y cols. 2013), similar a la disminución de alimento encontrada en nuestro modelo. Por otro lado, la respuesta al estrés también incluye la activación del sistema nervioso simpatoadrenomedular (SAM) y la liberación de catecolaminas (Chrousos 2000, Carrasco y Van de Kar 2003), que desafortunadamente no medimos en este estudio, lo que estaría promoviendo una actividad lipolítica en tejido adiposo y la consiguiente liberación de ácidos grasos y glicerol para la glucogeneogénesis hepática (Langin 2006; Kolditz y Langin 2010). Sin embargo, a pesar de no encontrar cambios en el contenido de tejido adiposo si encontramos una disminución en el tamaño de los adipocitos (datos no mostrados). Es posible que en el grupo E + A30 esté acumulando glucógeno debido a la disminución en la ingesta de un nutriente o que a pesar de haber un mayor consumo calórico los animales que se encuentran bajo estrés estén gastando el exceso calórico y el organismo esta almacenando el poco excedente en forma de glucógeno y triglicéridos en hígado y tejido

adiposo, respectivamente. Existe la posibilidad de que el organismo a esta edad adquiriera un equilibrio entre el almacén de glucógeno y grasa, ya que es bien sabido que los niveles de glucógeno después de cierto periodo disminuyen, promoviendo una conexión metabólica entre la glucogenólisis y síntesis de lípidos (Carmean y cols. 2013).

Respecto al número de células inmunes dentro de los sinusoides no encontramos diferencias. Similar a lo reportado por otros autores (Rodríguez-Castelán y cols. 2016), que sugieren que debido a que todos los tipos de células inmunes son contabilizadas, algunos tipos pueden incrementar mientras que otros disminuyen equilibrando el número de células inmunes (Vonghia and Francque 2015). En apoyo a ello evidenciamos la presencia de mastocitos en el grupo E mientras que, en los grupos C, A30 y E + A30 fue ausente. Estudios realizados en la ontogenia de mastocitos muestran que el microambiente controla su expresión fenotípica, por lo que algunos mediadores de mastocitos pueden generar citotoxicidad en otros tipos celulares generando estrés oxidativo (Befus y cols. 1988; Seifried y cols. 2007). Aunque, es posible que el aumento de la actividad enzimática favorezca el estado pro-oxidante a nivel de los Dienes Conjugados, por lo cual se ve disminuido los niveles de TBARS y proteínas carbonilo en el grupo E (Luna-Moreno y cols. 2007, Corona-Pérez y cols. En proceso). Por otro lado, el consumo de sacarosa disminuyó el estrés oxidativo. Al respecto se ha sugerido que la dieta es capaz de promover cambios hormonales que llevan a la activación de una variedad de enzimas metabólicas. De manera particular, se ha mostrado que una dieta alta en carbohidratos es capaz de promover una defensa antioxidante hepática a través del aumento de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y NADPH que es la coenzima reducida del glutatión peroxidasa y es requerido para la estabilidad de la catalasa disminuyendo así la peroxidación de lípidos (Spolaris y Meyenhofer, 2000). Contrario a lo reportado por otros autores, donde la ingesta de carbohidratos por un largo periodo induce estrés oxidativo hepático (Ruiz-Ramírez y cols. 2011). Concluyendo que el estrés oxidativo es el resultado de cambios metabólicos, hormonales y nutricionales complejos a largo plazo (Spolaris y Meyenhofer, 2000).

Por otro lado, el consumo de sacarosa ni el estrés modificaron las concentraciones séricas de corticosterona. Datos similares son reportados en roedores adultos, donde el estrés crónico no altera los niveles de corticosterona sérica (Ricart-Jané y cols. 2002; Macedo y cols. 2012).

Estudios realizados en roedores sometidos a estrés por restricción muestran una mayor liberación de corticosterona en animales jóvenes vs adultos, en apoyo a ello mostraron que el aumento de corticosterona en animales adultos ya no es significativo después de 14 días de restricción, indicando una habituación al agente estresor (Sadler y Bailey 2016). Por otro lado, en cuanto al grupo azucarado, trabajos previos han mostrado que el consumo de sacarosa en ratas adultas no modifica la concentración sérica de corticosterona (Díaz-Aguila y cols. 2016). La evidencia sugiere que el tipo y disponibilidad de alimentos pueden influir en la respuesta de la corticosterona (Zeeni y cols. 2013). Otro posible mecanismo puede estar dando a través de la regulación hormonal de la leptina y la insulina que se encuentran aumentadas en el grupo A30 (Díaz-Aguila y cols. 2016).

Agregado a lo anterior, no encontramos cambios en la actividad enzimática de la  $11\beta$  HSD1. Contrario a lo observado en ratas adultas jóvenes donde el estrés crónico aumenta la actividad de esta enzima (Corona-Pérez y cols. 2015). Debido a que la enzima  $11\beta$ -HSD1 modula el equilibrio entre corticosterona y la cortisona (Altuna y cols. 2006; Vasiljevic y cols. 2014) es posible que al haber una adaptación y el hecho de que la sacarosa revierta los efectos del estrés no hubo modificaciones en la actividad enzimática. Además de que se ha mostrado que su sobreexpresión puede normalizar la actividad del eje HPA ante una respuesta al estrés (Maniam y cols. 2014).

## 9. CONCLUSIONES

Con nuestros resultados estamos mostrando la presencia de esteatosis hepática asociada a los altos niveles de corticosterona y de  $11\beta$  HSD-1 en ratas macho jóvenes. Contrario a lo observado en ratas adultas con un consumo prolongado de sacarosa y estrés crónico donde los mecanismos de respuesta son distintos según la edad. A diferencia de lo mostrado en ratas infantiles, es necesario aplicar un tipo de estrés más intenso en edades adultas que nos permita mantener elevados los niveles de corticosterona y asociarlos con el desarrollo de esteatosis hepática. Por otro lado, mostramos que la corticosterona no es un factor indispensable en el desarrollo de esteatosis hepática. Sin embargo, el tiempo de consumo de sacarosa es un factor importante para promover los hallazgos encontrados. Por lo anterior, estos resultados nos siguen manteniendo a la expectativa en relación a si los glucocorticoides y el consumo de sacarosa potencian el desarrollo de esteatosis hepática.

## 10. PERSPECTIVAS

En relación a nuestros resultados, sería interesante hacer uso de un tipo de estrés crónico más intenso que nos permita mantener elevados los niveles de corticosterona en los animales adultos y poder esclarecer la asociación entre glucocorticoides e hígado graso no alcohólico.

La administración de la enzima  $11\beta$ -HSD-1 o glucocorticoides de manera sintética en conjunto con la dieta alta en sacarosa sería interesante para analizar la participación de cada uno de los componentes en el desarrollo del hígado graso.

Por otra parte, el estudio de la biología molecular en cuanto a la regulación y expresión de genes asociados a la respuesta del estrés y la dieta son un punto importante que queda por estudiar y que permitirán conocer más a fondo sobre los mecanismos reguladores de la enfermedad del hígado graso no alcohólico dentro de los que podemos mencionar la expresión de proteínas reguladoras de la síntesis de triglicéridos hepáticas como la SREBP-1c y ChREBP. Sumado a lo anterior, el estudio de la distribución celular de los receptores a glucocorticoides y la actividad de la hexosa-6-fosfato deshidrogenada (H6PDH) a nivel hepático también serían importantes en el estudio de los mecanismos involucrados en el desarrollo del hígado graso no alcohólico en relación al consumo de sacarosa y estrés crónico.

## 11. REFERENCIAS

1. Adam TC y Epel ES. 2007. Stress, eating and reward system. *Physiology & Behavior* 91: 449-458.
2. Adams LA, Angulo P y Lindor KD. 2005. Nonalcoholic fatty liver disease. *Canadian Medical Association Journal* 172: 899-905.
3. Adiels M, Taskinen MR, Packard C, Caslake MJ, Soro-Paavonen A, Westerbacka J, Vehkavaara S, Häkkinen A, Olofsson SO, Yki-Järvinen H, Borén J. 2006. Overproduction of large VLDL particles is driven by increased liver fat content in man. *Diabetologia* 49:755–765.
4. Agius L. 2013. High-carbohydrate diets induce hepatic insulin resistance to protect the liver from substrate overload. *Biochemical Pharmacology* 85: 306-312.
5. Ahmed A, Rabbitt E, Brady T, Brown C, Guest P, Bujalska IJ, Doig C, Newsome PN, Hubscher S, Elias E, Adams DH, Tomlinson JW y Stewart PM. 2012. A switch in hepatic cortisol metabolism across the spectrum of non alcoholic fatty liver disease. *PLoS One*,7: e29531.
6. Alexander AA, Hernández DG, Lara BM, Angulo GO y Oliart RR. 2004. Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids and tumor necrosis factor-  $\alpha$  in rats with sucrose-induced metabolic syndrome. *Journal of Nutrition Biochemical* 15: 350-357.
7. Alkhoury N, Gornicka A, Berk MP, Thapaliya S, Dixon LJ, Kashyap S, Schauer PR y Feldstein AE. 2010. Adipocyte apoptosis a link between obesity, insulin resistance and hepatic steatosis. *Journal of Biological Chemistry* 285: 3428-3438.
8. Altuna ME, Lelli SM, San Martín de Viale LC y Damasco MC. 2006. Effect of stress on hepatic  $11\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity and its influence on carbohydrate metabolism. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 84: 977-984.
9. Anderson EL, Howe LD, Fraser A, Macdonald-Wallis C, Callaway MP, Sattar N, Day C, Tilling K, Lawlor DA. 2015. Childhood energy intake is associated with nonalcoholic fatty liver disease in adolescents. *The Journal of nutrition* 145:983–989.
10. Arcego DM, Krolow R, Lampert C, Noschang C, Pettenuzzo LF, Marcolin ML, Toniazzi AP y Damaz C. 2013. Stress During the pre-puberal period leads to long-term diet-

- dependent changes in anxiety- like behavior and in oxidative stress parameters in male adult rats. *Neurochemical Research* 38:1791–1800
11. Arcego DM, Krolow R, Lampert C, Noschang C, Ferreira AG, Scherer E, Wyse AT y Dalmaz C. 2014. Isolation during the prepuberal period associated with chronic access to palatable diets: effects on plasma lipid profile and liver oxidative stress. *Physiology & Behavior* 124: 23–32.
  12. Arnaldi G, Scandali VM, Trementino L, Cardinaletti M, Appolloni G y Boscaro M. 2010. Pathophysiology of dyslipidemia in Cushing's syndrome. *Neuroendocrinology* 92: 86-90.
  13. Arthur J y Mccollough D. 2006. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. *Journal of Clinical Gastroenterology* 40: 17-29.
  14. Bacon B, Park C, Fowell E y McLaren C. 1984. Hepatic steatosis in rat fed diets with varying concentrations of sucrose. *Fundamental and applied toxicology: Official journal of the Society of Toxicology* 4: 819-826.
  15. Baffy G. 2009. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: the emerging view. *Journal of hepatology* 51: 212-223.
  16. Barquera S, Hernández-Barrera L, Tolentino ML, Espinoza J, Ng SW, Rivera JA y Popkin BM. 2008. Energy intake from beverages is increasing among Mexican adolescents and adults. *Journal Nutrition* 138: 2454-2461.
  17. Bartolomucci A, Cabassi A, Govoni P, Ceresini G, Cero C, Berra D, Dadomo H, Franceschini P, Dell'Ómo G, Parmigiani S y Palanza P. 2009. Metabolic consequences and vulnerability to diet-induced obesity in male mice under chronic social stress. *Plos One* 4: 1-12.
  18. Befus D, Fujimaki H, Lee TDG y Swieter M. 1988. Mast cell polymorphisms. *Digestive diseases and sciences* 33: 16S-24S.
  19. Bell ME, Bhargava A, Soriano L, Laugero K, Akana SF y Dallman MF. 2002. Sucrose intake and corticosterone interact with cold to modulate ingestive behavior, energy balance, autonomic outflow and neuroendocrine responses during chronic stress. *Journal of Neuroendocrinology* 14: 330-342.
  20. Bermúdez V, Bermúdez F, Arraiz N, Leal E, Linares S, Mengual E, Valdelamar L, Rodríguez M, Seyfi H, Amell A, Carrillo M, Silva C, Acosta A, Añez J, Andara C, Angulo

- V y Martins G. 2007. Biología molecular de los transportadores de glucosa: clasificación, estructura y distribución. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica* 26: 76-86.
21. Björntorp P. 1995. Liver triglycerides and metabolism. *International Journal of Obesity and related Metabolic Disorders* 19: 839-840.
22. Björntorp P. 2001. Do stress reactions cause abdominal obesity and comorbidities? *Obesity Reviews* 2: 73-86.
23. Björntorp P y Rosmond R. 2000. The metabolic syndrome—a neuroendocrine disorder? *British Journal of Nutrition* 83: S49-S57.
24. Block JP, He Y, Zaslavsky AM, Ding L, Ayanian JZ. 2009. Psychosocial stress and change in weight among US adults. *American journal of epidemiology* 170:181–192.
25. Blouet C, Mariotti F, Azzout-Marniche D, Mathé V, Mikogami T, Tomé D, Huneau JF. 2007. Dietary cysteine alleviates sucrose induced oxidative stress and insulin resistance. *Free Radiccal Biology & medicine* 42:1089–1097.
26. Brown R, Chapman K, Edwards C y Seckl J. 1993. Human placental 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: evidence for and partial purification of a distinct NAD-dependent isoform. *Endocrinology* 132: 2614-2621.
27. Bruder-Nascimento T, Campos DH, Alves C, Thomaz S, Cicogna AC y Cordellini S. 2013. Effects of chronic stress and high-fat diet on metabolic and nutritional parameters in Wistar rats. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* 57: 642-649.
28. Brunt EM. 2001. Nonalcoholic steatohepatitis: Definition, pathology. *Seminars in Liver Disease* 21: 3-16.
29. Brunt EM. 2007. Pathology of fatty liver disease. *Modern Pathology* 20: S40–S48.
30. Burt D, Mutton A y Day P. 1998. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Seminars in Diagnostic Pathology* 15: 246-258.
31. Carmean CM, Bobe AM, Justin CY, Volden PA y Brady MJ. 2013. Refeeding-induced brown adipose tissue glycogen hyper-accumulation in mice is mediated by insulin and catecholamines. *PloS One* 8: e67807.
32. Carrasco GA, Van de Kar LD. 2003. Neuroendocrine pharmacology of stress. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *European Journal of Pharmacology* 463:235-272.

33. Cassutto H, Olswang Y, Livoff A, Nechushtan H, Hanson R y Reshef L. 1997. Involvement of HNF-1 in the regulation of phosphoenolpyruvate carboxikinase gene expression in the kidney *FEBS Letters* 412: 597-602.
34. Cervantes-Rodríguez M, Martínez-Gómez M, Cuevas E, Nicolás L, Castelán F y Nathanielsz PW. 2014. Sugared water consumption by adult offspring of mothers fed a protein-restricted diet during pregnancy results in increased offspring adiposity: the second hit effect. *The British Journal of Nutrition* 111:616-624.
35. Cha JY y Repa JJ. 2007. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *The Journal of Biological Chemistry* 282: 743-751.
36. Chalasani N, Wilson L, Kleiner DE, Cummings OW, Brunt EM, Ünalp A, NASH Clinical Research Network. 2008. Relationship of steatosis grade and zonal location to histological features of steatohepatitis in adult patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Hepatology* 48: 829-834.
37. Chandramouli C, Yong S, Lam Y, Ton S y Khalid A. 2011. Glycyrrhizic acid improves lipid and glucose metabolism in high-sucrose-fed rats. *Journal of Endocrinology and Metabolism* 1: 125-41.
38. Charmandari E, Kino T, Souvatzoglou E, Chrousos GP. 2003. Pediatric stress: hormonal mediators and human development. *Hormone Research in Pediatrics* 59:161-179.
39. Chin S y Rona RJ. 2001. Prevalence and trends in overweight and obesity in three cross sectional studies of British Children, 1974-94. *British Medical Journal* 322: 24-26.
40. Chrousos P. 2000. The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuro-endocrine and target tissue-related causes. *International Journal of Obesity* 2: S50-55.
41. Chrousos P y Gold W. 1998. A healthy body in a healthy mind –and viceversa- the damaging power of “uncontrollable” stress. *Journal Clinical Endocrinology Metabolism* 83: 1842-1845.
42. Cole T, Wilcox H y Heimberg M. 1982. Effects of adrenalectomy and dexamethasone on hepatic lipid metabolism. *Journal of Lipid Research* 23: 81-91.

43. Corona-Pérez A. 2013. El consumo elevado de sacarosa a temprana edad disminuye la concentración de corticosterona e induce un daño hepático en ratas. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
44. Corona-Pérez A, Díaz-Muñoz M, Soto-Rodríguez I, Cuevas E, Martínez-Gómez M, Castelán F y Nicolás-Toledo L. 2015. High Sucrose Intake Ameliorates the Accumulation of Hepatic Triacylglycerol Promoted by Restraint Stress in Young Rats. *Lipids* 50, 1103-1113.
45. Czech B, Neumann ID, Müller M, Reber SO y Hellerbrand C. 2013. Effect of chronic psychosocial stress on nonalcoholic steatohepatitis in mice. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 6:1585-1593.
46. Czege I, Miklós C, Mandl J, Benedetti A, Karádi I, Bánhegyi G. 2012. G6PT-H6PDH-11 $\beta$ HSD1 triad in the liver and its implication in the pathomechanism of the metabolic syndrome. *World Journal of Hepatology* 4: 129-138.
47. Delaunay F, Khan A, Cintra A, Davani B, Ling Z, Andersson A, Claes-Göran O, Gustafsson J, Efendic S y Okret S. 1997. Pancreatic  $\beta$  cells are important targets for the diabetogenic effects of glucocorticoids. *Journal Clinical of Investigation* 100:2094-2098.
48. de Oliveira C, Scarabelot VL, de Souza A, de Oliveira CM, Medeiros LF, de Macedo IC y Torres IL. 2014. Obesity and chronic stress are able to desynchronize the temporal pattern of serum levels of leptin and triglycerides. *Peptides* 51: 46-53.
49. Devlin T. 2000. Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas. Editorial Reverté.
50. Díaz-Aguila Y. 2012. Efecto del consumo elevado de sacarosa sobre la concentración de corticosterona, indicadores metabólicos e histología de la glándula adrenal. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
51. Díaz-Aguila Y, Castelán F, Cuevas E, Zambrano E, Martínez-Gómez M, Muñoz A, Rodríguez-Antolín J, Nicolás-Toledo L. 2016. Consumption of sucrose from infancy increases the visceral fat accumulation, concentration of triglycerides, insulin and leptin, and generates abnormalities in the adrenal gland. *Anatomical science international*. 91: 151-162.

52. Djordjevic J, Djordjevic A, Adzic M, Niciforovic A y Radojic MB. 2010. Chronic stress differentially affects antioxidant enzymes and modifies the acute stress response in liver of Wistar rats. *Physiological Research* 59: 729-736.
53. Doremus-Fitzwater TL, Varlinskaya EI y Spear LP. 2009. Social and non-social anxiety in adolescent and adult rats after repeated restraint. *Physiology & behavior* 97:484-494.
54. Ducan SA. 2003. Mechanisms controlling early development of the liver. *Mechanisms of Development* 120: 19-33.
55. Dvorkin MA, Cardinali DP y Lermoli RH. 2010. Bases fisiológicas de la práctica médica. 1° Edición. Editorial Panamericana.
56. El Hafidi M, Cuellar A, Ramírez J y Baños G. 2001. Effect of sucrose addition to the drinking water, that induces hypertension in the rats on liver microsomal  $\Delta 9$  and  $\Delta 5$ -desaturase activity. *Journal of Nutrition Biochemical* 12: 65–71.
57. El Hafidi M, Pérez I, Zamora J, Soto V, Carvajal-Sandoval G y Baños G. 2004. Glycine intake decreases plasma free fatty acids, adipose cell size, and blood pressure in sucrose-fed rats. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 287: R1387–1393.
58. El Hafidi M, Pérez I, Carrillo S, Cardoso G, Zamora J, Chavira R. y Baños G. 2006. Effect of sex hormones on non-esterified fatty acids, intra-abdominal fat accumulation, and hypertension induced by sucrose diet in male rats. *Clinical and Experimental Hypertension* 28: 669-681.
59. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino (2016). Instituto Nacional de Salud Pública.
60. Epel E, Jimenez S, Brownell K, Stroud L, Stoney C, Niaura R. Are stress eaters at risk for the metabolic syndrome? *Annals of the New York Academy of Sciences* 1032: 208-210.
61. Esquivel-Solís V y Gómez-Salas G. 2007. Implicaciones metabólicas del consumo excesivo de fructosa. *Acta Médica Costarricense* 49:198-202.
62. Euromonitor I. (2011). Who drinks what: Identifying international drinks consumption trends. *Euromonitor International*. 1-101.
63. Farrell GC, Teoh NC y McCuskey RS. 2008. Hepatic microcirculation in fatty liver disease. *The Anatomical Record* 291: 684-692.

64. Fernández-Vázquez G, Torrecilla-García E y Rubio-Herrera MA. 2011. The metabolic síndrome as intrahepatocytic Cushing's síndrome. *Endocrinología y Nutrición* 58: 153-156.
65. Fernando H, Chin H, Ton S y Abdul Kadir K. 2013. Stress and its effects on glucose metabolism and 11 $\beta$ -HSD activities in rats fed on a combination of high-fat and high-sucrose diet with glycyrrhizic acid. *Journal of Diabetes Research* 1-19.
66. Fong G, Nehra V, Lindor K y Buchman L. 2000. Metabolic and nutritional considerations in nonalcoholic fatty liver. *Hepatology* 32: 3-10.
67. Fu JH, Sun HS, Wang Y, Zheng WQ, Shi ZY y Wang QJ. 2010. The effects of a fat- and sugar-enriched diet and chronic stress on nonalcoholic fatty liver disease in male Wistar rats. *Digestive Diseases and Sciences* 55:2227-2236.
68. Fortoul Van der Goes TI. 2010. Histología y biología celular. Editorial McGrawHill.
69. Francis H y Meininger CJ. 2010. A review of mast cells and liver disease: what have we learned?. *Digestive and Liver Disease* 42: 529-536.
70. Franco-Colin M, Tellez-Lopez AM, Quevedo-Corona L y Racotta R. 2000. Effects of long-term high-sucrose and dexamethasone on fat depots, liver fat, and lipid fuel fluxes through the retroperitoneal adipose tissue and splanchnic area in rats. *Metabolism* 49:1289-1294.
71. Fuente-Martín E, García-Cáceres C, Granado M, Sánchez-Garrido M, Tena-Sempere M, Frago L, Argente J y Chowen J. 2012. Early postnatal overnutrition increases adipose tissue accrual in response to a sucrose-enriched diet. *American Journal Physiological Endocrinology Metabolism* 302: E1586-1598.
72. Gao X, Zeng Y, Liu S, y Wang S. 2013. Acute stress show great influences on liver function and the expression of hepatic genes associated with lipid metabolism in rats. *Lipids in Health and Disease* 12: 118.
73. González J, Otero-Losada ME, Guerri-Guttenberg RA, Grana D y Milei J. 2011. Manifestaciones bioquímicas, ecocardiográficas y anatomopatológicas asociadas con el síndrome metabólico inducido por Coca-Cola en la rata. *Revista de la Federación Argentina de Cardiología* 40:143-151.
74. Grasa-Martínez M. 2004. Glucocorticoides y Obesidad. *Revista Española de Obesidad* 1:13-30.

75. Gómez-Chang E, Larrea F y Martínez-Montes F. 2012. Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 15:24-36.
76. Han Y, Lin M, Wang X, Guo K, Wang S y Sun M, Wang J, Han X, Fu T, Hu Y, Fu J. 2014. Basis of aggravated hepatic lipid metabolism by chronic stress in high-fat diet-fed rat. *Endocrine* [Epubahead of print].
77. Hanada S, Harada M, Kumemura H, Omary MB, Kawaguchi T, Taniguchi E, Koga H, Yoshida T, Maeyama M, Baba S, Ueno T, Sata M. 2005. Keratin-containing inclusions affect cell morphology and distribution of cytosolic cellular components. *Experimental Cell Research* 304:471–482.
78. Higuchi N, Kato M, Shundo Y, Tajiri H., Tanaka M., Yamashita N, Kohjima M, Koth K, Nakamuta M, Takayanaqi R y Enjoji M. 2008. Liver X receptor in cooperation with SREBP-1c is a major lipid synthesis regulator in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology Research* 38: 1122-1129.
79. Huang W, Dedousis N y O'Doherty RM. 2007. Hepatic steatosis and plasma dyslipidemia induced by a high-sucrose diet are corrected by an acute leptin infusion. *Journal of Applied Physiology* 102: 2260-2265.
80. Jacome-Sosa MM, Borthwick F, Mangat R, Uwiera R, Reaney MJ y Shen J, Quiroga AD, Jabos RL, Lehner R, Proctor SD. 2014. Diets enriched in trans-11 vaccenic acid alleviate ectopic lipid accumulation in a rat model of NAFLD and metabolic syndrome. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 25:692–701.
81. Jung J, Zheng M, Goldfarb M y Zaret KS. 1999. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* 284:1998-2003.
82. Kamara K, Eskay R y Castonguay T. 1998. High-fat diets and stress responsivity. *Physiology & Behavior* 64:1–6.
83. Kawasaki T, Igarashi K, Koeda T, Sugimoto K, Nakagawa K, Hayashi S, Yamaji R, Inui H, Fukusato T y Yamanouchi T. 2009. Rats fed fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis. *The Journal of Nutrition and Disease* 139: 2067-2071.

84. Kim JH, Choi JH. 2013. Pathophysiology and clinical characteristics of hypothalamic obesity in children and adolescents. *Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism* 18:161–167.
85. Kjaergaard M, Nilsson C, Rosendal A, Nielsen MO y Raun K. 2014. Maternal chocolate and sucrose soft drink intake induces hepatic steatosis in rat offspring associated with altered lipid gene expression profile. *Acta Physiologica (Oxford, England)* 210: 142-153.
86. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, UnalpArida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ, Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. 2005. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 41:1313–1321.
87. Klump KL, Burt SA, McGue M y IaconoWG. 2007. Changes in genetic and environmental influences on disordered eating across adolescence: a longitudinal twin study. *Archives of General Psychiatry* 64:1409–1415.
88. Kolditz CI y Langin D. 2010. Adipose tissue lipolysis. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 13: 377-381.
89. Kopelman PG.2000. Obesity as a medical problem. *Nature* 404:635-643
90. Kostelnik MJ y Whiren A. 2009. Desarrollo social de los niños. Ed. Delmar Cengage learning.
91. Kotelevtsev Y, Holmes MC, Burchell A, Houston PM, Schmoll D, Jamieson P y Mullins JJ. 1997. 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 14924-14929.
92. Kraemer FB, Khor VK, Shen WJ y Azhar S. 2013. Cholesterol ester droplets and steroidogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 371: 15-19.
93. Krolow R, Noschang C, Arcego DM, Huffell AP, Marcolin ML, Benitz AN, Lampert C, Fitarelli RD y Dalmaz C. 2013. Sex-specific effects of isolation stress and consumption of palatable diet during the prepubertal period on metabolic parameters. *Metabolism* 62:1268-1278.
94. Kyrou I, Chrousos GP y Tsigos C. 2006. Stress, visceral obesity, and metabolic complications. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1083: 77-110.

95. Lanza JF, Caimari A, Del Bas JM, Torregrosa D, Cigarroa I, Pallàs M, Capdevila L, Arola L y Escorihuela RM. 2014. Effects of a post-weaning cafeteria diet in young rats: metabolic syndrome, reduced activity and low anxiety-like behaviour. *PloS One* 9: e85049.
96. Langin D. 2006. Control of fatty acid and glycerol release in adipose tissue lipolysis. *Comptes rendus biologiques* 329: 598-607.
97. Laugero KD. 2001. A New Perspective on Glucocorticoid Feedback: Relation to Stress, Carbohydrate Feeding and Feeling Better. *Journal of Neuroendocrinology* 13:827-835.
98. Levin BE, Richard D, Michel C y Servatius R. 2000. Differential stress responsivity in diet-induced obese and resistant rats. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 279: R1357–1364.
99. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S y Stadtman ER. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology* 186: 464-478.
100. Liu YZ, Chen JK, Zhang Y, Wang X, Qu S y Jiang CL. 2014. Chronic stress induces steatohepatitis while decreases visceral fat mass in mice. *BMC Gastroenterology* doi: 10.1186/1471-230X-14-106.
101. London E y Castonguay TW. 2009. Diet and the role of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-1 on obesity. *Journal of Nutritional Biochemistry* 20:485-493.
102. London E, Lala G, Berger R, Panzenbeck A, Kohli AA, Renner M, Jackson A, Raynor T, Loya K y Castonguay TW. 2007. Sucrose access differentially modifies 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and hexose-6-phosphate dehydrogenase message in liver and adipose tissue in rats. *The Journal of Nutrition* 137:2616–2621.
103. Loria P, Lonardo A, Carulli L, Verrone AM, Ricchi M, Lonbardini S, Rudilloso A, Ballestri S y Carulli N. 2005. The metabolic síndrome and non-alcoholic fatty liver disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 22:31-36.
104. Lo Sauro C, Ravaldi C, Cabras PL, Faravelli y Ricca V. 2008. Stress, hypothalamic-pituitary-adrenal axis and eating disorders. *Neuropsychobiology* 57: 95-115.
105. Luna-Moreno D, Vázquez-Martínez O, Báez-Ruiz A, Ramírez J y Díaz-Muñoz M. 2007. Food restricted schedules promote differential lipoperoxidative activity in rat hepatic

- subcellular fractions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 146: 632-643.
106. Luna-Moreno D, García- Ayala B y Díaz-Muñoz M. 2012. Daytime restricted feeding modifies 24 h rhythmicity and subcellular distribution of liver glucocorticoid receptor and the urea cycle in rat liver. *British Journal of Nutrition* 108:2002-2013.
107. Macedo IC, Medeiros LF, Oliveira C, Oliveira CM, Rozisky JR, Scarabelot VL, Souza A, Silva FR, Santos VS, Cioato SG, Caumo W y Torres ILS. 2012. Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Peptides* 38: 189-196.
108. Macías-Rodríguez U y Torre A. 2009. Fisiopatología de la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). Un enfoque especial en la resistencia a la insulina. *Revista de Investigación Clínica* 61:161-172.
109. Maniam J, Antoniadis C y Morris MJ. 2014. Early-life stress, HPA axis adaptation, and mechanisms contributing to later health outcomes. *Frontiers in Endocrinology* doi:10.3389/fendo.2014.00073.
110. Mantena SK, Vaughn DP, Andringa KK, Eccleston HB, King AL, Abrams GA, Doeller JE, Kraus DW, Darley-Usmar VM y Bailey SM. 2009. High fat diet induces dysregulation of hepatic oxygen gradients and mitochondrial function in vivo. *The Biochemical Journal* 417: 183–193.
111. Manoli I, Alesci S, Blackman MR, Su YA, Rennert OM y Chrousos GP. 2007. Mitochondria as key components of the stress response. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 18:190–198.
112. Marti A, Martínez-González MA y Martínez JA. 2008. Interaction between genes and lifestyle factors on obesity. *Proceedings of the Nutrition Society* 67: 1-8.
113. Martínez-Calejman C, Di Gruccio JM, Mercau ME, Repetto EM, Astort F, Sanchez R y Cymeryng CB. 2012. Insulin sensitization with a peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonist prevents adrenocortical lipid infiltration and secretory changes induced by a high-sucrose diet. *Journal of Endocrinology* 214: 267-276.
114. Martínez-Moreno AG, López-Espinoza A, Díaz-Reséndiz FJ y Valdés-Miramontes E. 2009. Consumo de soluciones endulzadas en ratas albinas: sabor vs calorías. *Psicothema* 21:191-198.

115. McMahon M, Gerich J y Rizza R. 1988. Effects of glucocorticoids on carbohydrate metabolism. *Diabetes/Metabolism Review* 4:17-30.
116. Mehedint MG y Zeisel SH. 2013. Choline's role in maintaining liver function: new evidence for epigenetic mechanisms. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 16:339-345.
117. Michel C, Duclos M, Cabanac M y Richard D. 2005. Chronic stress reduces body fat content in both obesity-prone and obesity-resistant strains of mice. *Hormones and behavior* 48: 172-179.
118. Michel C, Levin BE y Dunn-Meynell AA. 2003.. Stress facilitates body weight gain in genetically predisposed rats on medium-fat diet. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 285: R791-799.
119. Miller WL y Bose HS. 2011. Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. *Journal of Lipid Research* 52: 2111–2135.
120. Miyajima A, Tanaka M y Itoh T. 2014. Stem/progenitor cells in liver development, homeostasis, regeneration, and reprogramming. *Cell stem cell* 14: 561-574.
121. Möller R y Vazquez N. 2011. Anatomy of the liver in Wistar rat (*rattus norvegicus*). *International Journal of Morphology* 29: 76-79.
122. Motoyama K, Nakai Y, Miyashita T, Fukui Y, Morita M, Sanmiya K, Sakakibara H, Matsumoto I, Abe K, Yakabe T, Yajima N y Shimo K. 2009. Isolation stress for 30 days alters hepatic gene expression profiles, especially with reference to lipid metabolism in mice. *Physiological Genomics* 37:79-87.
123. Nader N, Ng SS, Wang Y, Abel BS, Chrousos GP y Kino T. 2012. Liver X receptors regulate the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor: Implications for the carbohydrate metabolism. *PLoS One* 7: 1-15.
124. Nashev L, Chandsawangbhuwana C, Balazs Z, Atanasow A, Dick B, Frey F, Baker M y Odermatt A. 2007. Hexose-6-phosphate dehydrogenase modulates 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1-dependent metabolism of 7-keto- and 7beta-hydroxy-steroids. *Plos One* 2: e561.
125. Nseir W, Nassar F y Assy N. 2010. Soft drinks consumption and nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology* 16: 2579-2588.

126. Opherk C, Tronche F, Kellendonk C, Kohlmüller D, Schulze A, Schmid W y Schütz G. 2004. Inactivation of the glucocorticoid receptor in hepatocytes leads to fasting hypoglycemia and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Molecular Endocrinology* 18: 1346-1353.
127. Packard AE, Ghosal S, Herman JP, Woods SC y Ulrich-Lai YM. 2014. Chronic variable stress improves glucose tolerance in rats with sucrose-induced prediabetes. *Psychoneuroendocrinology* 47: 178-188.
128. Pacák K, Palkovits M. 2001. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocrine reviews* 22:502-548.
129. Papadopoulos V y Miller WL. 2012. Role of mitochondria in steroidogenesis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 26:771-790.
130. Passonneau, JV y Lauderdale VR. 1974. A comparison of three methods of glycogen measurement in tissues. *Analytical biochemistry*, 60, 405-412.
131. Paterson JM, Morton NM, Fievet C, Kenyon CJ, Homes MC, Staels B, Seckl JR y Mullins JJ. 2004. Metabolic syndrome without obesity: Hepatic overexpression of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 7088-7093.
132. Pecoraro N, Reyes F, Gomez F, Bhargava A y Dallman MF. 2004. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology* 145:3754-3762.
133. Pecoraro N, Gómez F, Dallman MF. 2005. Glucocorticoids dose-dependently remodel energy stores and amplify incentive relativity effects. *Psychoneuroendocrinology* 30:815:825.
134. Perello M y Spinedi E. 2004. Aspectos Neuroendocrinos de la Obesidad. *MEDICINA (Buenos Aires)* 64: 257-264.
135. Pérez-Sánchez E. 2011. Restricción proteínica en la rata madre gestante: consecuencias en la anatomía y el metabolismo de la progeñie que en su etapa adulta consume cantidades elevadas de carbohidratos. Tesis Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.

136. Pérez-Torres I, Roque P, El Hafidi M, Diaz-Diaz E y Baños G. 2009. Association of renal damage and oxidative stress in a rat model of metabolic syndrome. Influence of gender. *Free Radical Research* 43:761-771.
137. Pervanidou P y Chrousos GP. 2012. Metabolic consequences of stress during childhood and adolescence. *Metabolism: Clinical and Experimental* 61:611-619.
138. Pinheiro CH, Filho WM, Neto JO, Marinho MJ, Neto RM, Smith MM y Silva CA. 2009. Ejercicio físico previene alteraciones cardiometabólicas inducidas por el uso crónico de glucocorticoides. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 93: 392-400.
139. Postic C y Girard J. 2008. Contribution of *de novo* fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: Lessons from genetically engineered mice. *The Journal of Clinical Investigation* 118: 829-838.
140. Puri P, Mirshahi F, Cheung O, Natarajan R, Maher JW, Kellum JM, Sanyal AJ. 2008. Activation and dysregulation of the unfolded protein response in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 134:568–576.
141. Raza H, John A, Howarth FC. 2015. Increased oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Zucker diabetic rat liver and brain. *Cell Physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 35:1241–1251.
142. Renaud HJ, Cui JY, Lu H y Klaassen CD. 2014. Effect of diet on expression of genes involved in lipid metabolism, oxidative, stress, and inflammation in mouse liver-insights into mechanisms of hepatic steatosis. *PLoS One* 9: e88584.
143. Ricart-Jané D, Rodríguez-Sureda V, Benavides A, Peinado-Onsurbe J, López-Tejero MD y Lobera M. 2002. Immobilization stress alters intermediate metabolism and circulating lipoproteins in the rat. *Metabolism: Clinical and Experimental* 51: 925-931.
144. Rivera JA, Muñoz-Hernández O, Rosas-Peralta M, Aguilar-Salinas CA, Popkin BM y Willet WC. 2000. Consumo de bebidas para una vida saludable: recomendaciones para la población mexicana. *Salud Publica de México* 50: 172-194.
145. Roberge C, Carpentier AC, Langlois MF, Baillargeon JP, Ardilouze JL, Maheux P y Gallo-Payet N. 2007. Adrenocortical dysregulation as a major player in insulin resistance

- and onset of obesity. *American Journal Physiology and Endocrinology Metabolic* 293: E1465–1478.
146. Rodrigues AL, de Moura EG, Passos MC, Dutra SC y Lisboa PC. 2009. Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats. *The Journal of Physiology* 587:2647–2661.
147. Rodríguez-Castelán J, Corona-Pérez A, Nicolás-Toledo L, Martínez-Gómez M, Castelán, F y Cuevas-Romero E. 2016. Hypothyroidism Induces a Moderate Steatohepatitis Accompanied by Liver Regeneration, Mast Cells Infiltration, and Changes in the Expression of the Farnesoid X Receptor. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* [Epub ahead of print].
148. Rodes J, Pierre-Benhamou J, Bircher J, McIntyre N y Rizzetto M. 2001. Tratado de Hepatología Clínica Tomo II. Editorial Masson.
149. Romero-Sarmiento Y, Soto-Rodríguez I, Arzaba-Villalba A, Garcia HS y Alexander-Aguilera A. 2012. Effects of conjugated linoleic acid on oxidative stress in rats with sucrose-induced non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Functional Foods* 4: 219-225.
150. Roncal-Jiménez CA, Lanasa MA, Rivard CJ, Nakagawa T, Sanchez-Lozada LG, Jalal D, Andrés-Hernando A, Tanabe K, Madero M, Li N, Cicerchi C, Mc Fann K, Sautin YY y Johnson RJ. 2011. Sucrose induces fatty liver and pancreatic inflammation in male breeder rats independent of excess energy intake. *Metabolism: clinical and experimental* 60: 1259-1270.
151. Rosenstock J, Banarer S, Fonseca VA, Inzucchi SE, Sun W, Yao W, Hollis G, Flores R, Levy R, Williams WV, Seckl JR, Huber R. 2010. The 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor INCB13739 improves hyperglycemia in patients with type 2 diabetes inadequately controlled by metformin monotherapy. *Diabetes Care* 33:1516-1522.
152. Rosmond R. 2005. Role of stress in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Psychoneuroendocrinology* 30: 1-10.
153. Ross H, Kaye G y Pawlina W. 2005. Histología Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular. Médica Panamericana.

154. Ruiz-Ramírez A, Chávez-Salgado M, Peñeda-Flores JA, Zapata E, Masso F y El-Hafidi, M. 2011. High-sucrose diet increases ROS generation, FFA accumulation, UCP2 level, and proton leak in liver mitochondria. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 301: E1198-E1207.
155. Sadler AM y Bailey SJ. 2016. Repeated daily restraint stress induces adaptive behavioural changes in both adult and juvenile mice. *Physiology & Behavior* 167: 313-323.
156. Sakakibara H, Suzuki A, Kobayashi A, Motoyama K, Matsui A, Sayama K, Kato A, Ohashi N, Akimoto M, Nakayama T y Shimoi K. 2012. Social isolation stress induces hepatic hypertrophy in C57BL/6J mice. *The Journal of Toxicological Sciences* 37: 1071-1076.
157. Sapolsky RM, Romero LM y Munck AU. 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory and preparative actions. *The Endocrine Society* 21: 55-89.
158. Seckl JR, Morton NM, Chapman KE y Walker BR. 2004. Glucocorticoids and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in adipose tissue. *Recent Progress in Hormone Research* 59:359-393.
159. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI y Milner JA. 2007. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *The Journal of nutritional biochemistry* 18: 567-579.
160. Schulze M, Manson J, Ludwig D, Colditz G, Stampfer M, Willett W y Hu F. 2004. Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women. *The Journal of the American Medical Association* 292: 927-934.
161. Scorletti E, Calder PC y Byrne CD. 2011. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk: metabolic aspects and novel treatments. *Endocrine* 40:332-343.
162. Spencer S y Tirbrook A. 2011. The glucocorticoid contribution to obesity. *Stress* 14: 233-46.
163. Spolarics Z y Meyenhofer M. 2000. Augmented resistance to oxidative stress in fatty rat livers induced by a short-term sucrose-rich diet. *Bochimica et Biophysica Acta* 1487: 190-200.

164. Staab CA y Maser E. 2010. 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 is an important regulator at the interface of obesity and inflammation. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 119: 56-72.
165. Stewart PM y Tomlinson JW. 2002. Cortisol, 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and central obesity. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 13: 94-96.
166. Stimson RH, Walker BR. 2007. Glucocorticoids and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in obesity and the metabolic syndrome. *Minerva Endocrinologica* 32:141-159.
167. Stimson RH y Walker BR. 2008. Energy Metabolism and Obesity: Research and Clinical Applications. Editorial Donohoue, Patricia A.
168. Stocco DM. 2001. StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annual Review of Physiology* 63: 193-213.
169. Strakovsky RS, Zhang X, Zhou D y Pan YX. 2011. Gestational high fat diet programs hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and histone modification in neonatal offspring rats. *The Journal of Physiology* 589: 2707-2717.
170. Tanaka M, Itoh T, Tanimizu N y Miyajima A. 2011. Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms. *The Journal of Biochemistry* 149: 231-239.
171. Tiniakos D, Vos B y Brunt M. 2010. Nonalcoholic Fatty Liver Disease: pathology and Pathogenesis. *The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 5: 145-171.
172. Tomlinson JW, Walker EA, Bujalska IJ, Draper N, Lavery GG, Cooper MS, Hewison M y Stewart PM. 2004. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocrine Reviews* 25:831-866.
173. Uetake Y, Ikeda H, Irie R, Tejima K, Matsui H, Ogura S y Sawamura T. 2015. High-salt in addition to high-fat diet may enhance inflammation and fibrosis in liver steatosis induced by oxidative stress and dyslipidemia in mice. *Lipids in health and disease* 14: 6.
174. Van de Kar LD y Blair ML. 1999. Forebrain pathways mediating stress-induced hormone secretion. *Frontiers in Neuroendocrinology* 20: 1-48.
175. Vargovic P, Ukropec J, Laukova M, Kurdiová T, Balaz M y Manz B, et al. 2013. Repeated immobilization stress induces catecholamine production in rat mesenteric adipocytes. *Stress* 16:340-352.

- 176.Vartanian L, Schwartz M y Brownell K. 2007. Effects of soft drink consumption on nutrition and health: a systematic review and meta-analysis. *American Journal of Public Health* 97: 667-75.
- 177.Vasiljević A, Bursać B, Djordjevic A, Milutinović DV, Nikolić M y Matić G y Veličković N. 2014. Hepatic inflammation induced by high-fructose diet is associated with altered 11 $\beta$ HSD1 expression in the liver of Wistar rats. *European Journal of Nutrition* 53:1393-1402.
- 178.Vegiopoulos A y Herzig S. 2007. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Molecular and Cellular Endocrinology* 275: 43–61.
- 179.Velkoska E, Cole TJ, Dean RG, Burrell LM y Morris MJ. 2008. Early undernutrition leads to long-lasting reductions in body weight and adiposity whereas increased intake increases cardiac fibrosis in male rats. *The Journal of Nutrition* 138:1622–1627.
- 180.Vo TX, Revesz A, Sohi G, Ma N y Hardy DB. 2013. Maternal protein restriction leads to enhanced hepatic gluconeogenic gene expression in adult male rat offspring due to impaired expression of the liver X receptor. *The Journal of Endocrinology* 218:85-97.
- 181.Vonghia L y Francque S. 2015. Cross talk of the immune system in the adipose tissue and the liver in non-alcoholic steatohepatitis: Pathology and beyond. *World journal of hepatology* 7: 1905.
- 182.Walker B. 2007. Glucocorticoids and Cardiovascular Disease. *European Journal of Endocrinology* 157:545-559.
- 183.Welsch U y Sobotta J. 2009. Histología. Editorial Médica. Panamericana.
- 184.Zafir A y Banu N. 2009. Modulation of *in vivo* oxidative status by exogenous corticosterone and restraint stress in rats. *Stress* 12: 167-177.
- 185.Zeeni N, Daher C, Fromentin G, Tomé D, Darcel N y Chaumontet C. 2013. A cafeteria diet modifies the response to chronic variable stress in rats. *Stress* 16: 211-219.
- 186.Zhang P. 2012. Analysis of Mouse Liver Glycogen Content. *Bio-protocol*, 2: e186.
- 187.Zhao R y Ducan SA. 2005. Embryonic Development of the Liver. *Hepatology* 41: 956-967.

## 12. ANEXOS

### 12.1 Deshidratación del tejido hepático

1. Después de la disección, mantener el tejido en Bouin por 24 horas.
2. Sacar el tejido del Bouin y cortarlo de acuerdo a la porción que se va a deshidratar.
3. Realizar la deshidratación de acuerdo a la lista siguiente, cuidando que la solución cubra ligeramente el tejido y mantener en agitación.

No. de solución	Solución y Concentración	Tiempo en Minutos
1	OH 60%	15 min (3 lavados de 5 min)
2	OH 70%	20 min
3	OH 80%	20 min
4	OH 80%	30 min
5	OH 96%	30 min
6	OH 96%	30 min
7	OH 100%	30 min
8	OH 100%	30 min
9	OH 100%-Xileno	30 min
10	Xileno I	30 min
11	Xileno II	30 min
12	Paraplast X-tra I	30 min
13	Paraplast X-tra II	60 min
14	Paraplast X-tra III	180 min (Con un cambio de paraplast a los 90 min)

4. Incluir los tejidos con Paraplast limpio y dejar que solidifiquen.

**Nota:** Previamente poner a licuar el Paraplast en el horno a una temperatura máxima de 56°C.

## 12.2 Tinción de hematoxilina – eosina

Después de obtener los cortes en el micrótopo se dejan secar mínimo por 24 h, posteriormente se tiñen con los siguientes tiempos en las diferentes soluciones.

Paso	No.	Solución	Tiempo
Desparafinar	1	Xileno I	5 minutos
	2	Xileno II	5 minutos
	3	Xileno:etanol	5 minutos
Hidratación	4	Etanol 100%	5 minutos
	5	Etanol 100%	5 minutos
	6	Etanol 96 %	3 minutos
	7	Etanol 80%	3 minutos
	8	Etanol 60%	3 minutos
	9	Agua destilada	3 minutos
	10	Hematoxilina de Harris	30 minutos
	11	Agua corriente	40 segundos
Contraste	12	Etanol ácido	40 segundos
	13	Agua destilada	40 segundos
Azuleamiento	14	Etanol amoniacal	3 minutos
	15	Agua destilada	40 segundos
	16	Eosina	3 minutos
	17	Agua destilada	40 segundos
Deshidratación	18	Etanol 96 %	40 segundos
	19	Etanol 96 %	40 segundos
	20	Etanol 100%	30 segundos
	21	Etanol 100%	30 segundos
	22	Etanol:Xileno	30 segundos

	23	Xileno	30 segundos
	24	Xileno	30 segundos
<b>Montaje</b>		Cytoseal TM 60	

- En cada canastilla caben 32 portaobjetos.
- En caso de meter más de dos trenes el tren 3 y 4 darles más tiempo en el paso 12 y 14.
- Revisar al salir el tren en la hematoxilina, eosina, alcohol ácido y alcohol amoniacal un porta en el microscopio para ver cómo se tiñe.
- En caso de que a la hora de montar con el cytoseal queden burbujas regresar el porta al Xileno para volver a montar.

### 12.3 Tinción de Tricrómica de Masson

Después de obtener los cortes se dejan secar al menos 24 horas, y se prosigue a la tinción con los siguientes tiempos en las diferentes soluciones.

Paso	No.	Solución	Tiempo
<b>Desparafinar</b>	1	Xileno	2 x 5 minutos
	2	Xileno:Etanol	5 minutos
	3	Etanol 100%	2 x 5 minutos
	4	Etanol 96 %	3 minutos
	5	Etanol 80%	3 minutos
	6	Etanol 60%	3 minutos
	7	Agua destilada	3 minutos
<b>Mordente</b>	8	Mordente de Bouin	12 horas
	9	Agua corriente	20 minutos
	10	Hematoxilina de Weigert	11 minutos
	11	Agua corriente	40 segundos
	12	Agua destilada	40 segundos
<b>Azuleamiento</b>	13	Amoniaco 1 %	4 minutos
	14	Agua corriente	40 segundos
	15	Biebrich Scarlet-Fuchina Acida	10 minutos
	16	Agua corriente	40 segundos
<b>Contraste</b>	17	Äc. Fosfomolibdico/Fosfotugstico	4 minutos
	18	Azul de anilina	5 minutos
	19	Ac. Acético glacial 1 %	3 minutos
	20	Agua corriente	40 segundos
	21	Etanol 80 %	40 segundos

<b>Deshidratación</b>	22	Etanol 96 %	30 segundos
	23	Etanol 100%	2 x 30 segundos
	24	Etanol: Xilol	10 segundos
	25	Xileno	2 x 10 segundos
<b>Montaje</b>		Cytoseal TM 60	

## 13. PUBLICACIONES

LVI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas



### **C - 183 El consumo elevado de sacarosa a temprana edad induce un proceso inflamatorio hepático en la rata macho**

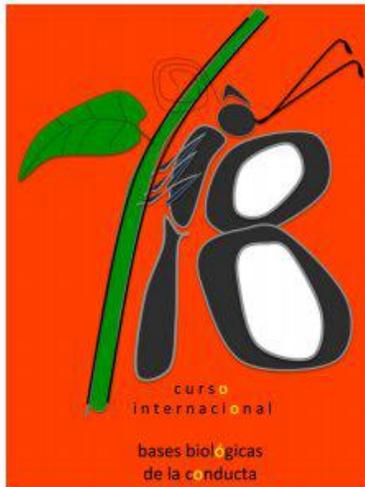
Corona-Pérez A (1), Rodríguez-Antolín J (2), Castelán F (3), Soto-Rodríguez I (4), Martínez-Gómez M (3), (5), Nicolás-Toledo L (3). (1) Maestría en Ciencias Biológicas, UATx, (2) Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, UATx, (3) Biología de la Conducta, UATx, (4) Universidad Veracruzana, (5) Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición en el 2012 reportó un aumento en la prevalencia de sobrepeso y obesidad en niños de 5 a 11 años de edad. Uno de los factores predisponentes es el consumo de bebidas azucaradas ya que la población mexicana ocupa el primer lugar en consumo de refrescos y bebidas azucaradas. Estudios en humanos han asociado el consumo de bebidas azucaradas con el desarrollo de obesidad, trastornos metabólicos y la enfermedad del hígado graso no alcohólico. Sin embargo, no hay trabajos donde se correlacione el efecto del consumo elevado de sacarosa a temprana edad sobre el hígado. Metodología: Se utilizaron ratas machos Wistar de 21 días de edad. Se les proporcionó agua con sacarosa al 30%: el Grupo 1 consumió agua con sacarosa un mes; el Grupo 2 consumió agua con sacarosa dos meses y el Grupo 3 consumió agua con sacarosa tres meses. Al sacrificio se extrajo el hígado, fue fijado en Bouin, deshidratado en alcoholes ascendentes, aclarado en xilol e incluido en paraplast. Los cortes histológicos de 7µm fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina. Los resultados fueron analizados con t-Student, ANOVA de dos vías y Bonferroni como post-hoc. Resultados: Las ratas del Grupo 1 mostraron el inicio de un proceso inflamatorio con presencia de células de Kupffer y células granulosa. En el Grupo 2 hubo un desarreglo de los cordones hepáticos. El Grupo 3 presentó el inicio de un engrosamiento en la íntima de las venas centrales hepáticas, hepatocitos en forma de balón, congestión de sinusoides, vesículas de grasa. Además, un aumento de tejido adiposo, triglicéridos y VLDL ( $p < 0.01$ ). Conclusiones: El consumo elevado de sacarosa induce un proceso inflamatorio hepático progresivo desde el primer mes del consumo de sacarosa hasta una esteatosis hepática grado uno en el tercer mes del consumo de sacarosa. Es importante resaltar que al parecer el tiempo en la que se consume la sacarosa es fundamental para provocar los hallazgos encontrados.

Agradecimientos:

Financiamiento: CONACYT a CPA (417844). Universidad Autónoma de Tlaxcala (Proyecto CACy-PI-UATx-2013).





## El Consumo Elevado De Sacarosa A Temprana Edad Induce Un Proceso Inflamatorio Hepático En La Rata Macho

Adriana Corona-Pérez<sup>1</sup>, Jorge Rodríguez-Antolín<sup>2</sup>,  
Francisco Castelán<sup>2</sup>, Ida Soto-Rodríguez<sup>3</sup>,  
Margarita Martínez-Gómez<sup>2,4</sup> y Leticia Nicolás-Toledo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala

<sup>2</sup>Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala

<sup>3</sup>Universidad Veracruzana

<sup>4</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

La ingesta alimentaria es una conducta que consiste en la obtención e ingestión de alimentos. Cuando no se cubren los requerimientos nutricionales a través de la dieta, se deteriora el estado nutricional promoviendo la aparición de cuadros clínicos de malnutrición, tanto por consumo elevado (sobrenutrición) como por restricción (desnutrición). En el 2012, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición reportó un aumento en la prevalencia de sobrepeso y obesidad en niños de 5 a 11 años de edad. Uno de los factores predisponentes es el consumo de bebidas azucaradas ya que la población mexicana ocupa el primer lugar en consumo de refrescos y bebidas azucaradas. Estudios en humanos han asociado el consumo de bebidas azucaradas con el desarrollo de obesidad, trastornos metabólicos y la enfermedad del hígado graso no alcohólico. Sin embargo, no hay trabajos donde se correlacione el efecto del consumo elevado de sacarosa a temprana edad sobre el desarrollo de esteatosis hepática. **Metodología:** Se utilizaron ratas machos Wistar de 21 días de edad. Se les proporcionó agua con sacarosa al 30%: el Grupo 1 consumió agua con sacarosa un mes; el Grupo 2 consumió agua con sacarosa dos meses y el Grupo 3 consumió agua con sacarosa tres meses. Al sacrificio se extrajo el hígado, fue fijado en Bouin, deshidratado en alcoholes ascendentes, aclarado en xilol e incluido en paraplast. Los cortes histológicos de 7µm fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina. Los resultados fueron analizados con *t*-Student, ANOVA de dos vías y Bonferroni como post-hoc. **Resultados:** Las ratas del Grupo 1 mostraron el inicio de un proceso inflamatorio con presencia de células de Kupffer y células granulosas. En el Grupo 2 además del proceso inflamatorio encontramos un desarreglo de los cordones hepáticos. Mientras que, en el Grupo 3 sumado al proceso inflamatorio y desacomodo de los cordones hepáticos presento el inicio de un engrosamiento en la íntima de las venas centrales hepáticas, hepatocitos en forma de balón, congestión de sinusoides y vesículas de grasa. Además, un aumento de tejido adiposo, triglicéridos y VLDL ( $p < 0.01$ ). **Conclusiones:** El consumo elevado de sacarosa induce un proceso inflamatorio hepático progresivo desde el primer mes del consumo de sacarosa hasta una esteatosis hepática grado uno en el tercer mes del consumo de sacarosa. Es importante resaltar que al parecer el tiempo de consumo de sacarosa es fundamental para provocar daños al hígado. Financiamiento: CONACYT a CPA (417844). Universidad Autónoma de Tlaxcala (Proyecto CACyPI-UATx-2013).

9-12 de octubre de 2013. Tlaxcala, México.

### 35. El consumo elevado de sacarosa a temprana edad induce inflamación hepática en la rata macho

**Corona-Pérez A1**, Castelán F2, Soto-Rodríguez I3, Martínez-Gómez M2,4, Rodríguez-Antolín J2, Nicolás-Toledo L2 1Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala 2Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, UAT 3Universidad Veracruzana 4Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM Email: [xaadri@hotmail.com](mailto:xaadri@hotmail.com)

**Introducción:** En el 2012, la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición reportó un aumento de sobrepeso y obesidad en niños. Uno de los factores predisponentes es el consumo de bebidas azucaradas el cual se ha asociado con el desarrollo de trastornos metabólicos y la enfermedad del hígado graso no alcohólico.

**Objetivos:** Determinar si el consumo elevado de sacarosa a temprana edad induce un daño hepático en la rata. **Metodología:** Se utilizaron ratas machos de 21 días de edad, que conformaron a los grupos control y experimental. Se les proporcionó agua con sacarosa al 30% durante uno, dos y tres meses (grupos independientes). Al sacrificio se extrajo el hígado y fue fijado en Bouin, deshidratado en alcoholes, aclarado en xilol e incluido en paraplást. Los cortes histológicos fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina. Los resultados fueron analizados con *t*-Student, ANOVA de dos vías y Bonferroni como post-hoc.

**Resultados:** El consumo de un mes de sacarosa induce inflamación. El consumo de dos meses de sacarosa induce inflamación y desarreglo de los cordones hepáticos. El consumo de tres meses de sacarosa induce inflamación, desarreglo de los cordones hepáticos y engrosamiento de la íntima en venas centrales, hepatocitos balonizados, congestión de sinusoides y vesículas de grasa.

**Conclusiones:** El consumo elevado de sacarosa induce un proceso inflamatorio hepático progresivo hasta una esteatosis hepática grado uno. Al parecer el tiempo de consumo de sacarosa es fundamental para provocar daños al hígado. **Financiamiento:** CONACYT a CPA (417844).



**Effect of chronic immobilization stress and sucrose consumption on the development of hepatic steatosis in male infant rat**

Adriana Corona Pérez, Ida Soto Rodríguez, Francisco Castelán, Margarita Martínez Gómez, Jorge Rodríguez Antolín y Leticia Nicolás Toledo.

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala  
Calle del Bosque S/N  
Tlaxcala, Tlax. 90000  
Phone (52) 246 46 215 57, (52) 246 46 52 700, ext. 1806  
e-mail: [lettita2@yahoo.com](mailto:lettita2@yahoo.com)

Modern life stress combined with high calorie diets are key factors associated with the development of metabolic and neuroendocrine abnormalities. Many of these abnormalities are mediated by hepatic metabolism. Stress increases enzymatic activity of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-1 (HSD1), which has been associated with increased glucocorticoids and development of hepatic steatosis. In animal models, consumption of sucrose during early age decreases serum corticosterone and induces an inflammatory liver damage. Moreover, exposure to stress and high fat diet induces an increase in corticosterone. However, there are no studies assessing the combined effects of stress and a diet rich in carbohydrates on liver damage in infant rat. Here we investigated whether chronic immobilization stress combined with high sucrose diet leads to the development of hepatic steatosis during childhood in rats. We used male Wistar rats aged 21 days (n = 32). Rats were divided into the control (C, n=8), chronic stress (St, n=8), high-sucrose diet (S30, n=8), and chronic stress and high-sucrose diet (S30/St, n=8). The animals were subjected to chronic stress for four weeks by immobilization. Liver was extracted and fixed in Bouin, dehydrated in ascending alcohols, cleared in xylene and embedded in paraplast. Histological sections were stained with hematoxylin-eosin and immunohistochemistry to determine the oxidative damage. Corticosterone concentration and HSD1 activity was measured by ELISA and RIA, respectively. We found that stress causes steatosis, inflammation and oxidative stress in the liver parenchyma accompanied by an increase in the concentration of serum corticosterone and activity HSD1 in the liver. Contrary to our predictions, no effect of sucrose consumption on hepatic damage was found. These results suggest that feeding high-sucrose diets do not contribute to development hepatic steatosis. Funding: CONACYT a CPA (417844), CONACYT-225126. PNPC C-122/2014.





---

### **Consumo de sacarosa a temprana edad más estrés: relación entre corticosterona y esteatosis hepática**

**Corona-Pérez Adriana**(Estudiante de posgrado)<sup>1</sup>,Rodríguez-Antolín Jorge<sup>2</sup>,Castelán Francisco<sup>2</sup>, Martínez-Gómez Margarita<sup>2,4</sup>, Soto-Rodríguez Ida<sup>3</sup>, y Nicolás-Toledo Leticia<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Doctorado en Ciencias Biológicas, UATx,<sup>2</sup>Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, UATx, <sup>3</sup>Universidad Veracruzana, <sup>4</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

El estrés de la vida moderna combinado con dietas hipercalóricas son factores clave que se asocian con el desarrollo de alteraciones metabólicas y neuroendocrinas. Muchos de estos trastornos, son mediados a través del metabolismo hepático. En modelos animales, el consumo de sacarosa a temprana edad disminuye la concentración sérica de corticosterona e induce un daño inflamatorio hepático. Por otra parte, la exposición al estrés y una dieta alta en grasa induce un aumento de corticosterona. Sin embargo, no hay trabajos que muestren los daños ocasionados al hígado debido a un consumo de una dieta rica en carbohidratos y estrés. Dado que se sugiere una estrecha interacción entre los factores de estrés y las enfermedades del hígado, nos interesa saber si el estrés combinado con una dieta alta en sacarosa provoca el desarrollo de esteatosis hepática durante la infancia. Para ello, utilizamos ratas macho Wistar de 21 días de edad (n=32). Las ratas fueron divididas en cuatro grupos (8/grupo) experimentales: ratas que consumen agua simple(C), agua simple+estrés (E), agua azucarada 30% (A30) y agua azucarada+estrés (A30+E). Los animales fueron sometidos a estrés crónico mediante inmovilización durante cuatro semanas. Al sacrificio se extrajo el hígado, fue fijado en Bouin, deshidratado en alcoholes ascendentes, aclarado en xilol e incluido en paraplant. Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica para determinar el daño oxidativo. La concentración de corticosterona se midió por el método de ELISA. Los resultados fueron analizados con ANOVA de dos vías y Newman Keuls como post-hoc. Encontramos que el estrés provoca esteatosis e inflamación grado 3 en el parénquima hepático acompañado de un aumento en la concentración de corticosterona y estrés oxidativo. Contrario a lo sucedido en los animales A30. Al parecer el consumo de sacarosa revierte los daños ocasionados por el estrés. Financiamiento: CONACYT a CPA (417844), CONACYT INFR-2014-01-1010/186/2014, CONACYT C-122/2014-1010/163/2014, CACyPI-UATX-2014.



**XL REUNIÓN ANUAL**  
**Academia de Investigación**  
**en Biología**  
**de la Reproducción, A.C.**

Del 20 al 23 de Mayo  
de 2015 Hotel Emporio,  
Ixtapa, Guerrero.

## El consumo elevado de sacarosa modifica el arreglo histológico gonadal y los niveles séricos de leptina y testosterona en ratas infantiles.

De León Ramírez Yeimy Mar<sup>1</sup>, Morimoto S<sup>2</sup>, Corona-Pérez A<sup>3</sup>, Díaz-Aguilar Y<sup>3</sup>,  
Martínez-Gómez M<sup>4,5</sup>, Rodríguez-Antolín J<sup>4</sup>, Nicolás L<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> *Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala.*

<sup>2</sup> *Departamento de Biología de la Reproducción. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", México DF, México.*

<sup>3</sup> *Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala.*

<sup>4</sup> *Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala.*

<sup>5</sup> *Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.*

En humanos, con sobrepeso y/o obesidad, se ha reportado una disminución de la libido y disfunción eréctil, así como infertilidad y baja concentración de testosterona. Por otro lado, la deficiencia en la producción de andrógenos testicular está relacionada con la cantidad de grasa corporal y los niveles de leptina. En modelos animales, se ha mostrado que una dieta alta en grasa en edad adulta, incrementa las concentraciones de leptina y disminuye la testosterona, promoviendo diferencias histológicas en túbulos seminíferos, afectando la fertilidad, además los niveles de FSH y LH aumentan cuando las ratas reciben 10 y 30 µg/kg de leptina e induce estrés oxidativo y anomalías anatómicas en el espermatozoide. Sin embargo, no está claro el papel de la leptina en la reproducción, además, no hay trabajos donde se evalué el efecto de una dieta alta en carbohidratos sobre la concentración de testosterona y el arreglo histológico del testículo en ratas jóvenes. Metodología: Ratas machos Wistar de 21 días de edad (n=16) fueron divididas en dos grupos experimentales: ratas que consumieron agua simple (C) y ratas que consumieron agua azucarada al 30% (S30) durante un mes. Al final del periodo experimental, se midió la glucosa. Inmediatamente las ratas fueron sacrificadas por decapitación. Se extrajo y pesaron los testículos y el tejido adiposo total. El testículo derecho fue fijado en Bouin, deshidratado en alcoholes ascendentes, aclarado en xilol e incluido en paraplast. Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Los niveles de leptina y testosterona se midieron por el método de ELISA. Los datos fueron analizados mediante la prueba Student-t. Resultados preliminares: Las ratas que consumieron agua azucarada muestran aumento en los niveles de leptina y en el peso testicular, acompañado de modificaciones histológicas en el citoplasma, epitelio germinativo y lumen. Por otro lado, los datos indican una tendencia en aumentar los niveles de testosterona. Conclusiones: El presente estudio muestra que el consumo de una dieta rica en sacarosa, modifica el arreglo histológico gonadal y posiblemente aumenta los niveles de testosterona durante la infancia a diferencia de lo que se ha reportado en edad adulta y con dieta alta en grasa.

Financiamiento: CONACYT a YMDLR (631998)

## High Sucrose Intake Ameliorates the Accumulation of Hepatic Triacylglycerol Promoted by Restraint Stress in Young Rats

Adriana Corona-Pérez<sup>1</sup> · Mauricio Díaz-Muñoz<sup>2</sup> · Ida Soto Rodríguez<sup>3</sup> · Estela Cuevas<sup>4</sup> · Margarita Martínez-Gómez<sup>4,5</sup> · Francisco Castelán<sup>4</sup> · Jorge Rodríguez-Antolín<sup>4</sup> · Leticia Nicolás-Toledo<sup>4</sup>

Received: 11 December 2014 / Accepted: 17 August 2015 / Published online: 23 September 2015  
© AOCs 2015

**Abstract** Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is the most common chronic liver disorder. Stress promotes the onset of the NAFLD with a concomitant increment in the activity of the hepatic 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 $\beta$ -HSD-1). However, the interaction between the stress and a carbohydrate-enriched diet for the development of NAFLD in young animals is unknown. In the present study, we evaluated the impact of chronic stress on the hepatic triacylglycerol level of young rats fed or not with a high sucrose-diet. For doing this, 21-day old male Wistar rats were allocated into 4 groups: control (C), chronic restraint stress (St), high-sucrose diet (S30), and chronic restraint stress plus a 30 % sucrose diet (St + S30). Chronic restraint stress consisted of 1-hour daily session, 5 days per week and for 4 weeks. Rats were fed with a standard chow and tap water (C group) or 30 % sucrose diluted in water (S30 group). The St + S30 groups consumed less solid food but had an elevated visceral fat accumulation in comparison with the St group. The St group showed a high level of serum

corticosterone and a high activity of the hepatic 11 $\beta$ -HSD-1 concomitantly to the augmentation of hepatic steatosis signs, a high hepatic triacylglycerol content, and hepatic oxidative stress. Conversely, the high-sucrose intake in stressed rats (St + S30 group) reduced the hepatic 11 $\beta$ -HSD-1 activity, the level of serum corticosterone, and the hepatic triacylglycerol content. Present findings show that a high-sucrose diet ameliorates the triacylglycerol accumulation in liver promoted by the restraint stress in young male rats.

**Keywords** Non-alcoholic fatty liver disease · Visceral fat · Oxidative stress · Hepatic 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 · Corticosterone

### Abbreviations

H-E	Hematoxylin and eosin
HPA	Hypothalamic-pituitary-adrenal axis
11 $\beta$ -HSD-1	11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease
NAS	Non-alcoholic steatosis activity scores
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
3-NTyr	3-Nitrotyrosine
PBS	Phosphate-buffered saline
TAG	Triacylglycerol
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha
VLDL	Very low density lipoprotein

### Introduction

Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), the most common chronic hepatic disorder, may progress to cirrhosis and hepatic cancer [1]. The NAFLD is associated with a disequilibrium involving the glucose tolerance, a major storage of

✉ Leticia Nicolás-Toledo  
lettita2@yahoo.com

<sup>1</sup> Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México

<sup>2</sup> Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Campus UNAM-Juriquilla, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, México

<sup>3</sup> Facultad de Bioanálisis, Universidad Veracruzana, Veracruz, México

<sup>4</sup> Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, 90070 Tlaxcala, México

<sup>5</sup> Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México-DF, México

## Interactive effects of chronic stress and a high-sucrose diet on nonalcoholic fatty liver in young adult male rats

Adriana Corona-Pérez<sup>a</sup> , Mauricio Díaz-Muñoz<sup>b</sup> , Estela Cuevas-Romero<sup>c</sup> , Dalia Luna-Moreno<sup>d</sup> , Héctor Valente-Godínez<sup>b</sup> , Olivia Vázquez-Martínez<sup>b</sup> , Margarita Martínez-Gómez<sup>c,e</sup>, Jorge Rodríguez-Antolín<sup>c</sup> , and Leticia Nicolás-Toledo<sup>c</sup> 

<sup>a</sup>Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México; <sup>b</sup>Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Campus UNAM-Juriquilla, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, México; <sup>c</sup>Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México; <sup>d</sup>CONACyT-Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México; <sup>e</sup>Departamento de Biología Celular y Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México-CDMX, México

### ABSTRACT

Glucocorticoids have been implicated in nonalcoholic fatty liver diseases (NAFLD). The influence of a palatable diet on the response to stress is controversial. This study explored whether a high-sucrose diet could protect from hepatic steatosis induced by chronic restraint stress in young adult rats. Male Wistar rats aged 21 days were allocated into four groups ( $n = 6-8$  per group): control, chronic restraint stress, 30% sucrose diet, and 30% sucrose diet plus chronic restraint stress. After being exposed to either tap water or sucrose solution during eight weeks, half of the rats belonging to each group were subject or not to repeated restraint stress (1 h per day, 5 days per week) during four weeks. Triacylglycerol (TAG), oxidative stress, activity of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 $\beta$ -HSD-1), infiltration of immune cells, and glycogen amount in the liver were quantified. Serum concentrations of corticosterone and testosterone were also measured. The stressed group showed normal serum concentrations of corticosterone and did not have hepatic steatosis. However, this group showed increased glycogen, inflammation, mild fibrosis, oxidative stress, and a high activity of 11 $\beta$ -HSD-1 in the liver. The group exposed to the high-sucrose diet had lower concentrations of corticosterone, hepatic steatosis and moderate fibrosis. The group subject to high-sucrose diet plus chronic restraint stress showed low concentrations of corticosterone, hepatic steatosis, oxidative stress, and high concentrations of testosterone. Thus, restraint stress and a high-sucrose diet each generate different components of nonalcoholic fatty liver in young adult rats. The combination of both the factors could promote a faster development of NAFLD.

### ARTICLE HISTORY

Received 8 November 2016  
Accepted 16 September 2017

### KEYWORDS

11 $\beta$ -HSD-1; corticosterone; hepatic steatosis; hepatic fibrosis; NAFLD; oxidative stress

### Introduction

Psychosocial stress can aggravate inflammation and fibrosis in a cirrhotic liver (Chida, Sudo, & Kubo, 2006; Vere, Streba, Streba, Ionescu, & Sima, 2009). Thus, an excess of glucocorticoid has been associated with the development of nonalcoholic fatty liver diseases (NAFLD; Ahmed et al., 2012). The local synthesis of glucocorticoids in the liver is mediated by the enzyme 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (11 $\beta$ -HSD-1), which interconverts the active cortisol (in humans) or corticosterone (in rats), and the inert cortisone (in humans) and 11-dehydrocorticosterone (in rats). This is associated with the development of metabolic syndrome, signs of inflammation, and oxidative stress in patients with NAFLD (Staab & Maser, 2010; Tarantino & Finelli, 2013). However, only 20% of patients diagnosed with Cushing's syndrome show hepatic steatosis (Rockall et al., 2003), suggesting that other factors may explain fat accumulation.

Evidence about the influence of a hypercaloric and palatable diet on the attenuation of the response to stress is controversial. Some authors have shown that a high-carbohydrate diet reduces the serum concentration of adrenocorticotropic hormone (ACTH) but not corticosterone, as promoted by chronic stress in adult rats (Rho, Kim, Choi, & Lee, 2014; Zeeni et al., 2013). In contrast with these findings, it has been shown that a chronic high-carbohydrate diet can or cannot increase the serum corticosterone concentration (Ochoa, Lallès, Malbert, & Val-Laillet, 2015; Zeeni et al., 2013), enhances 11 $\beta$ -HSD-1 protein expression in the liver (Vasiljević et al., 2014), and down-regulates glucocorticoid receptors in hepatic and adipose tissue (Kovačević, Nestorov, Matić, & Elaković, 2014; Vasiljević et al., 2014) of adult rats. Notably, a high-sucrose diet reduces the serum concentration of corticosterone, the amount of triacylglycerol (TAG), and the 11 $\beta$ -HSD-1 activity in the liver promoted by chronic stress in infant rats (Corona-Pérez et al., 2015). This differential effect

**CONTACT** Leticia Nicolás Toledo  leticia.nicolast@uatx.mx  Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala, 90000-Tlaxcala, México

© 2017 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group