



Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

**“El consumo elevado de sacarosa a temprana edad
disminuye la concentración de corticosterona e induce un daño
hepático en ratas”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Lic. Nut. Adriana Corona Pérez

Director

Dra. Leticia Nicolás Toledo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Reforma Curricular 2012



Universidad de la Autorrealización

Financiamiento:

Agradecimiento a la Universidad Autónoma de Tlaxcala (Proyecto CACyPI-UATx-2013),
CONACYT (417844-CPA) y beca de movilidad ECOES.



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

**“El consumo elevado de sacarosa a temprana edad disminuye
la concentración de corticosterona e induce un daño hepático
en ratas”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Lic. Nut. Adriana Corona Pérez

Director

Dra. Leticia Nicolás Toledo

Cómite tutorial

Dra. Ida Soto Rodríguez

Dr. Francisco Castelán

Dr. Jorge Rodríguez Antolín

Dra. María Isabel López Rull

Tlaxcala, Tlax.

Agosto, 2013.



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta



COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E

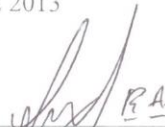
Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que **Adriana Corona Pérez** realiza para la obtención del grado de Maestra en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“El consumo elevado de sacarosa a temprana edad disminuye la concentración de corticosterona e induce un daño hepático en ratas”**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., JULIO 26 DE 2013




DRA. LETICIA NICOLÁS TOLEDO



DR. JORGE RODRÍGUEZ ANTOLÍN



DR. FRANCISCO CASTELÁN



DRA. IDA SOTO RODRÍGUEZ



DRA. MARÍA ISABEL LÓPEZ RULL



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:
ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000



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

Agradecimientos

Esta investigación fue realizada bajo la dirección de la Dra. Leticia Nicolás Toledo 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.

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 presentado.

Se contó con la tutoría de los Drs. Ida Soto Rodríguez, Francisco Castelán, Jorge Rodríguez Antolín y María Isabel López Rull a los cuales agradezco sus enriquecedoras aportaciones en la realización de la presente tesis. Un reconocimiento especial a la QFB Laura García Rivera por su valioso apoyo en el análisis de corticosterona.

Agradecimientos

A Dios, por darme la vida y la fuerza para alcanzar mis sueños.

A mis padres: Alfonso y Adela...Gracias por ayudarme cada día a cruzar con firmeza el camino de la superación, porque con su apoyo y aliento hoy he logrado uno de mis más grandes anhelos. A quienes jamás encontraré la forma de agradecer el que me hayan brindado su mano en las derrotas y logros de mi vida.

A mi hermano Jonathan... Porque el amor de hermano no tiene sustituto, porque me conoces tal y como soy, porque me aceptas a pesar de todas mis faltas, gracias por los momentos de juegos, risas y llanto pero sobre todo gracias por ser mi amigo.

A la Dra. Leticia Nicolás Toledo por su ejemplo, porque de usted he aprendido que la familia y la superación personal van de la mano. Gracias por sus consejos, conocimiento y motivación.

Al Dr. Francisco Castelán porque de usted he aprendido mucho, mi respeto y admiración.

A mis compañeros de laboratorio: Yadira, Raúl, Cristhian y Kenia por su amistad y apoyo en los momentos difíciles durante la realización de este proyecto de vida.

A mi princesita: Guadalupe Yamileth

Para mi pequeña a quien, con el corazón lleno de tristeza, tuve que robarle horas de convivencia y juegos. Agradeciéndole que a cambio al verme brille su mirada y extienda sus manitas con alegría hacia mí, brindándome sonrisas y abrazos, demostrándome así su gran cariño. Para ti hija que desde que naciste eres mi mayor ilusión, mi valentía, mi fuerza, mi alegría... la razón de mi vida.

RESUMEN

Los glucocorticoides, son hormonas que participan en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, secretados por las glándulas adrenales. Dentro de la maquinaria metabólica, el papel de los glucocorticoides ha sido muy poco estudiado. En modelos animales, se ha mostrado que el consumo de sacarosa durante la edad adulta promueve la acumulación de grasa en los hepatocitos condición conocida como esteatosis hepática. Mientras que, en trabajos donde se administra dexametasona, un glucocorticoide sintético también se desarrolla esteatosis hepática. Sin embargo no hay trabajos donde se correlacione el efecto del consumo de sacarosa y el daño hepático con los niveles de corticosterona a temprana edad. Este estudio se realizó para conocer el papel de la corticosterona en el desarrollo de la esteatosis hepática, en un modelo de consumo de sacarosa al 30%. 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, cada uno con sus animales control (n=6). Se registró diariamente el peso corporal, consumo de alimento y agua. Al sacrificio se obtuvo la sangre para la medición de corticosterona por el método de ELISA. Se extrajo el tejido adiposo e hígado y se pesaron. 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. Encontramos un aumento significativo en los niveles de triglicéridos, VLDL y acumulación de tejido adiposo en los animales experimentales del Grupo 3. En los cortes histológicos de los animales experimentales del Grupo 1 se encontró la presencia de células granulosas (eosinófilos, basófilos y neutrófilos) y linfocitos lo que indica el inicio de un proceso inflamatorio. En los animales del Grupo 2 el proceso inflamatorio persiste, además se observa un desarreglo de los cordones hepáticos. Mientras que, en el grupo 3 el proceso inflamatorio provocó un engrosamiento de la íntima de los vasos sanguíneos, además encontramos hepatocitos en forma de balón, congestión de los sinusoides, presencia de vesículas de grasa que fue corroborada con la tinción de rojo oleoso, características de una esteatosis grado 1, aunque no hubo diferencias en el área citoplasmática de los hepatocitos. Mientras que, la concentración de corticosterona

disminuyó por efecto del consumo de sacarosa. Con lo anterior podemos concluir que el consumo elevado de sacarosa induce un proceso inflamatorio hepático progresivo hasta el desarrollo de una esteatosis hepática grado 1. Los resultados muestran que el tiempo de consumo de sacarosa a temprana edad es un factor importante en el desarrollo de esteatosis hepática. Iniciando con un proceso inflamatorio sin la presencia de concentraciones elevadas de corticosterona. No obstante la corticosterona podría estar participando de manera indirecta en la progresión de la enfermedad del hígado graso no alcohólico. Probablemente la disminución de la corticosterona este provocando cambios metabólicos que ocasionen el desarrollo de la esteatosis hepática.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	13
1.1 Glucocorticoides	14
1.2 Hígado.....	16
1.3 Metabolismo de carbohidratos y glucocorticoides	18
1.4 Esteatosis hepática no alcohólica.....	21
2. ANTECEDENTES	22
2.1 Modelos animales	22
2.1.1 Dietas ricas en carbohidratos.....	22
2.1.2 Sacarosa y esteatosis hepática	24
2.1.3 Esteatosis hepática y glucocorticoides	24
3. JUSTIFICACIÓN	26
4. HIPÓTESIS	27
5. OBJETIVOS	27
5.1 General.....	27
5.2 Específicos	27
6. MATERIAL Y MÉTODOS	28
6.1 Manejo de los animales.....	28
6.2 Protocolo de la dieta	29
6.3 Obtención de kilocalorías (kcal) consumidas en el agua	29
6.4 Obtención de kilocalorías (kcal) consumidas en el alimento.....	30
6.5 Obtención de muestras sanguíneas, hígado y tejido adiposo	30
6.6 Determinaciones bioquímicas	30
6.7 Análisis histológico del hígado.....	31
6.8 Tinción rojo oleoso	32
6.9 Determinación de corticosterona sérica	32
6.10 Análisis estadístico	32

7. RESULTADOS	33
7.1 Peso corporal y alimento de las ratas	33
7.2 Peso del tejido adiposo	33
7.3 Parámetros bioquímicos al sacrificio	37
7.3.1 Triglicéridos	37
7.3.2 VLDL	37
7.4 Peso del hígado	38
7.5 Análisis histológico del hígado	39
7.5.1 Área citoplasmática	44
7.6 Corticosterona sérica.....	45
8. DISCUSIÓN	47
9. CONCLUSIONES	55
10. PERSPECTIVAS	56
11. REFERENCIAS	57
12. ANEXOS	66
12.1 Deshidratación del tejido hepático.....	66
12.2 Tinción de hematoxilina – eosina	67
12.3 Tampón de sacarosa al 30% (Medio de crio-protección)	69
12.4 Tampón de fosfatos (PB)	69
13. PUBLICACIONES	70

1. INTRODUCCIÓN

La alimentación se define como la forma y manera de proporcionar al ser vivo las sustancias que le son indispensables para mantener la salud y vida. La ingesta alimentaria se considera como una conducta y consiste en la obtención e ingestión de alimentos. Mientras que, la nutrición es el conjunto de procesos fisiológicos mediante el cual los alimentos ingeridos se transforman y se asimilan, es decir, se incorporan al organismo de los seres vivos (Mataix 2009). Una adecuada nutrición es aquella que contiene un balance entre lo que el organismo requiere y lo que gasta por sus actividades, es decir, un equilibrio entre los macronutrientes (proteínas, carbohidratos, lípidos, minerales, vitaminas) contenidos en la dieta y la energía invertida en el desarrollo de sus actividades (Mataix 2009).

Cuando no se cubren los requerimientos nutricionales mínimos necesarios a través de la dieta, se deteriora el estado nutricional promoviendo la aparición de cuadros clínicos severos como problemas de malnutrición. La malnutrición comprende cualquier alteración nutricional, tanto por consumo elevado (sobrenutrición) como por restricción (desnutrición) (Mataix 2009). Problemas de malnutrición se han asociado con trastornos metabólicos como la obesidad, la diabetes y dislipidemias. Se ha mostrado que estos trastornos promovidos por el consumo de bebidas azucaradas, son mediados a través del metabolismo hepático (Postic y cols. 2004, Yang y cols. 2012).

En particular la malnutrición por consumo elevado de carbohidratos en la dieta, provoca un aumento de tejido adiposo (Vizmanos y cols. 2006) y la manifestación de alteraciones metabólicas (diabetes tipo II, hipertensión, metabolismo anormal de lípidos y carbohidratos, enfermedad cardiovascular) (Jiménez-Cruz y cols. 2009). Estas alteraciones en conjunto se conocen como síndrome metabólico (Vegiopolus y Herzing 2007, Alkhouri y cols. 2010). Un área la cual ha recibido mucho interés en recientes años, ha sido el papel que desempeñan los glucocorticoides en el desarrollo del síndrome metabólico (Pinheiro y cols. 2009). Dentro de la maquinaria metabólica, el papel de los glucocorticoides ha sido muy poco estudiado.

Los glucocorticoides son hormonas esteroideas sintetizadas en la glándula adrenal y su secreción está regulada por la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Grasa-Martínez 2004, Pinheiro y cols. 2009). Estas hormonas son esenciales 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, Pinheiro y cols. 2009).

En la década de los 50, el descubrimiento del efecto antiinflamatorio de los glucocorticoides llevó a su prescripción en el tratamiento de enfermedades reumáticas crónicas. Actualmente, los glucocorticoides sintéticos son bastante utilizados en el tratamiento de enfermedades autoinmunes (Pinheiro y cols. 2009). No obstante, el uso crónico de glucocorticoides está asociado a resistencia a la insulina, diabetes, hipertrigliceridemia e hipertensión arterial (Nader y cols. 2012) así como en el desarrollo del síndrome de Cushing, causado por niveles elevados de cortisol en sangre, además de ser asociado con el desarrollo de esteatosis hepática en pacientes con dicho síndrome (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, inflamación ocasionada por la obesidad, factores genéticos, dietéticos y relacionados al estilo de vida parecen jugar un rol clave en su desarrollo. Recientes estudios en humanos y modelos animales sugieren que estos elementos pueden afectar la infiltración de grasa en la enfermedad del hígado no alcohólico (Nseir y cols. 2010).

1.1 Glucocorticoides

Los glucocorticoides (cortisol y corticosterona), son hormonas esteroideas (Pinheiro y cols. 2009) producidas y secretadas en la zona fasciculada de la corteza adrenal (Keegan y Hammer 2002) son esenciales para el mantenimiento y homeostasis metabólica de carbohidratos, lípidos y proteínas (Nader y cols. 2012). Su secreción está regulada por la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y sigue un ritmo circadiano que aumenta ante situaciones de estrés (Grasa-Martínez 2004).

Aproximadamente 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 β 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 a través del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Vegiopoulos y Herzig 2007). Sin embargo, hay evidencias de una síntesis local de glucocorticoides regulado por la enzima 11β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (11β -HSD) (London y cols. 2007, London y Castonguay 2009). Hay dos isoenzimas: La enzima tipo 1 (11β -HSD1) cuya función es la conversión de cortisona inactiva a cortisol activo y la enzima tipo 2 (11β -HSD2) que cataliza la inactivación de cortisol a cortisona (Seckl y cols. 2004, Tomlinson y cols. 2004).

En el hígado la activación de la enzima 11β -HSD1 amplifica la síntesis local de glucocorticoides. Se ha mostrado tanto en humanos como en roedores obesos un aumento de la enzima 11β -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 β -HSD1 extra-suprarrenal, básicamente hepática (Fernández-Vázquez y cols. 2011). Con respecto al consumo de carbohidratos, se ha mostrado que ratas que consumen sacarosa al 16 y 32% un incremento de la enzima hexosa-6-fosfato-deshidrogenasa (H6PDH) que produce un aumento de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato-oxidasa (NADPH), necesaria para la actividad oxidoreductasa de la enzima 11 β -HSD1 en tejido adiposo y por ende un aumento de la activación de cortisona (roedores) y cortisol (humanos), por lo tanto un aumento de la gluconeogénesis y biosíntesis de lípidos en hígado (London y cols. 2007). Por otra parte, se ha mostrado en ratones transgénicos ApoE-HSD1, que la sobreexpresión de la enzima 11 β -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).

1.2 Hígado

El hígado es la glándula más grande del organismo y se encuentra localizada en el hipocondrio derecho del abdomen (Fortoul y cols. 2010). El hígado se encuentra dividido en lóbulos (Tanaka y cols. 2011) y su unidad estructural 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).

Existen tres maneras de describir la estructura del hígado en términos de una unidad funcional: el lobulillo clásico, el lobulillo portal y el ácino hepático (Figura 1).

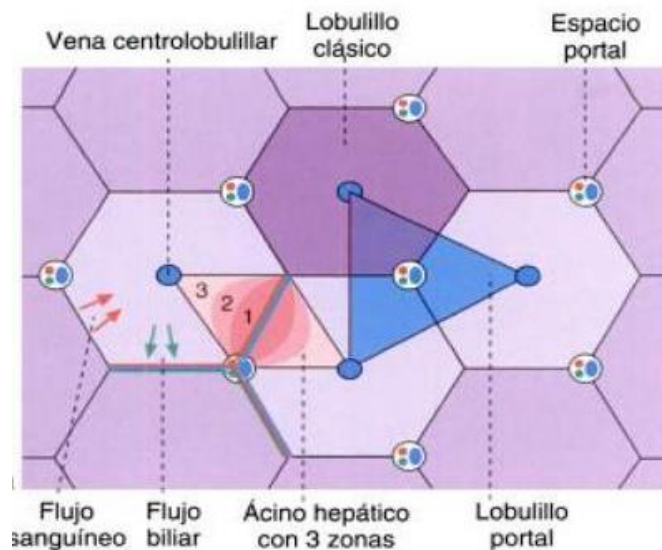


Figura 1. Representación del lobulillo clásico, portal y ácino hepático (Welsch y Sobotta 2009).

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.

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 toxicas, 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).

1.3 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 β 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 oxalacetato 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).

En este contexto, la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa es una enzima limitante en el proceso de gluconeogénesis, en condiciones normales su acción es mediada por el glucagón a través del adenosin monofosfato cíclico (AMPc) y por glucocorticoides en respuesta al ayuno favoreciendo el incremento de glucosa, mientras comidas ricas en carbohidratos aumentan la insulina y disminuyen la síntesis de dicha enzima en condiciones en donde los glucocorticoides son elevados, se ha mostrado que inducen la actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa, por lo tanto, un aumento en los glucocorticoides, inhibe la cascada de señalización de la insulina que disminuye la síntesis de glucógeno y aumenta la gluconeogénesis (Vegiopoulos y Herzig 2007). Además también se ha mostrado que en casos 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, por lo que aumentaría la gluconeogénesis (Rodes y cols. 2001, Opherk y cols. 2004, Vegiopoulos y Herzig 2007).

En particular Opherk y cols. (2004), mostraron 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 de animales con diabetes mellitus II (Vegiopoulos y Herzig 2007).

De manera específica se ha mostrado que el consumo de sacarosa en la rata 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 (Díaz-Águila 2012). Debido a que, el consumo de una dieta rica en carbohidratos lleva al incremento del tejido adiposo visceral y dada la importancia de los glucocorticoides en metabolismo hepático y de tejido adiposo, se ha mostrado que los glucocorticoides 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) (Figura 2).

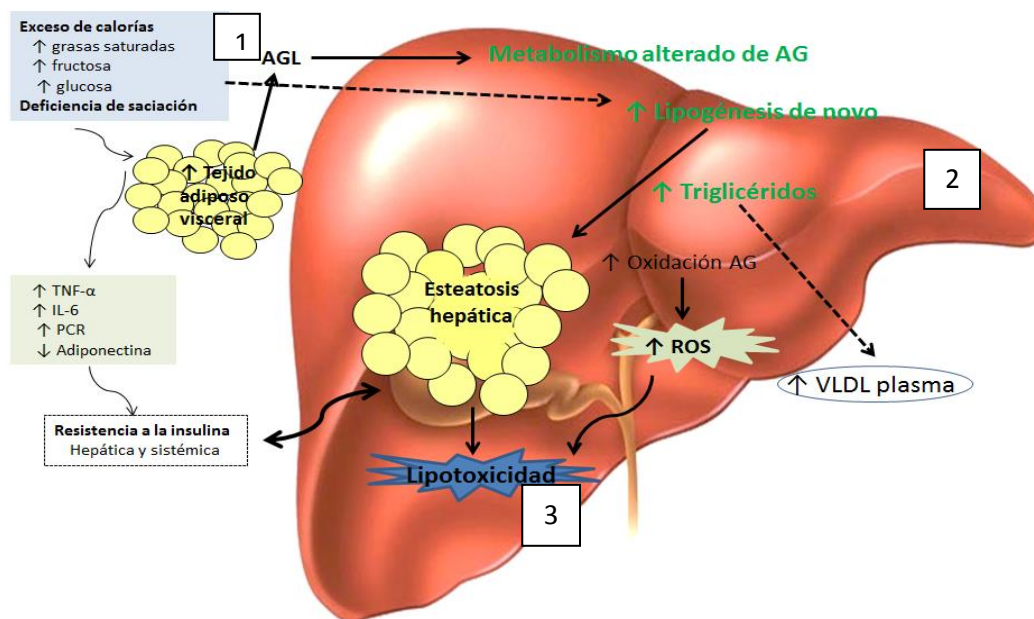


Figura 2. Proceso fisiopatológico de la esteatosis hepática no alcohólica (Modificado de Tiniakos y cols. 2010).

1.4 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).

Una de las causas primarias a las que se ha asociado el desarrollo de la enfermedad del hígado graso no alcohólico es la presencia de síndrome metabólico (Adams y cols. 2005), debido a que existe un desequilibrio entre la síntesis hepatocítica de triglicéridos a partir de ácidos grasos provenientes del tejido adiposo y de la secreción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) (Causse y cols. 1995) los cuales comienzan a almacenarse en forma de triglicéridos en hígado.

Según la morfología y tamaño de las vesículas 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 vesículas 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 β -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 Dietas ricas en carbohidratos

Dietas ricas en carbohidratos en etapas posteriores al nacimiento se han relacionado con la prevalencia de trastornos metabólicos. Se ha mostrado en la rata macho Wistar que el consumo de agua azucarada al 30% después del destete durante 18-21 semanas, ocasiona sobrepeso, obesidad abdominal, hipertensión, intolerancia a la glucosa, dislipidemias (combinación de bajas concentraciones de colesterol de alta densidad con altas concentraciones de triglicéridos y colesterol) (El Hafidi y cols. 2001, 2004, Alexander y cols. 2004, Pérez-Torres y cols. 2009). Por otro lado, en ratas hipertensas espontáneas de 12 semanas de edad, alimentadas con sacarosa al 12% durante siete semanas, mencionan modificaciones en la presión arterial, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina (Oron-Herman y cols. 2008).

Por otra parte, un estudio realizado en ratas Sprague-Dawley de 8 semanas de edad a las que se les proporciono fructosa al 60% durante 42 días, mostró un aumento de colesterol, triglicéridos e insulina, además de una afectación en la fisiología cardiaca (Delbosc y cols. 2005). Por otro lado, el grupo de Oron-Herman y cols. (2008) reportó alteraciones metabólicas en la rata Sprague-Dawley sobrealimentada a partir de la semana 12 de edad, con fructosa (60%) durante siete semanas; ellos encuentran hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, hipertensión y resistencia a la insulina. Mientras que, Miyazaki y cols. (2004) observaron que ratones alimentados con 60% de fructosa durante 7 días tienen un aumento en la expresión génica de las enzimas ácido graso sintetasa (FAS), Acil-CoA carboxilasa y la esteroil-CoA desaturasa, enzimas involucradas en el proceso de lipogénesis.

Un estudio realizado para observar la actividad y la cantidad de la expresión del mRNA de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa donde se utilizaron células aisladas de hígado de ratas Sprague-Dawley de la siguiente manera: 1) después de un ayuno de 24 h, 2) con un ayuno de 24 h seguido de una ingesta de alimento estándar por 48 h, 3) con un ayuno de 24 h seguido de una ingesta rica en carbohidratos por 48 h, 4) con una dieta estándar, y 5) con una dieta estándar seguida de una dieta rica en carbohidratos por 48 h. Se observó que la actividad de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en las células endoteliales fue de 150% mayor en el grupo con un ayuno de 24 h seguido de una ingesta rica en carbohidratos por 48 h, y del 125% en el grupo con una dieta estándar seguida de una dieta rica en carbohidratos por 48 h comparado con el grupo que solo estuvo en ayuno 24 h. La expresión del mRNA de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa fue 300% mayor en las células endoteliales del grupo con un ayuno de 24 h seguido de una ingesta rica en carbohidratos por 48 h en comparación al grupo que solo estuvo en ayuno 24 h y que no se le proporciono dieta rica en carbohidratos. En células de Kupffer, la actividad y la expresión de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa no fueron diferentes entre los grupos. En las células parénquimas, la expresión de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa fue de 700-1200% más grande en las ratas que consumieron dietas ricas en carbohidratos comparado con los controles. Estos resultados indican que una dieta rica en carbohidratos a corto plazo estimula la expresión del mRNA de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en las células endoteliales y

parenquimatosas del hígado favoreciendo la síntesis de novo de ácidos grasos (Spolarics 1999).

2.1.2 Sacarosa y esteatosis hepática

En estudios animales, utilizando la rata como modelo se ha mostrado que 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 esteatosis hepática considerada el primer estadio de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (Huang y cols. 2007, Pérez-Sánchez 2011).

Ahora bien, estudios realizados en ratones macho de la cepa C57BL/6 alimentados con una dieta alta en sacarosa (65%) durante 6 semanas, muestran desarrollo de obesidad, esteatosis hepática y resistencia a la insulina, donde además se destaca el papel que desempeña la apoptosis de los adipocitos en el reclutamiento de macrófagos del tejido adiposo e inflamación, que contribuye a la resistencia a la insulina y acumulación de lípidos hepáticos (Alkhoury y cols. 2010).

Es importante resaltar que los trabajos han sido realizados durante la edad adulta en los cuales no se ha estudiado el papel que podría estar desempeñando la corticosterona en el desarrollo de alteraciones metabólicas y su participación en el desarrollo de la esteatosis hepática desde una edad temprana. En nuestro laboratorio se ha mostrado en la rata macho Wistar que el consumo de sacarosa al 30% desde temprana edad, durante tres meses, no aumenta la concentración de corticosterona sanguínea al final del experimento, acompañada de alteraciones histológicas de la glándula adrenal. Además, hubo un aumento de tejido adiposo visceral, insulina, resistencia a insulina, triglicéridos, VLDL y leptina a los tres meses del consumo de agua azucarada (Díaz-Aguila y cols. 2012). Sin embargo, en este trabajo no se sabe qué efecto se produce sobre la concentración de corticosterona durante el consumo de sacarosa y si éste provoca esteatosis hepática a edad temprana.

2.1.3 Esteatosis hepática y glucocorticoides

Niveles elevados de glucocorticoides han sido asociados con el desarrollo de esteatosis hepática (Arnaldi y cols. 2010) y con la sensibilidad a la insulina en hígado esto debido a que

interfiere en su cascada de señalización. Es decir, los glucocorticoides se unen a la proteína quinasa C (PKC) y a la proteína quinasa terminal 1 (JNK1) el cual inhibe la fosforilación de la insulina, alterando el metabolismo de glucógeno, por lo que, la glucosa no se almacena y continúa su metabolismo en la vía de la glucólisis favoreciendo la producción de triglicéridos y la acumulación en hígado (Vegiopoulos y Herzing 2007). Sin embargo, son muy pocos los estudios que hacen referencia de un efecto directo de los glucocorticoides ante el desarrollo de esta patología. En pacientes con síndrome de Cushing se ha mostrado la acumulación de grasa hepática (Vegiopoulos y Herzig 2007). Por otra parte, la acumulación intracitoplasmática de triglicéridos también ha sido observada en cultivos de hepatocitos de rata a los que se les administran glucocorticoides (Giudetti y Gnoni 1998).

En ratas 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 ratas macho Wistar a las que se también se les administró dexametasona durante un mes, desarrollaron 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).

3. JUSTIFICACIÓN

Los trastornos metabólicos resultan de la combinación de varios factores ambientales, genéticos y sociales que son influenciados por el consumo de comida en exceso y el gasto de energía (London y cols. 2007, Ando y Fujita 2009, Nseir y cols. 2010).

Muchos de estos trastornos, ocasionados por el consumo de bebidas azucaradas son mediados a través del metabolismo hepático. En seres humanos, estudios epidemiológicos correlacionan la presencia de obesidad infantil con el consumo elevado de azúcares refinados (sacarosa y fructosa) a edades tempranas que conllevan a diversas alteraciones relacionadas con la presencia de síndrome metabólico (Rojas y cols. 2008). Lo que indica que el consumo regular de bebidas endulzadas con azúcar, especialmente entre las comidas, pueden poner a los niños en mayor riesgo de obesidad en la infancia, debido a que existe una asociación positiva entre el consumo de bebidas endulzadas con azúcar y el peso corporal en edad preescolar (Dubois y cols. 2007).

Por otra parte, se ha mostrado un incremento en la apoptosis de los adipocitos tanto en humanos como en roedores obesos que ocasionan un reclutamiento de macrófagos en el tejido adiposo, un enlace clave entre obesidad, resistencia a la insulina y esteatosis hepática (Alkouri y cols. 2010). Además, también se ha reportado que el aumento de glucocorticoides es suficiente para provocar resistencia a la insulina, esteatosis hepática e incremento en la síntesis de lípidos hepáticos y depósitos de grasa abdominal, mientras que la grasa periférica es menos afectada (Vegiopoulos y Herzig 2007, Saiah 2008).

Sin embargo, no hay estudios que reporten los daños ocasionados en el hígado y los niveles de la concentración de corticosterona debido al consumo elevado de bebidas azucaradas a temprana edad. Dado que recientes evidencias sugieren que elevadas concentraciones de glucocorticoides pueden ser predictivos para la producción de esteatosis hepática (London y cols. 2007) y al no haber alteraciones en la concentración de corticosterona estaría ausente la esteatosis hepática, por ello, estamos interesados en estudiar de manera sistemática como afecta el consumo de sacarosa los niveles de corticosterona sérica y si el consumo de sacarosa provoca esteatosis hepática a temprana edad.

4. HIPÓTESIS

El consumo elevado de sacarosa a temprana edad provoca una disminución de corticosterona y un daño hepático en la rata.

5. OBJETIVOS

5.1 General

Determinar si el consumo elevado de sacarosa a temprana edad disminuye la concentración de corticosterona e induce un daño hepático en la rata.

5.2 Específicos

1. Determinar la concentración de corticosterona sérica en función del tiempo y tratamiento
2. Determinar el nivel de daño hepático en función del tiempo y tratamiento

Se adicionó la cuantificación de tejido adiposo que servirá para la interpretación de los resultados.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Manejo de los animales

Se utilizaron 36 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 en jaulas independientes mantenidas en condiciones de bioterio, con un fotoperiodo de 12/12 h, con ciclo luz-oscuridad invertido y temperatura de 20 ± 2 °C. Las ratas fueron divididas en tres grupos: El grupo 1, consumieron agua con sacarosa por un mes, el grupo 2, consumieron agua con sacarosa por dos meses y el grupo 3, consumieron agua con sacarosa por tres meses, cada grupo con su respectivo grupo control, n=6 (Figura 3).

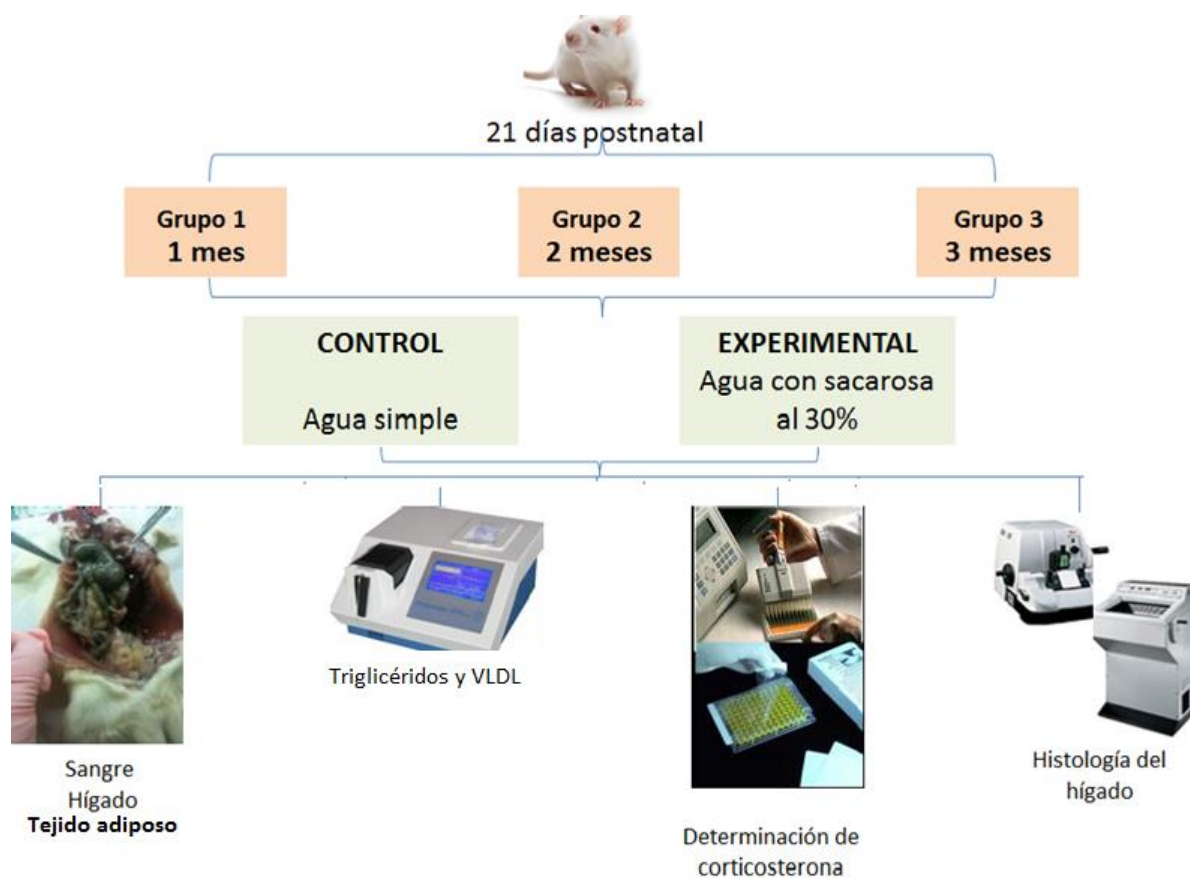


Figura 3. Diseño experimental: ratas control (C n=6) y ratas con agua con sacarosa 30% (A30 n=6).

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 de tratamiento, 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.

Nutrimento	Porcentaje (%)	Kcal
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 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 multiplico 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.

6.4 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 todas las ingestas se promediaron para obtener los gramos (g) 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 muestras sanguíneas, hígado y tejido adiposo

Las ratas controles como las experimentales fueron sacrificadas por decapitación para coleccionar dos tubos (13 x 100mm) de sangre. La sangre se dejó reposar en baño maría durante 15 minutos a 35°C, después se centrifugó a 2500 rpm durante 15 minutos. El suero fue separado haciendo alícuotas de 300 µl de suero las cuales se conservaron en congelación a -30°C. Ese mismo día se utilizó una alícuota para determinar la concentración triglicéridos. Posteriormente se utilizó una alícuota para determinar las concentraciones sanguíneas 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 tejido adiposo fue extraído y pesado.

6.6 Determinaciones bioquímicas

Para la determinación de triglicéridos se utilizó un método colorimétrico enzimático (glicerolfosfato oxidasa). Según el procedimiento No. 2100 del Stanbio Triglicéridos liquicolor (LINCON Laboratorios). Se preparó previamente el buffer (cat No. 2102), por cada 5 ml de éste, se adicionaron 50 µl de activador (cat No. 2102), se mezcló y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de utilizarlo. Se agregó en el tubo Eppendorf 5 µl de muestra sanguínea y 500 µl de buffer. Se agitaron en vortex y se dejaron reposar por 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizó la lectura en un espectrofotómetro a 492 nm.

Una vez teniendo los datos de la concentración de triglicéridos totales (que circulan unidas a las VLDL) se estimó el colesterol asociado a las VLDL (CVLDL) según la fórmula:
[CVLDL] = [TG]/5 (Friedewald y cols. 1972).

6.7 Análisis histológico del hígado

A partir de una porción del lóbulo menor (Figura 5) del hígado, los tejidos fueron procesados con Bouin durante 24 h. Posteriormente, fueron deshidratados con alcohol etílico en concentraciones ascendentes desde 60, 80, 96 y 100%, se aclararon en xileno y fueron incluidos en paraplast X-tra. La otra porción del lóbulo menor se colocó en sacarosa al 30% como medio de crio-protección. Se obtuvieron cortes histológicos longitudinales de siete y 15 μm de espesor con un micrótopo y un criostato, respectivamente, ocho cortes de cada animal. Se colocaron en dos portaobjetos, cuatro cortes por laminilla. Una laminilla fue teñida con hematoxilina-eosina, posteriormente se tomaron fotografías con una cámara OLYMPUS de 5.1 mega píxeles, montada en un microscopio óptico Zeiss Imager A.1 (a 400 aumentos totales). Para analizar el área citoplasmática se utilizó un analizador de Imágenes AxioVision REL 4.6 (Zeiss Inc 2007) (Figura 6). La segunda laminilla fue teñida con rojo oleoso para determinar el contenido de grasa en la célula hepática.

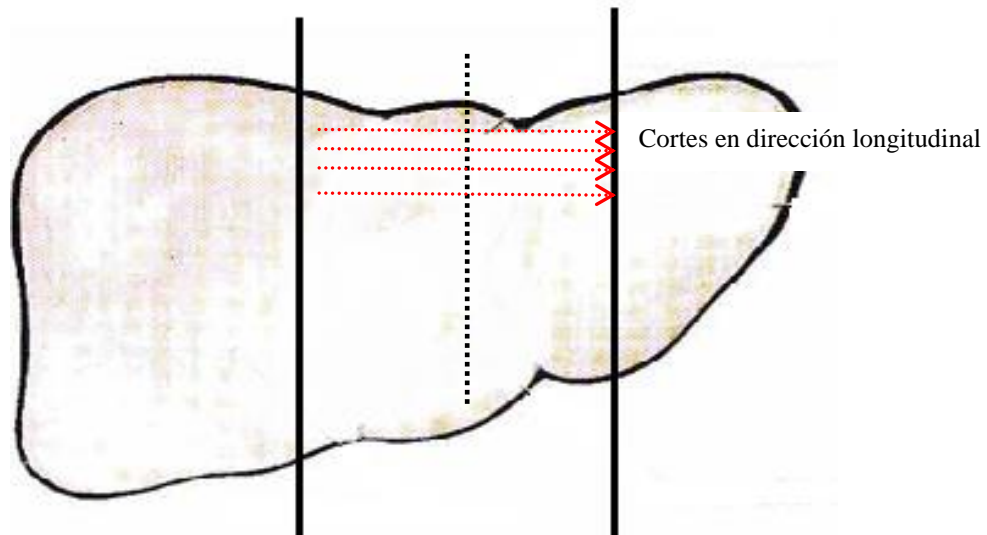


Figura 5. Obtención de cortes de hígado para análisis estadístico

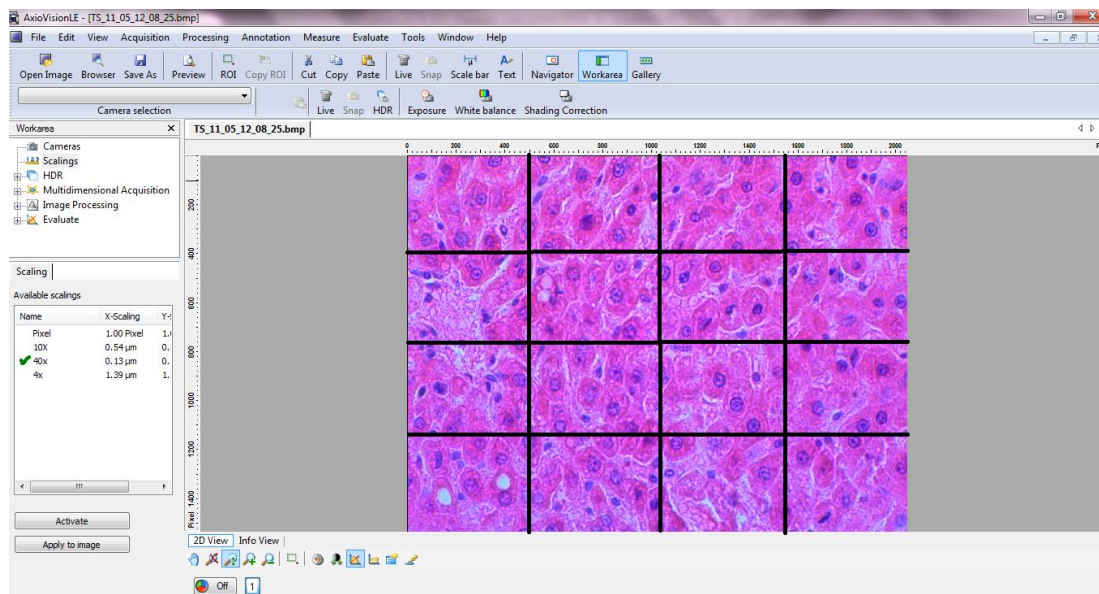


Figura 6. Medición del área de las células

6.8 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 a hacer la contratinción con hematoxilina de Harris por cinco minutos. Finalmente se procedió a lavar con agua destilada y montar con glicerina.

6.9 Determinación de corticosterona sérica

El análisis de corticosterona se realizó por el método de ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) por medio de kits disponible comercialmente, Kit Enzyme Immunoassay, compañía Assay Desing No.900-097, la sensibilidad del ensayo es de 2.11pg/ml Intraensayo y 5.32 pg/ml Interensayo y el porcentaje de recuperación fue del 70%. Los estándares y las muestras se corrieron por duplicado.

6.10 Análisis estadístico

Los valores obtenidos se analizaron en una base de datos por medio del programa GraphPad Prisma 5.01 y GB-STAT 6.0. A través de una prueba de *t*-Student no pareada, ANOVA de dos vías y Bonferroni como prueba post-hoc ($p < 0.05$). Todos los datos representan la media \pm e.e.

7. RESULTADOS

7.1 Peso corporal y alimento de las ratas

En la tabla 2 se muestra el peso corporal, consumo de alimento, agua y calorías durante los tres meses de tratamiento. Observándose un menor consumo de alimento en las ratas que consumieron agua con sacarosa (A30) a lo largo del experimento comparado con sus animales control (C), mientras que, en el consumo de agua no hubo diferencias significativas. Sin embargo, el consumo de calorías fue mayor en los animales experimentales sin encontrar diferencias en el peso corporal a lo largo del experimento.

Variables	GRUPO 1		GRUPO 2		GRUPO 3	
	Control (C)	Experimental (A30)	Control (C)	Experimental (A30)	Control (C)	Experimental (A30)
Peso corporal inicial (g)	91.04±7.23	89.85±6.61	89.60±3.75	97.25±10.51	86.91±9.35	89.94±6.76
Peso corporal final (g)	186.2±6.59	186.8±11.86	287.6±14.47	291.5±8.28	345.9±16.72	393.9±25.84
Ingesta de alimento (g/día/100g de peso corporal)	10.86±0.69	5.66±0.18***	8.52±0.23	3.28±0.18***	6.93±0.24	2.59±0.22***
(equivalente en Kcal)	36.93±2.35	19.25±0.63***	28.98±0.78	11.17±0.60***	23.57±0.83	8.797±0.77***
Consumo de agua (ml/día/100 g de peso corporal)	26.24±2.05	29.33±1.36	20.84±1.30	22.98±0.78	18.33±1.55	19.29±1.84
(equivalente en kcal)	0	35.20±1.63	0	27.58±0.94	0	23.14±2.21
Kcal totales (kcal/día/100 g de peso corporal)	36.93±2.35	54.45±1.92***	28.98±0.78	38.75±0.92***	23.57±0.83	31.94±1.63**

Tabla 2. Peso corporal, consumo de alimento y agua e ingesta de calorías totales por grupo. Se muestra media ± e.e. Diferencias estadísticamente significativas comparado con su respectivo grupo control durante el tratamiento (** $p \leq 0.001$, *** $p \leq 0.0001$, *t*-Student). C (n=6) y A30 (n=6).

7.2 Peso del tejido adiposo

La tabla 3 muestra el peso del tejido adiposo total y el contenido en cada uno de los órganos que se encuentran cubiertos por tejido adiposo, mostrándose una mayor cantidad de tejido adiposo perirrenal en los animales experimentales del Grupo 1, sin embargo estas diferencias

no persisten en el segundo mes de consumo de agua con sacarosa, mientras que es en el tercer mes donde se observa que las ratas experimentales tienen una mayor acumulación de tejido adiposo total comparado con los animales controles.

Variables	GRUPO 1		GRUPO 2		GRUPO 3	
	Control (C)	Experimental (A30)	Control (C)	Experimental (A30)	Control (C)	Experimental (A30)
Tejido adiposo total (g)	2.85±0.72	3.81±0.37	6.92±0.59	6.60±0.7819	8.40±0.99	19.62±2.96**
Pericardio (g)	0.18±0.03	0.54±0.13	0.45±0.043	0.50±0.82	0.38±0.04	0.63±0.80*
Perirrenal (g)	0.37±0.84	0.47±0.07*	0.57±0.13	0.68±0.07	0.65±0.09	1.87±0.32*
Visceral (g)	0.62±0.12	1.22±0.33	2.70±0.30	3.02±0.47	3.21±0.73	10.52±1.48**
Gonadal (g)	1.68±0.54	1.58±0.29	3.50±0.49	3.40±0.72	3.33±0.51	5.55±0.95

Tabla 3. Contenido de tejido adiposo. Se muestra media ± e.e. Diferencias estadísticamente significativas comparado con su respectivo control durante el tratamiento (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$, *t*-Student). C (n=6) y A30 (n=6).

El índice de adiposidad total en el **Grupo 1** para las ratas C fue de 1.49 ± 0.34 y de 2.06 ± 0.21 en las ratas A30. En el **Grupo 2** para las ratas C fue de 2.40 ± 0.17 y de 2.24 ± 0.20 en las ratas A30, mientras que en el **Grupo 3** para las ratas C fue de 2.49 ± 0.33 y de 4.85 ± 0.46 en las ratas A30. El análisis estadístico mostro un mayor índice de adiposidad total en las ratas experimentales de tres meses debido al consumo elevado de sacarosa ($F_{1,2}=15.87$, $p=0.0004$) y al tiempo de tratamiento ($F_{1,2}=16.34$, $p<0.0001$). Mostrando una interacción entre los dos factores ($F_{1,2}=4.92$, $p=0.0142$) en los animales experimentales del Grupo 3 comparados con sus controles ($p<0.01$, Figura 7).

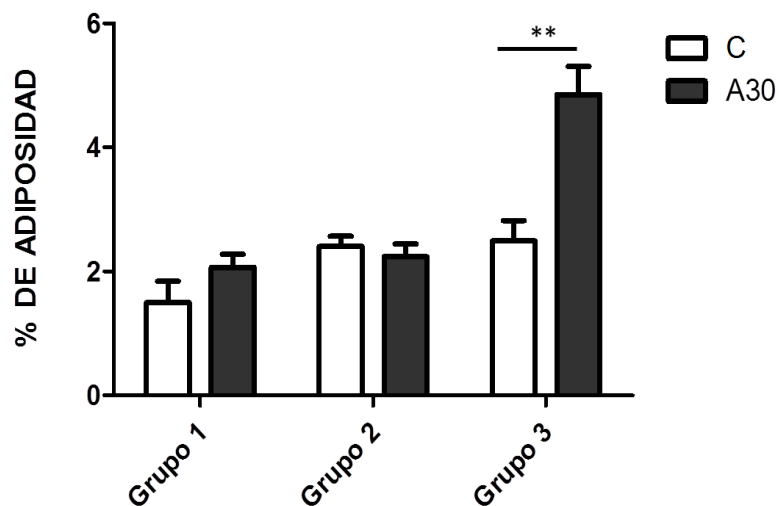


Figura 7. Índice de adiposidad total. Se muestra la media \pm e.e. Se encontraron diferencias altamente significativas por la dieta y el tiempo de tratamiento, mostrando diferencias al tercer mes de tratamiento entre las ratas control y experimentales (** $p \leq 0.01$) sin observar diferencias en el primer y segundo mes de tratamiento. ANOVA de dos vías, Bonferroni post hoc. C (n=6) y A30 (n=6).

Tratamiento $F_{1,2}=15.87$, $p=0.0004$

Tiempo $F_{1,2}=16.34$, $p<0.0001$

Interacción $F_{1,2}=4.92$, $p=0.0142$

En la figura 8 se pueden observar las fotografías de las ratas colocadas en posición supina exponiendo el tejido adiposo visceral. Se observa una mayor acumulación de tejido adiposo en la rata experimental del Grupo 3 comparado con su control.

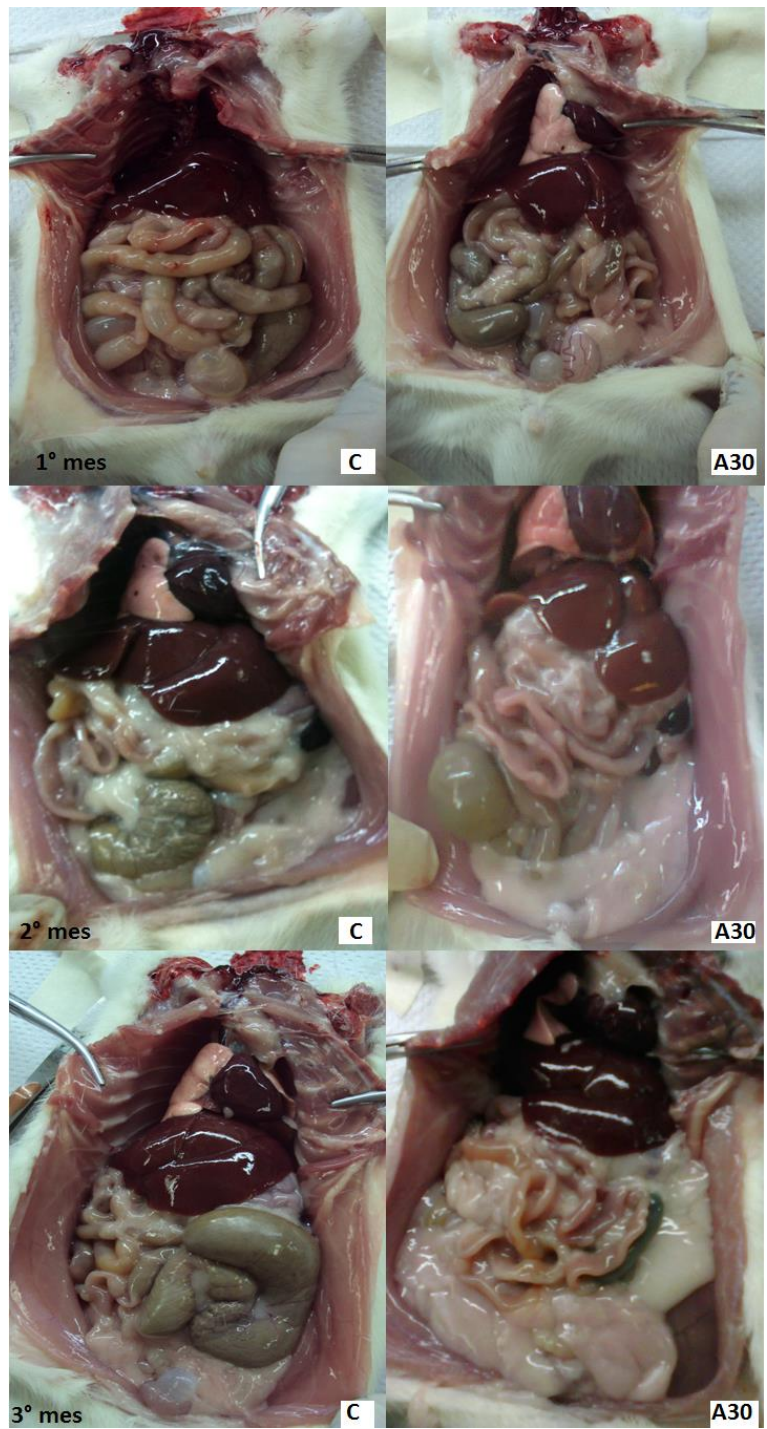


Figura 8. Fotografías exponiendo el tejido adiposo visceral en los tres grupos de tratamiento. C (n=6) y A30 (n=6).

7.3 Parámetros bioquímicos al sacrificio

7.3.1 Triglicéridos

Los niveles de triglicéridos séricos en el **Grupo 1** en las ratas C fue de 46.17 ± 2.39 mg/dl y de 45 ± 2.57 mg/dl en las ratas A30. En el **Grupo 2** los niveles de triglicéridos en las ratas C fue de 42 ± 4.26 mg/dl y de 46 ± 2.71 mg/dl en las A30. Mientras que en el **Grupo 3** las ratas C tuvieron niveles de 41.33 ± 3.99 mg/dl y las ratas A30 de 68.83 ± 7.16 mg/dl. Mostrando que los niveles de triglicéridos séricos es mayor por efecto del consumo elevado de sacarosa ($F_{1,2}=5.036$, $p=0.032$) y el tiempo de tratamiento ($F_{1,2}=4.678$, $p=0.017$). Mostrando una interacción entre los dos factores ($F_{1,2}=7.957$, $p=0.0017$) en las ratas experimentales del Grupo 3 comparado con sus controles ($p<0.01$, Figura 9).

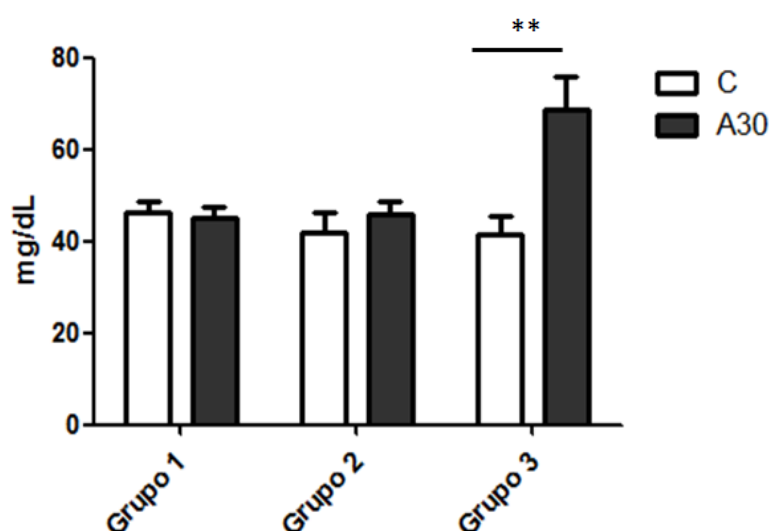


Figura 9. Niveles de triglicéridos séricos. Se muestra la media \pm e.e. Se encontraron diferencias significativas por el tiempo y tratamiento, mostrando diferencias entre las ratas C y A30 a los tres meses de tratamiento (** $p<0.01$) sin observar diferencias en el primero y segundo mes de tratamiento. ANOVA de dos vías, Bonferroni post hoc. CC (n=6) y A30 (n=6).

Tratamiento $F_{1,2}=5.036$, $p=0.032$

Tiempo $F_{1,2}=4.678$, $p=0.017$

Interacción $F_{1,2}=7.957$, $p=0.0017$

7.3.2 VLDL

Los niveles séricos de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) en el **Grupo 1** de las ratas C fue de 9.23 ± 0.48 mg/dl y de 9 ± 0.51 mg/dl en las ratas A30. En el **Grupo 2** los niveles de

VLDL en las ratas C fue de 8.4 ± 0.85 mg/dl y de 9.2 ± 0.54 mg/dl en las A30. Mientras que en el **Grupo 3** los niveles de VLDL en las ratas C fue de 8.27 ± 0.79 mg/dl y de 13.77 ± 1.43 mg/dl en las ratas A30. Mostrando que los niveles séricos de lipoproteína de baja densidad son significativamente mayores por efecto del consumo de sacarosa ($F_{1,2}=5.515$, $p=0.0256$) y el tiempo de tratamiento ($F_{1,2}=4.859$, $p=0.0149$). Mostrando una interacción entre los dos factores ($F_{1,2}=7.408$, $p=0.0024$) en las ratas experimentales del Grupo 3 comparado con sus controles ($p<0.01$, Figura 10).

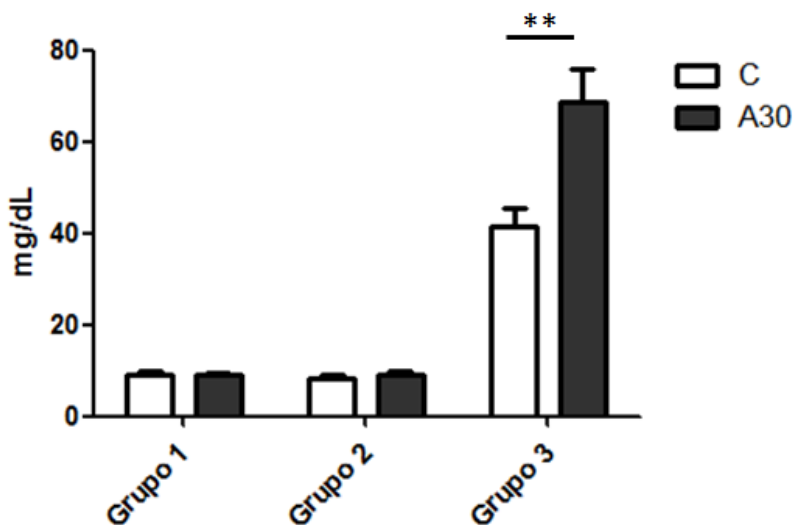


Figura 10. Niveles séricos de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Se muestra la media \pm e.e. Se encontraron diferencias significativas por la dieta y el tiempo de tratamiento, mostrando diferencias entre las ratas C y A30 a los tres meses de tratamiento (** $p<0.01$) sin observar diferencias en el primero y segundo mes. ANOVA de dos vías, Bonferroni post hoc. CC (n=6) y A30 (n=6).

Tratamiento $F_{1,2}=5.515$, $p=0.0256$

Tiempo $F_{1,2}=4.859$, $p=0.0149$

Interacción $F_{1,2}=7.408$, $p=0.0024$

7.4 Peso del hígado

El peso del hígado en las ratas C del **Grupo 1** fue de 7.03 ± 0.49 g y de 7.12 ± 0.57 g en las ratas A30. En el **Grupo 2** el peso del hígado en las ratas C fue de 9.0 ± 0.53 g y de 9.47 ± 0.28 g en las ratas A30. En el **Grupo 3** el peso del hígado de las ratas C fue de 10.18 ± 0.80 g y de 11.48 ± 0.92 g en las ratas A30.

En la figura 11 se muestra el peso del hígado, observándose diferencias entre grupos debido al consumo de agua con sacarosa ($F_{1,2}=24.719$, $p<0.0001$) y el tiempo de tratamiento ($F_{1,2}=4,532$, $p=0.0191$). No hubo interacción entre los dos factores ($F_{1,2}=0.1862$, $p=0.8305$). Las diferencias no fueron significativas entre animales controles y experimentales del mismo grupo.

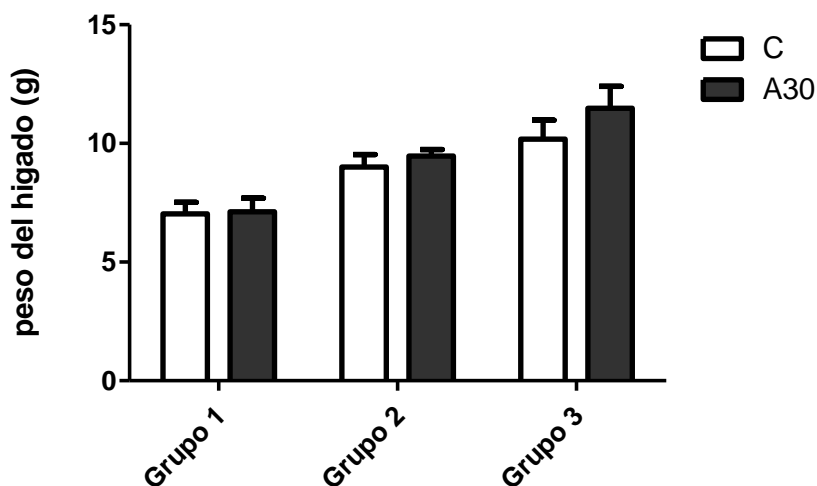


Figura 11. Peso del hígado. Se muestra la media±e.e. Se encontraron diferencias significativas por la dieta y el tiempo de tratamiento, que influyen en el peso del hígado a lo largo de su desarrollo. ANOVA de dos vías, Bonferroni post hoc. C (n=6) y A30 (n=6).
 Tratamiento $F_{1,2}=24.719$, $p<0.0001$
 Tiempo $F_{1,2}=4,532$, $p=0.0191$
 Interacción $F_{1,2}=0.1862$, $p=0.8305$

7.5 Análisis histológico del hígado

En las microfotografías de los cortes histológicos de los hígados teñidos con hematoxilina-eosina del Grupo 1, se observó 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, los sinusoides se encuentran compactados y con células de Kupffer (Figura 12). Por otra parte, en las ratas A30 se observó la proliferación de células linfáticas: neutrófilos, eosinófilos y basófilos (células granulosa) y linfocitos indicando el inicio de un proceso inflamatorio además de la presencia de vacuolas de grasa alrededor del núcleo en algunos hepatocitos que indican el inicio de hígado graso no alcohólico (Figura 12).

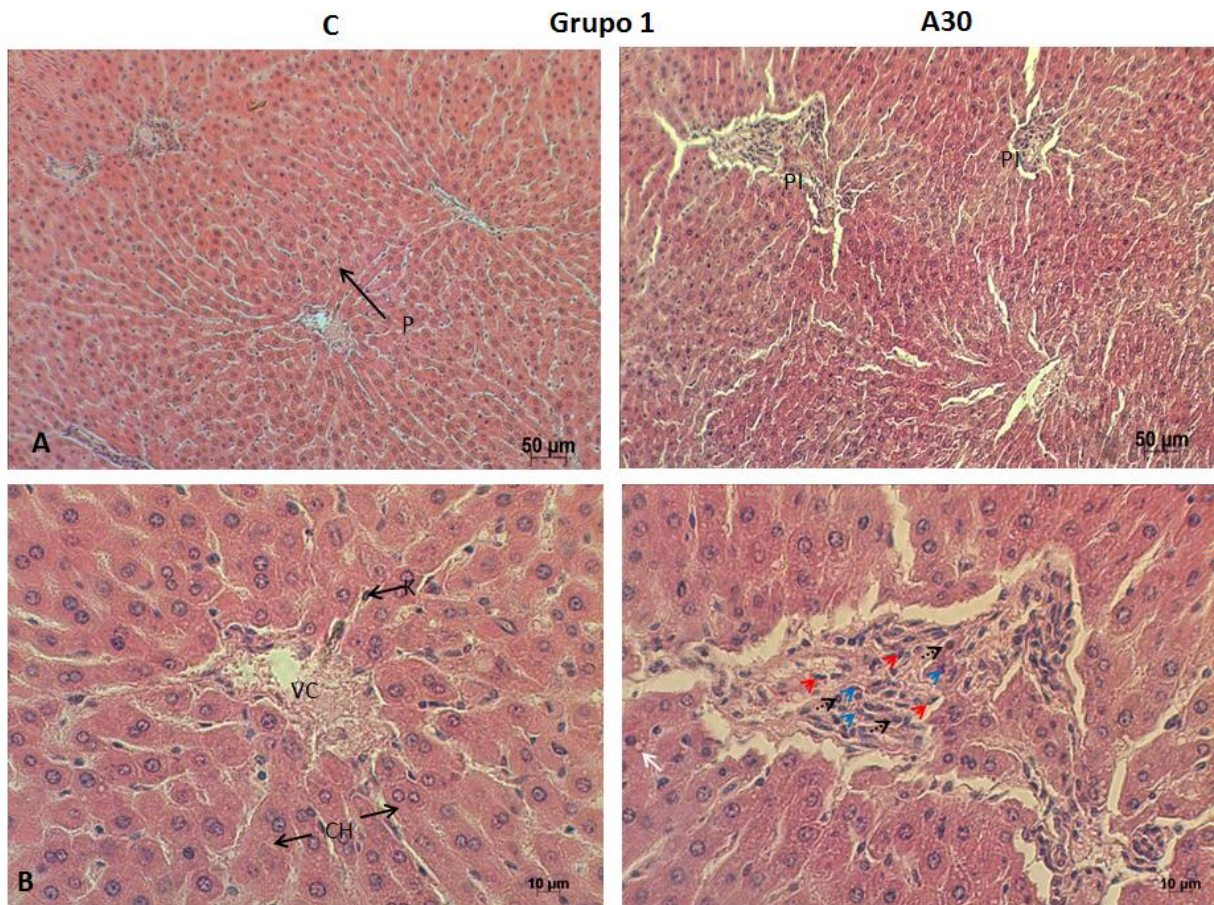


Figura 12. A Microfotografías de los cortes histológicos del hígado (C y A30). En los animales C se muestra la citoarquitectura normal del parénquima (P) y en los animales A30 se observa el inicio de un proceso inflamatorio (10x). B. En los animales C se observa la vena central (VC), cordones hepáticos (CH) y células de Kupffer, mientras que en las ratas A30 se observan neutrófilos (→), eosinófilos (→), linfocitos (···▶) y vacuolas de grasa (■) (40x), teñidos con hematoxilina- eosina.

En el grupo 2 las ratas C mantienen las características de un parénquima conservado (Figura 13), sin embargo los cortes histológicos de las ratas A30 muestran que el proceso inflamatorio persiste debido al aumento de células granulosas y linfocitos que se hace más evidente por el acomodo de los cordones hepáticos ya que pierden su estructura debido a que el tamaño de los sinusoides también aumenta (Figura 13).

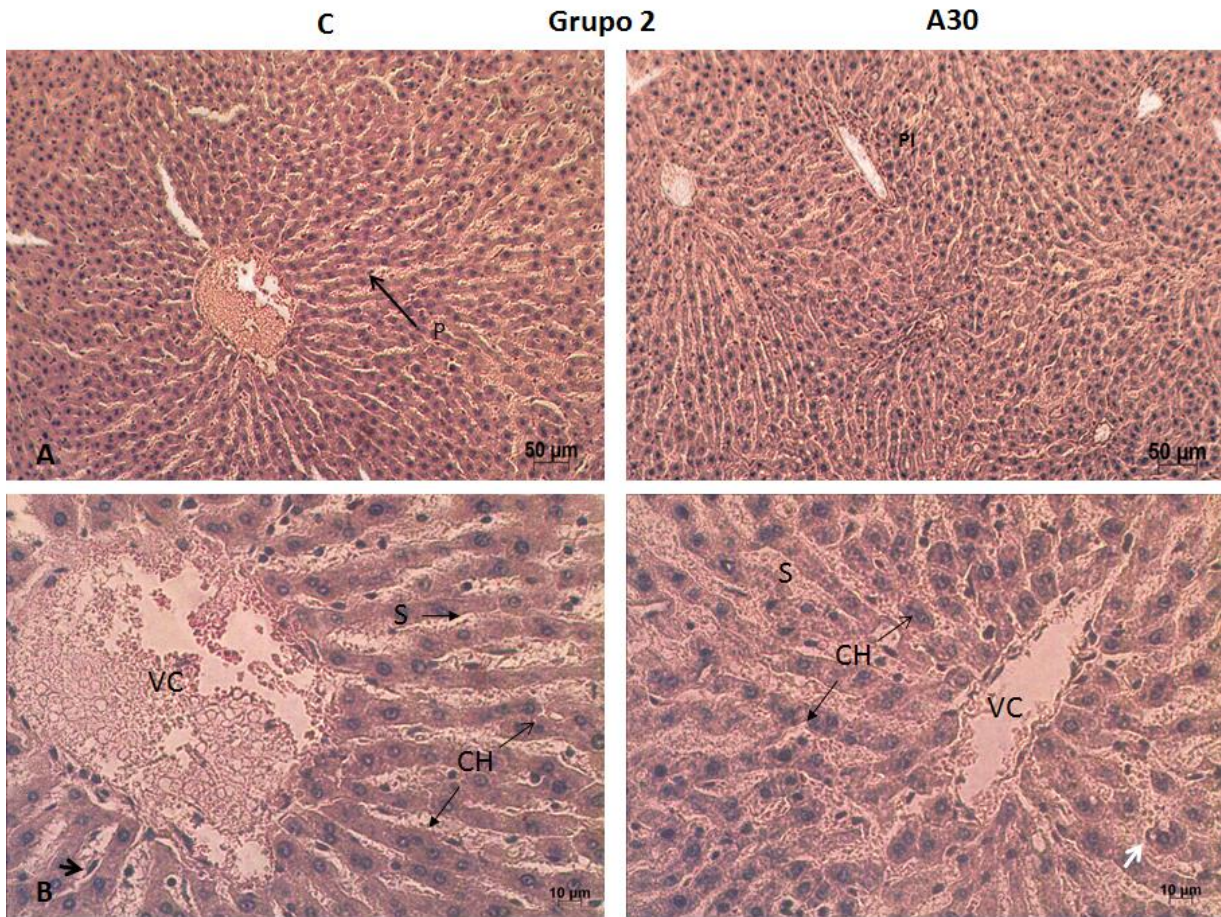


Figura 13. A. Microfotografías de los cortes histológicos del hígado (C y A30). En los animales C se observa un parénquima normal (P) y en los A30 un proceso inflamatorio (PI) y alteración del parénquima (10x). **B.** En los animales C se observa la vena central (VC), los cordones hepáticos (CH) bien estructurados, sinusoides (S), y células de Kupffer (→) mientras que, en las ratas A30 los cordones hepáticos pierden su estructura y los espacios sinusoidales se hacen más grandes, hay evidencia de la presencia de vesículas de grasa (↔) (40x), teñidos con hematoxilina-eosina.

En las ratas C del grupo 3, también se observó un parénquima conservado, mientras que en los animales A30 se observó una congestión de eritrocitos en los sinusoides, cambios en la disposición de los cordones hepáticos y el desarrollo de un franco proceso inflamatorio en el parénquima debido a un aumento en el número de células granulosas (Figura 14). Se observaron eritrocitos fuera de los sinusoides y una mayor presencia de grasa en el citoplasma de los hepatocitos que se evidencia por la elaboración de H-E y corroborada con la técnica de rojo oleoso (Figura 15). La presencia de hepatocitos agrandados y globosos también fue

evidente. Por lo que es hasta el tercer mes de tratamiento donde se establece el desarrollo de una esteatosis grado 1 además de un engrosamiento de la capa intima en la zona perivenular debido al proceso inflamatorio que nos podría estar indicando que el tejido está sufriendo un daño bioquímico (Figura 16).

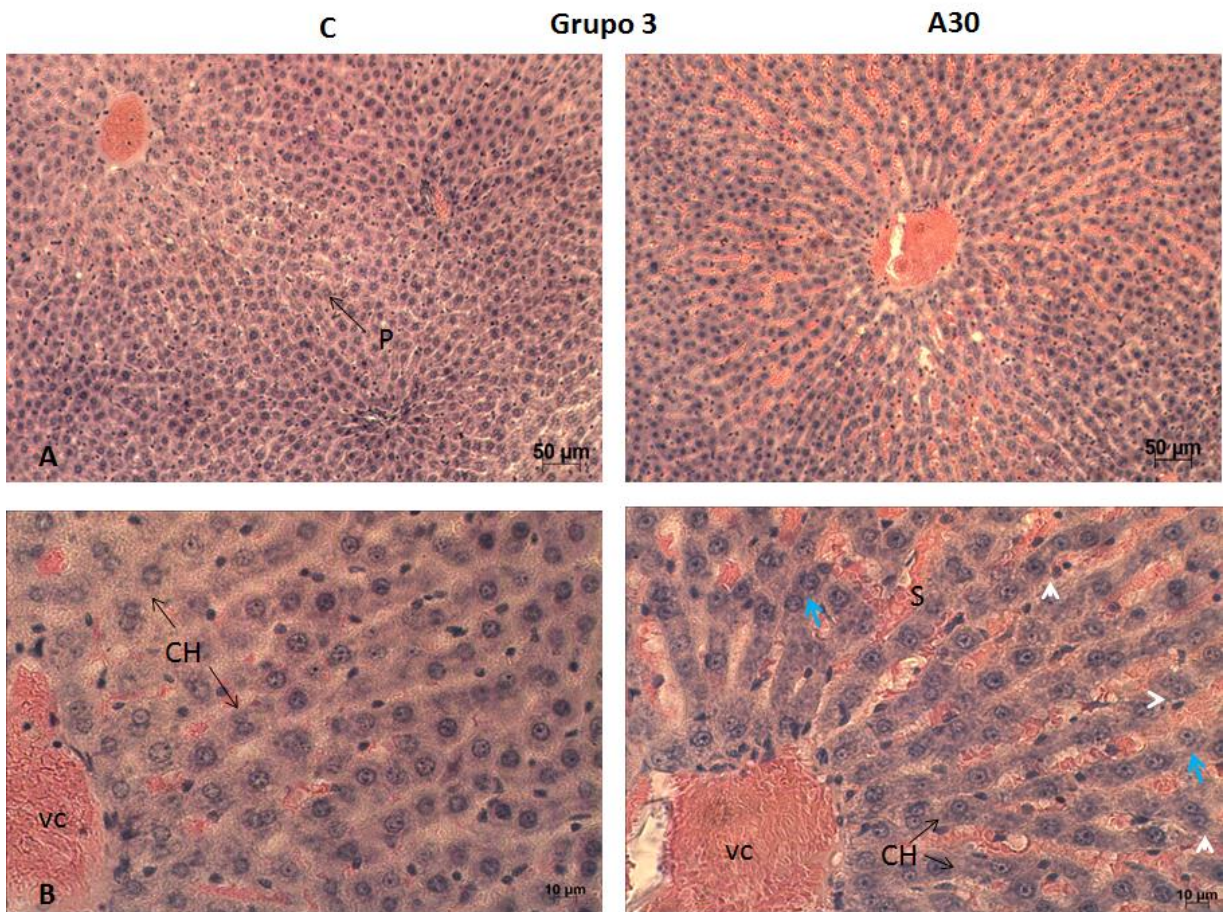


Figura 14. **A.** Microfotografías de los cortes histológicos del hígado (C y A30). En los animales C se observa un parénquima normal (P), mientras que en los A30 hay una congestión en el parénquima (10x). **B.** En los animales C se observa la vena central (VC), los cordones hepáticos (CH) bien estructurados y los sinusoides (S). mientras que, en las ratas A30 los cordones hepáticos pierden su estructura y los espacios sinusoidales se hacen más grandes, hay presencia de microvesículas de grasa alrededor del núcleo de los hepatocitos (▬) además de hepatocitos en forma de balón (▶) indicador de la presencia de una esteatosis grado 1 (40x), teñidos con hematoxilina-eosina.

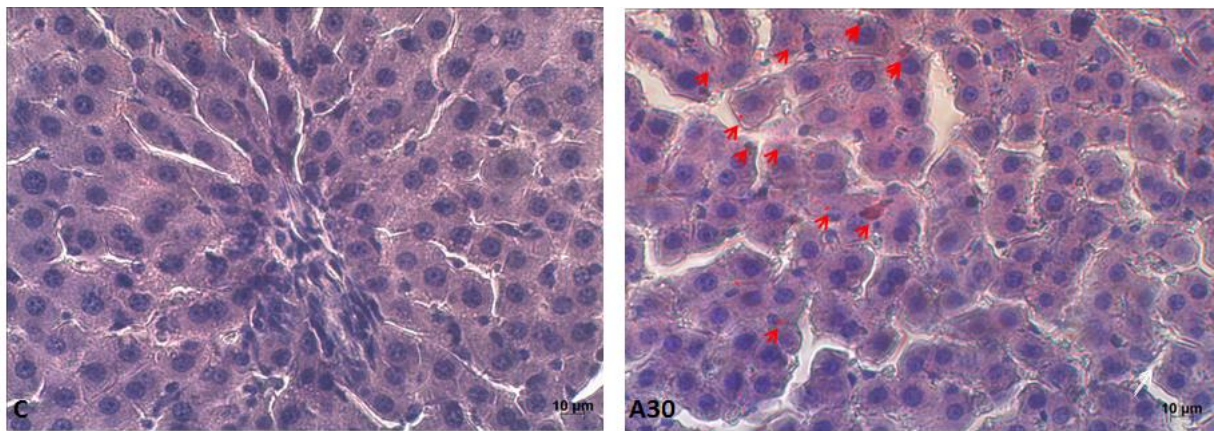


Figura 15. Microfotografías de los cortes histológicos del hígado (C y A30). En los animales A30 la flecha roja indica la presencia de microvesículas de grasa alrededor del núcleo de los hepatocitos (40x), teñidos con rojo oleoso.

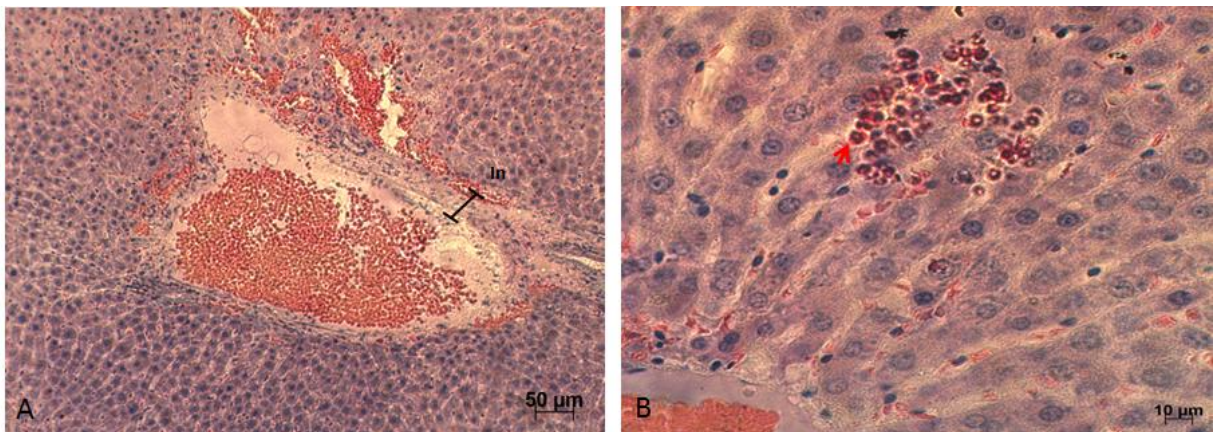


Figura 16. Microfotografías de los cortes histológicos del hígado (A30). En la figura **A** se observa el inicio de un engrosamiento de la capa íntima en la zona perivenular (In) (40x). En la figura **B** la flecha roja indica la ubicación de eritrocitos fuera de los sinusoides en los animales A30 (40x), teñidos con hematoxilina-eosina

En la tabla 4 se puede observar la magnitud del daño hepático debido a la presencia de grasa en los hepatocitos y el grado de inflamación en el tejido hepático debido al consumo de sacarosa a temprana edad en 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).

Tratamiento	Control (C)		Experimental (A30)	
	Grasa	Inflamación	Grasa	Inflamación
Grupo 1	0	0	0	1
Grupo 2	0	0	0	1
Grupo 3	0	0	1	2

Tabla 4. Evaluación histológica de presencia de grasa y cambios inflamatorios en el hígado. El valor de 0, representa ausencia de inflamación o lípidos; 1, daño escaso; 2, presencia moderada de lípidos e inflamación; 3, inflamación severa y presencia abundante de lípidos.

7.5.1 Área citoplasmática

El área citoplasmática en el *Grupo 1* en las ratas C fue de $177 \pm 10.14 \mu\text{m}^2$ y para las ratas A30 fue de $178 \pm 11.59 \mu\text{m}^2$, en el *Grupo 2* en las ratas C fue de $175.3 \pm 8.09 \mu\text{m}^2$ y en las ratas A30 fue de $168 \pm 8.13 \mu\text{m}^2$, finalmente el *Grupo 3* presento un área de $203.9 \pm 15.98 \mu\text{m}^2$ en las ratas C y de $195.6 \pm 7.97 \mu\text{m}^2$ en las ratas A30. Mostrando que el área citoplasmática no fue afectada por el consumo de agua con sacarosa ($F_{1,2}=1.994$, $p=0.1682$) ni el tiempo de tratamiento ($F_{1,2}=1.552$, $p=0.2283$). No hubo interacción entre los dos factores ($F_{1,2}=1.519$, $p=0.2353$, Figura 17).

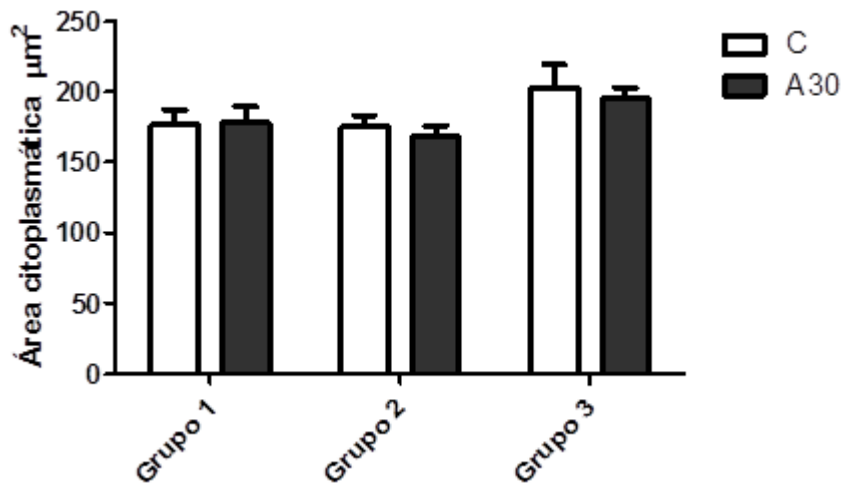


Figura 17. Área citoplasmática. Se muestra la media \pm e.e. No se encontraron diferencias significativas por la dieta ni el tipo de tratamiento. ANOVA de dos vías, Bonferroni post hoc. C (n=6) y A30 (n=6).

Tratamiento $F_{1,2}=1.994$, $p=0.1682$

Tiempo $F_{1,2}=1.552$, $p=0.2283$

Interacción $F_{1,2}=1.519$, $p=0.2353$

7.6 Corticosterona sérica

La concentración de corticosterona sérica en el **Grupo 1** para las ratas C fue de 141.20 ± 35.03 pg/ml y de 47.14 ± 12.27 pg/ml en las ratas A30. En el **Grupo 2** la concentración de corticosterona en las ratas C fue de 130.20 ± 8.41 pg/ml y de 38.45 ± 11.19 pg/ml en las ratas A30. Mientras que, en el **Grupo 3** la concentración de corticosterona en las ratas C fue de 80.90 ± 8.91 pg/ml y de 39.77 ± 11.16 pg/ml en las ratas A30. El análisis estadístico mostro una disminución significativa en la concentración de corticosterona sérica en las ratas experimentales comparadas con sus animales control en los tres grupos ($p<0.0001$), debido al consumo de sacarosa ($F_{1,3}=28.97$, $p<0.0001$) pero no al tiempo de tratamiento ($F_{1,3}=2.044$, $p=0.1514$). No hubo interacción entre los dos factores ($F_{1,3}=1.510$, $p=0.2411$; Figura 18).

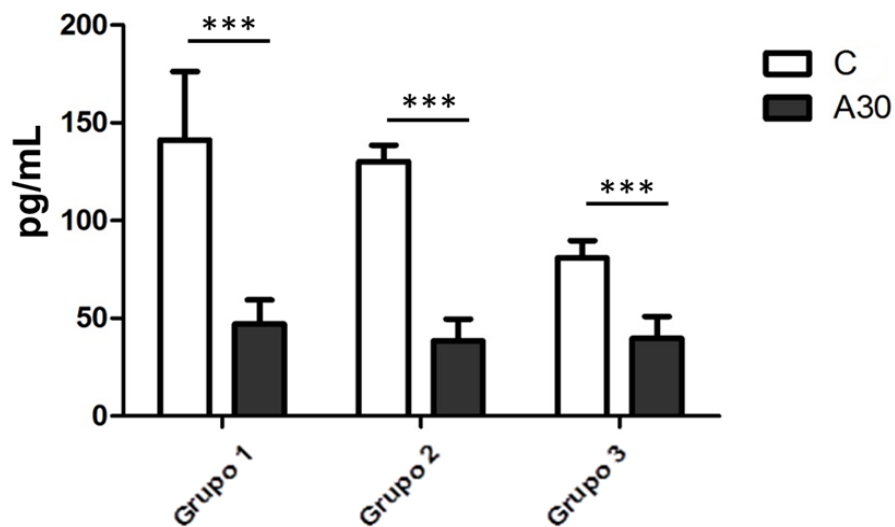


Figura 18. Concentración de corticosterona sérica. Se muestra la media \pm e.e. Se encontraron diferencias significativas por la dieta, mostrando una disminución significativa en la concentración sérica de corticosterona en las ratas A30 en los tres grupos de tratamiento comparado con su respectivo grupo control (** $p \leq 0.0001$). ANOVA dos vías, Bonferroni post hoc. C (n=6) y A30 (n=6).

Tratamiento $F_{1,3}=28.97, p < 0.0001$

Tiempo $F_{1,3}=2.044, p = 0.1514$

Interacción $F_{1,3}=1.510, p = 0.2411$

8. DISCUSIÓN

Dietas ricas en carbohidratos en edad adulta inducen el desarrollo de síndrome metabólico (Walker 2007) y han sido asociadas con el desarrollo de esteatosis hepática no alcohólica (Nseir y cols. 2010). Por otro lado, el exceso de glucocorticoides tanto en estudios *in vitro* e *in vivo*, inducen las características tanto del síndrome metabólico (Stimson y Walker 2008) así como de la esteatosis hepática (Pinheiro y cols. 2009). Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual los glucocorticoides estén participando en el desarrollo de la esteatosis hepática. Un fuerte argumento a favor de la importancia de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en el desarrollo del síndrome metabólico es que la eliminación de glucocorticoides por adrenalectomía tiene un impacto importante en la obesidad inducida por dieta (London y Castonguay 2009). Hace falta estudios que reporten los efectos por el consumo elevado de sacarosa a temprana edad, sobre la concentración de corticosterona y daño hepático. Este estudio se realizó para conocer el papel de la sacarosa sobre el daño hepático en relación a la concentración de corticosterona sérica desde una temprana edad.

Respecto al peso corporal no encontramos diferencias en ninguno de los grupos entre las ratas controles y experimentales del mismo grupo, a pesar de que los animales que consumieron agua con sacarosa disminuyen su consumo de alimento y su ingesta de agua es similar a los animales control. Sin embargo el aporte calórico total es mayor en los animales experimentales debido al consumo de agua con sacarosa. A este respecto, se ha sugerido que las ratas, primero cubren su necesidad de sed y luego de hambre obteniendo mayor ingesta calórica por el consumo de sacarosa contenida en el agua, por lo cual experimentan saciedad y comen menos (González 2011). Estos resultados son consistentes con otros estudios donde evalúan el efecto de una dieta alta en carbohidratos (El Hafidi y cols. 2001, 2004, 2006, Gao y cols. 2012), donde se sugiere que la preferencia de los animales por el sabor dulce es innata y difícilmente puede determinarse si su elección se basa en el sabor o en su contenido nutricional, ya que se ha señalado que los animales modifican el tamaño y número de sus comidas ante modificaciones en el contenido calórico de sus dietas (Martínez-Moreno y cols. 2009). También encontramos una disminución del consumo de kilocalorías totales a lo largo del tiempo, por lo que nosotros sugerimos esto puede deberse al estado fisiológico en el que se

encuentran las ratas, ya que al inicio del desarrollo la necesidad energética y el aporte calórico es mayor, el cual es utilizado para el funcionamiento, crecimiento y desarrollo, sin embargo conforme avanza la edad, la demanda y gasto energético disminuyen y si agregamos que la maquinaria metabólica se hace más lenta, el organismo tiende a almacenar lo que no gasta. En el caso de los niños, los estudios realizados apoyan la teoría de que estos tienen una mayor capacidad de autorregular su ingesta de alimentos, ajustando el aporte energético a sus requerimientos y adaptando el volumen de alimentos ingeridos en respuesta a cambios en la densidad energética de la dieta, puesto que las necesidades energéticas del ser humano van cambiando a lo largo de la vida y debe equilibrarse el gasto energético con la ingesta (Vizmanos y cols. 2006). Por otra parte el nivel de actividad (gasto de energía) de los animales también podría influir en nuestros resultados, ya que su gasto energético puede verse aumentado como medida de regulación para evitar la ganancia de peso (Martínez-Moreno y cols. 2009). Observamos que las ratas experimentales son más activas comparadas con las ratas controles.

En apoyo a lo anterior encontramos un mayor contenido de tejido adiposo e índice de adiposidad total en las ratas experimentales del Grupo 3 comparado con las ratas controles, mientras que en las ratas del grupo 1 y 2 no hubo diferencias. Con esto podemos sugerir que en el tercer mes del consumo de sacarosa, se almacena la ingesta calórica, mientras que en el primer y segundo mes del consumo de sacarosa se utiliza la ingesta calórica. Sin embargo, a pesar de encontrar un incremento en la acumulación de tejido adiposo en las ratas que consumieron agua con sacarosa, no podemos considerarlas como 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 comparado con la rata control. Esto puede deberse a la disminución del consumo de alimento en las ratas que consumieron sacarosa y a que el aumento del aporte calórico pueda estarse almacenando en mayor cantidad como masa grasa que de masa magra en la composición corporal. Estas observaciones son similares a las descritas previamente (El Hafidi y cols. 2001, Alexander y cols. 2004, Pérez-Torres y cols. 2009). Además, es posible que durante la etapa del desarrollo en la que se encuentran las ratas, los adipocitos se encuentren en un proceso de hiperplasia

más que de hipertrofia (Gathercole y cols. 2011), ya que se sabe que la hipertrofia en el adipocito no es la única ruta por la cual la masa del tejido adiposo aumenta sino que su hiperplasia también contribuye al incremento de la masa del tejido adiposo en la obesidad (Pérez-Torres y cols. 2009, Atriano-Cuapio 2012). Lo que nos hace sugerir que este aumento en el número de células de adipocitos en las ratas experimentales del Grupo 3, este influyendo en tener más células disponibles para el almacenamiento de triglicéridos (Atriano-Cuapio 2012). Resultado que se correlaciona con la acumulación de tejido adiposo (pericardio, visceral, perirrenal y gonadal) presente al tercer mes del consumo de agua con sacarosa. A este respecto, se ha reportado que la cantidad y localización del tejido adiposo varía en las diferentes etapas de la vida. El cuerpo humano tiene al momento de nacer aproximadamente 12% de grasa y puede llegar hasta el 17% a los 5 años de edad. A partir de esa edad, el tejido adiposo se va incrementando constantemente alcanzando en la edad adulta entre 30 a 40% de la masa corporal. Por otra parte, se ha mostrado que el exceso de adiposidad abdominal se correlaciona con las alteraciones metabólicas y cardiovasculares secundarias a la obesidad. Por otro lado, encontramos que el consumo de agua con sacarosa a los tres meses aumenta las concentraciones séricas de triglicéridos y VLDL (very low-density lipoprotein, por sus siglas en inglés). Lo anterior puede deberse a que los adipocitos viscerales tienen una actividad lipolítica más elevada, de tal forma que promueven la movilización de ácidos grasos al hígado, el cual responde aumentando la tasa de síntesis de triglicéridos y VLDL (Ponce y Ponce de León y cols. 2010). Por otra parte nosotros suponemos que al haber una hiperinsulinemia (Díaz-Aguila 2012), se está favoreciendo la lipólisis en tejido adiposo, donde los triglicéridos almacenados son hidrolizados para formar ácidos grasos y glicerol, debido a que la insulina no suprime completamente la lipólisis en tejido adiposo (Lewis y cols. 2002). Además es probable que las ratas que consumieron agua azucarada presenten un aumento de ácidos grasos libres y esto evite un aumento del área del adipocito, aunque si observamos almacenamiento de triglicéridos en el adipocito de las ratas que consumieron agua azucarada (Atriano-Cuapio 2012). Por otro lado, sugerimos que durante esta etapa al no haber una completa diferenciación de los adipocitos su capacidad de almacenamiento es relativamente poca. Por lo que el cuerpo trata de compensar esta demanda energética que ya no es utilizada debido a que el animal ya no se encuentra en desarrollo por lo que tiene que buscar otros

mecanismos para mantener la homeostasis promoviendo la lipólisis que aumenta la concentración de triglicéridos y VLDL. La dislipidemia es consistente con otros valores reportados en otros estudios (Alexander y cols. 2004, Hernández-Díaz y cols. 2010, Soto-Rodríguez y cols. 2011). Posiblemente debido a que la fructosa, monosacárido proveniente de la sacarosa, es transformada a ácidos grasos libres que son esterificados en triglicéridos (Romero-Sarmiento y cols. 2012). En apoyo a lo anterior, Parks y cols. (2008) determinaron la respuesta lipogénica a través del consumo de azúcar, encontrando que la fructosa (pero no la glucosa) aumenta dos veces más la lipogénesis de novo, justificando el desarrollo de la lipemia. Sin embargo, un posible mecanismo podría deberse a que tanto la insulina como la glucosa estarían 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, que a su vez estimulan al receptor X del hígado (LXR) promoviendo la expresión de genes codificantes de proteínas lipogénicas, cuando hay un exceso de carbohidratos en la dieta que resulta en una síntesis elevada de ácidos grasos hepáticos y esteatosis con incremento en la secreción de VLDL e hipertrigliceridemia (Cha y Repa 2007, Higuchi y cols. 2008). Así, distintos estudios han mostrado que la administración oral de agonistas de LXR en ratón, incrementa la liberación de ácidos grasos libres que van hacia el hígado vía circulación portal, resultando en un incremento de carga del metabolismo de ácidos grasos en el hígado. La lipogénesis aumenta la reesterificación de triglicéridos que ocasiona un incremento en la secreción de VLDL reduciendo los niveles de glucosa en suero (Cha y Repa 2007), sugiriendo que el LXR sirve como un regulador transcripcional de la lipogénesis hepática que promueve la conversión de glucosa a lípidos, que aunado a la edad y a la etapa de crecimiento de las ratas nos estén reflejando estos resultados. Es importante mencionar que el análisis de los receptores no fue analizado en este trabajo, sin embargo sería importante examinar cómo podrían estar influyendo en nuestros resultados.

En cuanto al hígado el consumo de sacarosa no afectó el peso. Sin embargo, encontramos un aumento de peso conforme avanza el tiempo como parte del desarrollo normal del animal. Por otra parte, la examinación morfológica del parénquima hepático en las ratas experimentales del Grupo 1, mostró el inicio de un proceso inflamatorio caracterizado por la

proliferación de células granulosas (eosinófilos, basófilos y neutrófilos) y linfocitos. También observamos en algunos hepatocitos la presencia de vacuolas de grasa en el citoplasma, aunque varios autores sugieren que menos del 5% de lípidos hepatocelulares no representa una anormalidad patológica (Leevy 1962, Adams y cols. 2005) ya que se sabe que este porcentaje del peso total del hígado corresponde a lípidos y más allá de esta proporción se considera una patología (Martínez-López y cols. 2005). 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). Por lo que su activación juega un rol central en la patogénesis y la progresión de la enfermedad del hígado por contribución a la inflamación del parénquima y lesión de hepatocitos (Tiniakos y cols. 2010). Sin embargo, el contenido de grasa visceral también es asociado con la inflamación (Der Poorten y cols. 2008) debido a la producción de citosinas que son involucradas en el reclutamiento y activación de las células de Kupffer (Friedman 2008) las cuales pueden ser activadas por la exposición portal y circulación sistémica (Cai y cols. 2005) Por otra parte, la exposición excesiva de las células de Kupffer a los ácidos grasos (que desafortunadamente no medimos) también puede modular las vías de la inflamación mediante la interacción con receptores de superficie celular y mediadores intracelulares (Kim 2006) ya que abundantes cantidades de lípidos pueden confundir el reconocimiento de los hepatocitos grasos como peligrosos y la promoción de interacciones adversas con las células de Kupffer (Cai y cols. 2005, Maher y cols. 2008). De la misma manera, se ha reportado que la leptina, hormona proinflamatoria secretada por el tejido adiposo actúa sobre las células de Kupffer, por la unión a su receptor funcional en el hígado induciendo el aumento de TNF- α , TGF- β y IL-15 (Li y cols. 2002, Shen y cols. 2005) que favorece la llegada de macrófagos, participando como un quimioatrayente en la célula debido a que aumenta la síntesis de ciertas quimiocinas como la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1 por sus siglas en inglés) y vías de señalización necesarias para la migración de macrófagos como la de la cinasa aminoterminal c-Jun-1 (JAK-1 por sus siglas en inglés), la señal de activadores de transducción (STAT por sus siglas en inglés), las cinasas proteicas activadoras de la mitogénesis (MAPK por sus siglas en inglés) y la fosfatidilinositol 3-quinasa (Gruen y cols. 2007). Con estos antecedentes es probable pensar que el aumento de leptina que se encontró al

final del experimento (Díaz-Aguila 2012) esté participando en la infiltración de células del sistema inmune en el hígado. Mientras que el desacomodo de los cordones hepáticos en el Grupo 2 puede deberse en primer lugar, al espacio ocupado por la grasa en los hepatocitos que puede dar lugar a alteración de la perfusión sinusoidal (Farrell y cols. 2008). Así, los hepatocitos con grasa se hacen más grandes provocando que tengan un 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 normalmente perfundidos. Este daño microvascular podría acentuar más la lesión hepática (Farrell y cols. 2008). Así, el proceso inflamatorio y el desacomodo de los cordones hepáticos se hizo más evidente en el Grupo 3, acompañado de hepatocitos en forma de balón, acumulación de microvesículas de grasa en el citoplasma de los hepatocitos, eritrocitos fuera de los sinusoides, engrosamiento de la capa íntima en las zona perivenular y congestión de los sinusoides lo que coincide con lo que describen otros autores a cerca de las características del hígado graso no alcohólico (Brunt 2001, Hübscher 2006). Nuestros resultados mostraron la presencia de una inflamación grado 2 y una esteatosis hepática grado 1 (Romero-Sarmiento y cols. 2011). Por lo que nosotros sugerimos que las alteraciones metabólicas que encontramos durante el tercer mes de consumo de sacarosa (concentraciones elevadas de triglicéridos y VLDL) 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, donde sugerimos que debido a la resistencia a la insulina presente en el tercer mes de consumo de agua con sacarosa (Díaz-Aguila 2012), la insulina no inhibe adecuadamente la lipasa sensible a hormonas (LSH) y la lipólisis en el 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 es reesterificado en triglicéridos dentro del hígado y almacenados en forma de vesículas de lípidos dentro de los hepatocitos desarrollando esteatosis hepática (Postic y Girard 2008,

Tiniakos y cols. 2010, Nader y cols. 2012). Es decir, la acumulación de grasa hepática puede deberse a un aumento en la captación de ácidos grasos en el hígado, a un aumento en la síntesis de ácidos grasos y a la disminución en la secreción de VLDL o alteración en varios de estos puntos (Martínez-López y cols. 2005). Aunque es importante mencionar que nuestros resultados no arrojan diferencias en el área citoplasmática de los hepatocitos posiblemente debido a que el grado de esteatosis aún es muy leve.

Por otra parte, es importante aclarar, que aunque no se están midiendo sustancias reactantes, el reclutamiento de células inflamatorias (Martínez-López y cols. 2005), la activación de las células de Kupffer y la acción de la leptina (Chatterjee y cols. 2013) pueden estar promoviendo el estrés oxidativo. Aunado a ello el cambio en la microanatomía de los vasos sanguíneos trae consigo elementos que alteran la permeabilidad de la membrana del endotelio que tiene como consecuencia un proceso inflamatorio debido a que el tránsito de moléculas ya no es adecuado (Rodríguez-Perón y cols. 2001, Bonet y Nava 2002, Hicks y cols. 2006), por lo que el endotelio vascular también es un generador de especies reactivas de oxígeno y al mismo tiempo sufre los efectos de éstas en el sitio de lesión (Céspedes y cols. 2008).

Respecto a la corticosterona encontramos una disminución significativa que se mantiene hasta el final del experimento, contrario a lo que se ha reportado por otros autores donde un consumo de una dieta alta en grasa-sacarosa aumenta la concentración de corticosterona sérica (Mantha y cols. 1999, Mantha y Deshaies 2000) comparado con London y cols. (2007, 2009) que sugiere que una dieta alta en sacarosa promueve una síntesis local de corticosterona en tejido adiposo e hígado (London y cols. 2007, London y Castonguay 2009). Ahora tenemos evidencia de que la disminución de corticosterona en las ratas que consumen agua con sacarosa se debe a un desarreglo histológico en la zona fascicular de la glándula adrenal (Díaz-Aguila 2012), en la cual se secretan los glucocorticoides. 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, no se sabe cuál es la causa ni esta relación con el desarrollo de la esteatosis hepática no alcohólica. Aunque, es posible que de haber tenido altas

concentraciones de corticosterona estas podrían estar participando en la activación de la lipoprotein lipasa (LPL), que promueve el almacenamiento de grasa (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), enzima responsable de la movilización de ácidos grasos que estarían promoviendo la gluconeogénesis en hígado (Vegiopoulos y Herzig 2007). Por lo que es posible que si la acumulación de tejido adiposo se hubiera presentado desde el primero o segundo mes de consumo de agua azucarada, dado que el tejido adiposo visceral tiene gran cantidad de receptores a glucocorticoides estos aumentarían su actividad tanto lipolítica como lipogénica, mientras el tejido adiposo estaría aumentando la concentración de leptina promoviendo la inflamación y daño oxidativo que estarían potenciando el daño y el grado de esteatosis hepática por lo que las alteraciones encontradas en el tercer mes de consumo de agua azucarada serían observadas a una etapa más temprana.

Con nuestros resultados estamos comprobando el desarrollo de una esteatosis hepática grado 1 como consecuencia de un proceso inflamatorio previo, en el cual la corticosterona no está participando al menos directamente en el desarrollo de la esteatosis hepática, contrario a lo que ha sido mostrado durante la edad adulta, donde un consumo de sacarosa a baja concentración durante un periodo corto provoca el desarrollo de esteatosis hepática (Pérez-Sánchez 2011), sin embargo no reportan el nivel de daño ni que sucede con los niveles de corticosterona. Al parecer durante la edad adulta las células son más susceptibles a una dieta alta en carbohidratos (Spolarics, 1999). Es importante resaltar que el tiempo en el que se consume la sacarosa es fundamental para provocar los hallazgos encontrados. Sin embargo, estos resultados nos siguen manteniendo a la expectativa acerca de cómo los glucocorticoides participan en el desarrollo de la esteatosis hepática y por otro lado, cuales son las consecuencias de los bajos niveles de corticosterona sérica que pudieran estar participando en el desarrollo de la esteatosis hepática.

9. CONCLUSIONES

Los resultados muestran que el tiempo de consumo de sacarosa a temprana edad es un factor importante en el desarrollo de esteatosis hepática. Iniciando con un proceso inflamatorio sin la presencia de concentraciones elevadas de corticosterona. No obstante la corticosterona podría estar participando de manera indirecta en la progresión de la enfermedad del hígado graso no alcohólico. Probablemente la disminución de la corticosterona este provocando cambios metabólicos que ocasionen el desarrollo de la esteatosis hepática.

10. PERSPECTIVAS

En relación a nuestros resultados, sería importante analizar la distribución subcelular de los receptores a glucocorticoides y la expresión de las enzimas implicadas en los mecanismos sus mecanismos de acción y expresión de glucocorticoides en hígado como la 11 β -deshidrogenasa tipo 1 (11 β -HSD-1) y la hexosa-6-fosfato deshidrogenasa (H6PDH), ya que es posible que aunque no hayamos encontrado altos niveles de corticosterona sérica en nuestro modelo de consumo de sacarosa al 30%, no podemos descartar que la disminución sérica de corticosterona pueda estar ejerciendo algún mecanismo sobre estas enzimas presentes en hígado. De la misma manera cabe la posibilidad de que la secreción local de glucocorticoides se encuentre aumentada.

Por otro lado, sería importante utilizar otras técnicas para aumentar los niveles de glucocorticoides de manera fisiológica, como puede ser induciendo estrés. Así, utilizando el estrés como herramienta para aumentar las concentraciones de glucocorticoides podríamos conocer si realmente los glucocorticoides tienen que ver con el desarrollo de la esteatosis hepática no alcohólica. Descartando el uso de glucocorticoides sintéticos debido a que su administración es muy drástica ya que llegan a aumentar hasta siete veces más los niveles de glucocorticoides en el organismo. De la misma manera sería interesante analizar las concentraciones de corticosterona en el desarrollo de esteatosis hepática durante la edad adulta.

Con respecto a los resultados obtenidos sobre el daño en hígado, donde se observó un desarreglo del parénquima, falta evaluar la concentración de ácidos grasos libres para determinar si están participando en el desarrollo de la esteatosis hepática. Además de determinar si el número de células de Kupffer aumenta con el daño ya que esto podría estar potenciando el desarrollo de la esteatosis hepática debido a los distintos mecanismos que ejercen como medida de defensa en el hígado.

11. REFERENCIAS

- Adams LA**, Angulo P y Lindor KD. 2005. Nonalcoholic fatty liver disease. *Canadian Medical Association Journal* 172: 899-905.
- Alexander AA**, Hernández DG, Lara BM, Angulo GO y Oliart RR. 2004. Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids and tumor necrosis factor- α in rats with sucrose-induced metabolic syndrome. *Journal of Nutrition Biochemical* 15: 350-357.
- 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.
- Ando K** y Fujita T. 2009. Metabolic syndrome and oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* 47: 213-218.
- 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.
- Arthur J** y Mccollough D. 2006. Pathophysiology of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Journal of Clinical Gastroenterology* 40: 17-29.
- Atriano-Cuapio R**. 2012. Consumo elevado de sacarosa desde temprana edad sobre la concentración de insulina y leptina e histología del tejido adiposo. Tesis de Licenciatura en Nutrición. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- 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.
- Baffy G**. 2009. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: The emerging view. *Journal of Hepatology* 51: 212-223.
- Björntorp P**. 1995. Liver triglycerides and metabolism. *International Journal of Obesity and related Metabolic Disorders* 19: 839-840.
- Björntorp P** y Rosmod R. 2000. Obesity and Cortisol. *Nutrition* 16: 924-936.
- Bonet L** y Nava M. 2002. Estrés oxidativo y algunas formas de insuficiencia renal aguda. *Bioquímica* 27:13-17.
- Brunt EM**. 2001. Nonalcoholic steatohepatitis: Definition, pathology. *Seminars in liver disease* 21: 3-16.

- Burt D**, Mutton A y Day P. 1998. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Seminars in Diagnostic Pathology* 15: 246-258.
- Cai D**, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J y Shoelson SE. 2005. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK- β and NF- κ B. *Nature Medicine* 11:183–190.
- Causse X**, Gargot D y Michenet P. 1995. Liver steatosis. I: Macrovesicular steatosis. *Gastroenterologie Clinique et Biologique* 19: 58-65.
- Céspedes E**, Ponte G; Riverón G y Castillo JA. 2008. Marcadores de estrés oxidativo en pacientes hipertensos de una población rural en provincia Habana. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédica* 27: 1-9.
- 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.
- Chatterjee S**, Ganini D, Tokar EJ, Kumar A, Das S, Corbett J, Kadiiska MB, Waalkes MP, Diehl AM y Mason RP. 2013. Leptin is key to peroxynitrite-mediated oxidative stress and Kupffer cell activation in experimental non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of hepatology* 58: 778-784.
- Cole T**, Wilcox H y Heimberg M. 1982. Effects of adrenalectomy and dexamethasone on hepatic lipid metabolism. *Journal of Lipid Research* 23: 81-91.
- Delbosc S**, Paizanis E, Magous R, Ataiz C, Dimob T, Cristol JP, Cros G y Azay J. 2005. Involment of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat. *Atherosclerosis* 179: 43-49.
- Devlin T**. 2000. Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas. Editorial Reverté
- 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.
- Dvorkin MA**, Cardinali DP y Iermoli RH. 2010. Bases fisiológicas de la práctica médica. 1^o Edición. Editorial Panamericana.

- Dubois L**, Farmer A, Girard M y Peterson K. 2007. Regular sugar sweetened beverage consumption between meals increases risk of overweight among preschool-aged children. *Journal of the American Dietetic Association* 107:924-935.
- El Hafidi M**, Cuellar A, Ramirez 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.
- 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–R1393.
- 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 Experimental. Hipertension* 28: 669–681.
- Esquivel-Solís V** y Gómez-Salas G. 2007. Implicaciones metabólicas del consumo excesivo de fructosa. *Acta Médica Costarricense* 49:198-202.
- Farrell GC**, Teoh NC, McCuskey RS. 2008. Hepatic microcirculation in fatty liver disease. *Anatomical record (Hoboken)* 291:684:692.
- 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.
- Fong G**, Nehra V, Lindor K y Buchman L. 2000. Metabolic and nutritional considerations in nonalcoholic fatty liver. *Hepatology* 32: 3-10.
- Fortoul Van der Goes TI**. 2010. *Histología y biología celular*. Editorial McGrawHill
- Friedewald W**, Levy R y Fredrickson D. 1972. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry* 18, 499-502.
- Friedman SL**. 2008. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological Reviews* 88:125–172.
- Gao H**, Guan T, Li C, Zuo G, Yamahara J, Wang y Li Y. 2012. Treatment with ginger ameliorates fructose-induced fatty liver and hypertriglyceridemia in rats: Modulation of the

hepatic carbohydrate response element-binding protein-mediated pathway. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 1-12.

Gathercole LL, Morgan SA, Bujalska IJ, Hauton D, Stewart PM y Tomlinson JW. 2011. Regulation of lipogenesis by glucocorticoids and insulin in human adipose tissue. *Plos One* 6: e26223.

Giudetti AM y Gnoni GV. 1998. Short-term effect of dexamethasone of fatty acid and cholesterol synthesis in isolated rat hepatocytes. *Biochemistry and Molecular Biology International* 44: 515-521.

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.

Grasa-Martínez M. 2004. Glucocorticoides y Obesidad. *Revista Española de Obesidad* 1:13-30.

Gruen ML, Hao M, Piston DW y Hasty AH. 2007. Leptin requires canonical migratory signaling pathways for induction of monocyte and macrophage chemotaxis. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 293:1481-1488.

Hernandez-Diaz G, Alexander-Aguilera A, Arzaba-Villalba A, Soto-Rodriguez I y Garcia, H S. 2010. Effect of conjugated linoleic acid on body fat, tumor necrosis factor alpha. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 82: 105–109.

Hicks JJ, Torres YD y Sierra MP. 2006. Estrés oxidante. Concepto y clasificación. *Revista de Endocrinología y Nutrición* 14: 223-226.

Higuchi N, Kato M, Shundo Y, Tajiri H, Tanaka M, Yamaxhita N, Kohjima M, Kotoh K, Nakamuta M, Takayanagi 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.

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.

- Hübscher SG.** 2006. Histological assessment of non-alcoholic fatty liver disease. *Histopathology*, 49: 450–465.
- Jiménez-Cruz A,** Velasco-Martínez RM, Bacardí-Gascón M, Higuera Domínguez F y Domínguez de la Piedra E. 2009. HOMA-IR, síndrome metabólico y hábitos dietéticos en adolescentes de Chiapas, México. *Revista Biomédica* 20:82-88.
- Keegan CE** y Hammer GD. 2002. Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex. *Trends in endocrinology and metabolism* 3: 200-208.
- Kim JK.** 2006. Fat uses a TOLL-road to connect inflammation and diabetes. *Cell Metabolism* 4:417:419.
- Leevy CM.**1962. Fatty liver: a study of 270 patients with biopsy proven fatty liver and a review of the literature. *Medicine* 41: 249-278.
- Lewis GF,** Carpentier A, Adeli K y Giacca A. 2002. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocrine Reviews* 23:201–229.
- Li Z,** Lin H, Yang S y Diehl AM. 2002. Murine leptin deficiency alters Kupffer cell production of cytokines that regulate the innate immune system. *Gastroenterology* 123: 1304-1310.
- London E** y Castonguay TW. 2009. Diet and the role of 11 β -hidroxysteroid dehidrogenase-1 on obesity. *Journal of Nutritional Biochemistry* 20:485-493.
- 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 β -hidroxisteroide deshidrogenase and hexose-6-phosphate dehidrogenase message in liver and adipose tissue in rats. *The Journal of Nutrition* 137:2616–2621.
- Loria P,** Lonardo A, Carulli L, Verrone AM, Ricchi M, Lonbardini S, Rudillosso A, Ballestri S y Carulli N. 2005. The metabolic síndrome and non-alcoholic fatty liver disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 22:31-36.
- 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.
- Maher JJ,** Leon P y Ryan JC. 2008. Beyond insulin resistance: Innate immunity in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 48:670-678.

- Mantha L**, Palacios E y Deshaies Y. 1999. Modulation of triglyceride metabolism by glucocorticoids in diet-induced obesity. *American Journal Physiological Society (Regulatory Integrative Company Physiology)* 277: 455-464.
- Mantha L** y Deshaies Y. 2000. Energy intake-independent modulation of triglyceride metabolism by glucocorticoids in the rat. *American Journal Physiological Society (Regulatory Integrative Company Physiology)* 278: 1424-1432.
- Martínez-López E**, Domínguez-Rosales JA, Hernández-Nazara ZH y Panduro-Cerda A. 2005. Esteatohepatitis no alcohólica. *La hepatología molecular: un enfoque multidisciplinar* 2: 40-48.
- Martínez—Moreno AG**, López-Espinoza A, Díaz-Reséndiz FJ, Valdés-Miramontes E. 2009. Consumo de soluciones endulzadas en ratas albinas: sabor vs calorías. *Psicothema* 21: 191-198.
- Mataix V**. 2009. Nutrición y alimentación humana. Editorial *Ergón*.
- Miyazaki M**, Dobrzyn A, Chi Man W, Chu K, Sampath H, Kim H y Ntambi JM. 2004. Stearoyl-coa desaturase 1 gene expression is necessary for fructose-mediated induction of lipogenic gene expression by sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent and – independent mechanisms. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 25164-25171.
- 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.
- Nseir W**, Nassar F y Assy N. 2010. Soft drinks consumption and nonalcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology* 16:2579-2588.
- 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.
- Oron-Herman M**, Kamari Y, Grossman E, Yeger G, Peleg E, Shabtay Z, Shamiss A y Sharabi Y. 2008. Metabolic syndrome: comparison of the two commonly used animal models. *American of Journal Hypertension* 21:1018-1022.

- Parks EJ**, Skokan LE, Timlin MT y Dingfelder CS. 2008. Dietary sugars stimulate fatty acid synthesis in adults. *The Journal of Nutrition* 138:1039–1046.
- 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 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 7088-7093.
- Pérez SE**, Martínez-Gómez M, Zambrano GE y Rodríguez AJ. 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.
- 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.
- 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.
- Ponce y Ponce de León G**, Haro-Acoste ME, Arce-torres MA, Núñez-soria AA, Esparza-Cisneros JR y Mayagoitia–Witrón JJ. 2010. Obesidad y Tejido Adiposo. *Revista Salud Pública y Nutrición* 11:1-8.
- Postic C**, Dentin R y Girard J. 2004. Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis. *Diabetes & Metabolism* 30:398-408.
- 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.
- Raff MC**. 1996. Size control: the regulation of cell numbers in animal development. *Cell* 86:173-175.
- Rodes J**, Pierre-Benhamou J, Bircher J, McIntyre N y Rizzetto M. 2001. Tratado de Hepatología Clínica Tomo II. Editorial Masson.
- Rodríguez-Perón JM**, Menéndez-López JR y Trujillo-López Y. 2001. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Revista Cubana Medico Militar* 30:15-20.

- Rojas J**, Bermúdez V, Leal E, Aparicio D, Peña G, Acosta L, Finol F, Urdaneta A, Colmenares C, Almarza J, Linares S, Carrillo M y Bustamante M. 2008. Origen étnico y enfermedad cardiovascular. *Archivos Venezolano de Farmacología y Terapéutica* 27: 41-58.
- 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.
- Ross H**, Kaye G y Pawlina W. 2005. Histología Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular. *Médica Panamericana*.
- Saiah E**. 2008. The role of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in metabolic disease and therapeutic potential of 11beta-HSD1 inhibitors. *Current Medicinal Chemistry* 15:642-649.
- 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.
- Shen J**, Sakaida I, Uchida K, Terai S y Okita K. 2005. Leptin enhances TNF-alpha production via p38 and JNK in LPS-stimulated Kupffer cells. *Life Sciences* 77: 1502-1515.
- Soto-Rodríguez I**, Pulido-Camarillo E, Hernández-Díaz G, Alexander-Aguilera A y García HS. 2011. A CLA enriched diet improves organ damage associated with the metabolic syndrome in spontaneous hypertensive rats. *Grasas y Aceites* 62: 49-54.
- Spolarics Z**. 1999. A carbohydrate-rich diet stimulates glucose-6-phosphate dehydrogenase expression in rat hepatic sinusoidal endothelial cells. *The Journal of nutrition* 129: 105-108.
- Spencer SJ** y Tilbrook A. 2011. The glucocorticoid contribution to obesity. *Stress* 14: 233-246.
- Stewart PM** y Tomlinson JW. 2002. Cortisol, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and central obesity. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 13: 94-96.
- Stimson RH** y Walker BR. 2008. Energy Metabolism and Obesity: Research and Clinical Applications. Editorial Donohoue, Patricia A.
- 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.
- 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.

- Tomlinson JW**, Walker EA, Bujalska IJ, Draper N, Lavery GG, Cooper MS, Hewison M y Stewart PM. 2004. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response. *Endocrine Reviews* 25:831-866.
- Vegiopoulos A** y Herzig S. 2007. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Molecular and Cellular Endocrinology* 275:43–61.
- Vizmanos B**, Hunot C y Capdevila F. 2006. Alimentación y obesidad. *Investigación y Salud Vol. III* 2:79-85.
- Walker B**. 2007. Glucocorticoids and Cardiovascular Disease. *European Journal of Endocrinology* 157:545-559.
- Welsch U** y Sobotta J. 2009. Histología. Editorial Médica Panamericana.
- Yang Z**, Miyahara H, Takeo J y Katayama M. 2012. Diet high in fat and sucrose induces rapid onset of obesity-related metabolic syndrome partly through rapid response of genes involved in lipogenesis, insulin signaling and inflammation in mice. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 4:32-41.

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
Montaje		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 Tampón de sacarosa al 30% (Medio de crio-protección)

Reactivo

Sacarosa ($C_{12}H_{22}O_{11}$)

Tampón de fosfatos (PB)

Agua destilada

Modo de preparar:

En 1000 ml de PB y 1000 ml de agua destilada disolver 600 g de sacarosa

12.4 Tampón de fosfatos (PB)

(Stock 1M, pH 7.3)

Reactivo

Fosfato de sodio monobásico dihidratado ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$)

Fosfato de potasio dibasico anhídrido (K_2HPO_4)

Agua destilada

Modo de preparar:

1. En 1000 ml de agua destilada agregar 226.43 g de K_2HPO_4 y aforar a 1300 ml
2. En 500 ml de agua destilada agregar 109.20 g de $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ y aforar a 700 ml
3. Mezclar y ajustar el pH a 7.2 y 7.3
4. Refrigerar a $-4^\circ C$

13. PUBLICACIONES



Esteatosis hepática y niveles elevados de corticosterona por el consumo de agua azucarada a temprana edad

Adriana Corona-Pérez¹, Jorge Rodríguez-Antolín²,
Francisco Castellán², Ida Soto-Rodríguez³ y
Leticia Nicolás-Toledo²

¹Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala; ²Centro Tlaxcalateca de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala;

³Universidad Veracruzana.

La ingesta alimentaria es una conducta que consiste en la obtención e ingestión de alimentos. Mientras que, la nutrición es el conjunto de procesos fisiológicos mediante el cual los alimentos ingeridos se transforman y se asimilan, es decir, se incorporan al organismo de los seres vivos. 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, que comprenden cualquier alteración nutricional, tanto por consumo elevado (sobrenutrición) como por restricción (desnutrición). Problemas de malnutrición se han asociado con trastornos metabólicos como la obesidad, la diabetes y dislipidemias. Muchos de estos trastornos, que se ha propuesto son promovidos por el consumo de bebidas azucaradas, son mediados a través del metabolismo hepático. Dentro de la maquinaria metabólica, el papel de los glucocorticoides ha sido muy poco estudiado. Los glucocorticoides son hormonas secretadas por las glándulas adrenales y se ha propuesto que participan en el metabolismo de carbohidratos y lípidos. Una dieta alta en sacarosa promueve desajustes en el metabolismo de los glucocorticoides, promoviendo la gluconeogénesis en hígado por incremento de la transcripción de la glucosa 6-fosfatasa (G6Pasa), enzima clave que media el paso final tanto de la gluconeogénesis y el inicio de la glicólisis, y con todo ello la biosíntesis de lípidos en hígado, los cuales comienzan a almacenarse en pequeñas vesículas alrededor del núcleo del hepatocito, condición conocida como esteatosis hepática. Sin embargo, no hay estudios que reporten los daños ocasionados en el hígado, relacionados con altos niveles de corticosterona ocasionados por el consumo de bebidas azucaradas a temprana edad. Por ello, estamos interesados en evaluar si el consumo de agua azucarada aumenta la concentración de corticosterona e influye en el desarrollo de la esteatosis hepática. Para ello utilizamos ratas machos de la cepa Wistar (n=36). Los animales se organizaron en tres grupos (cada uno con seis animales) experimentales que consumieron agua azucarada al 30% vs sus respectivos grupos controles. Grupo 1, consumieron agua azucarada por un mes. Grupo 2, consumieron agua azucarada por dos meses, y grupo tres, consumieron agua azucarada por tres meses. Se registró diariamente el peso corporal, consumo de alimento y consumo de agua. Por otro lado, se colectaron las heces al final de cada mes para medir la concentración de corticosterona por el método de ELISA. Al término de cada tratamiento, los animales fueron sacrificados por decapitación. Inmediatamente

3-6 de octubre de 2012. Tlaxcala, México.

después fue removido y pesado el hígado. Posteriormente, se fijó en formalina al 10% y posteriormente, el tejido fue deshidratado con alcoholes ascendentes (60, 70, 80, 96 y 100%) y adarados en xilol. Finalmente el tejido fue incluido en paraplast. Se obtuvieron cortes histológicos longitudinales (cuatro de cada animal) de siete μm de espesor, los cuales fueron recolectados en portaobjetos. Las preparaciones histológicas fueron teñidas con hematoxilina eosina y se determinó el área citoplasmática y el número de núcleos, con la ayuda de un analizador de imágenes AxioVision REL 4.6 (ZeissInc 2007) en microfotografías tomadas con una cámara OLYMPUS de 5.1 mega píxeles montada en un microscopio óptico ZeissImager A.1 (a 400 aumentos totales). Los resultados fueron analizados con *t-student* para determinar diferencias en los grupos.

El peso corporal entre los tres grupos experimentales fue similar. Los resultados muestran que los animales del grupo tres no presentaron diferencias significativas en el peso del hígado, en el área citoplasmática ni tampoco en el número de núcleos, sin embargo hay evidencia de la presencia de pequeños espacios en blanco alrededor del núcleo que pueden sugerir la presencia de vesículas de grasa indicador de una probable esteatosis hepática, sin embargo aún falta determinar si la presencia de estos espacios pertenece a la acumulación de grasa. Con respecto a la corticosterona, encontramos que el consumo de agua azucarada aumentó su concentración en el grupo uno, y disminuyó en el grupo dos y en el grupo tres. Adicionalmente, observamos que el tejido adiposo visceral aumentó significativamente solo en el grupo tres. Aun falta analizar que sucede histológicamente en los hígados de los grupos uno y dos, sobre todo cuando hay un aumento en la concentración de corticosterona. Financiamiento: CONACYT a CPA (417844).

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE TLAXCALA
DIRECTORIO PARA PUBLICACIONES DE LOS CUERPOS ACADÉMICOS

Dr. Víctor Job Paredes Cuahquentzi
Rector

Mtro. René Elizalde Salazar
Secretario Académico

Mtra. Dora Juárez Ortiz
Secretaria de Investigación Científica y Posgrado

Mtro. Efraín Ortiz Linares
Secretario de Extensión universitaria y Difusión Cultural

Mtro. Rubén Reyes Córdova
Secretario Administrativo

Dr. Sergio Eduardo Algarra Cerezo
Secretario Técnico

Mtro. Mauro Sánchez Ibarra
Secretario de Autorrealización

Mtro. Ernesto Meza Sierra
Coordinación de la División de Ciencias Sociales y Admvas.

Mtro. Adolfo Cuevas Sánchez
Coordinación de la División de Ciencias Biológicas

Mtra. Samantha Viñas Landa
División de Ciencias y Humanidades

Mtro. Marlon Luna Sánchez
División de Ciencias Básicas, Ingeniería y Tecnología

Dra. Margarita Martínez Gómez
Coordinadora del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

Dr. Jorge Rodríguez Antolín
Coordinador del Posgrado en Ciencias Biológicas

M. C. Antonio Durante Murillo
Coordinador General de Cuerpos Académico

