

Título completo:

UNA DIETA RICA EN GRASAS PRODUCE ESTEATOSIS MICROVESICULAR EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE SINDROME METABÓLICO SIN DISLIPEMIA

HIGH FAT DIET INDUCES MICROVESICULAR STEATOSIS IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF METABOLIC SYNDROME WITHOUT DISLIPIDEMIA

Título abreviado:

DIETA RICA EN GRASAS Y ESTEATOSIS MICROVESICULAR

HIGH FAT DIET AND MICROVESICULAR STEATOSIS

Fabricio Scacchi^c, María Sofia Karbiner^c, Franco Pucci Alcaide^d, Maria Peral de Bruno^{b,c}, Susana Jerez^{a,b}.

^a Facultad de Ciencias Naturales e Instituto Miguel Lillo, Universidad Nacional de Tucumán (UNT). Miguel Lillo 201-4000-Tucumán.

^b Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO)-CONICET, UNT

^c Facultad de Medicina, UNT. Av Independencia 1800-4000-Tucumán.

^d Fundación Miguel Lillo. Miguel Lillo 251-4000-Tucumán.

Autor Responsable

Susana Jerez - Av Independencia 1800, (4000). Tucumán – Argentina

Mail: sjerez@herrera.unt.edu.ar

Fuentes de Financiamiento: Proyectos PICT 2015-1164 de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica. PIP 215/14 del CONICET. PIUNT G621 de la UNT.

Conflicto de interés: los autores declaran que no existen conflictos de interés en este trabajo.

RESUMEN

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) inducida por dietas ricas en grasas es considerada actualmente el componente hepático del síndrome metabólico, sin embargo su fisiopatología es actualmente objeto de controversia. El objetivo del presente estudio fue evaluar los cambios morfológicos hepáticos y su relación con componentes del síndrome metabólico en un modelo de conejo alimentado con una dieta rica en grasas. Los animales (n=24) fueron separados en dos grupos: uno recibió una dieta control (DC, n=12) y el otro una DC enriquecida con grasa al 10 % (DG, n=12) durante 12 semanas. Al final del periodo de alimentación se realizaron test de tolerancia a la glucosa y determinaciones de presión arterial media (PAM), frecuencia cardiaca (FC), insulina, colesterol total, HDL-C, LDL-C, triglicéridos, sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) y relación glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSH). Se extrajeron grasas de la zona visceral abdominal y el hígado y se pesaron. Se realizó análisis histológico de cortes de hígado. Los conejos alimentados con DG presentaron aumento de peso corporal, de grasa visceral abdominal, de PAM, FC, insulina plasmática. No se observaron diferencias en los lípidos, TBARS ni GSH/GSSH con respecto a los DC. El análisis histológico mostró la presencia de esteatosis microvesicular. En conclusión, una DG generó un modelo de síndrome metabólico caracterizado por una alteración temprana hepática compatible con esteatosis microvesicular. Considerando que en este modelo los niveles de lípidos plasmáticos y los parámetros de estrés oxidativo fueron normales, la resistencia a la insulina sería el biomarcador temprano de NAFLD en el síndrome metabólico

Palabras claves: síndrome metabólico; obesidad; dieta rica en grasas; esteatosis; hígado

ABSTRACT

High fat diet induces non-alcoholic fatty liver disease that is now considered to be the hepatic component of the metabolic syndrome. However, its physiopathology remains a controversial subject. The present study was carried out to evaluate morphological changes in the liver and its association with known components of metabolic syndrome in a rabbit model. Animals (n=24) were fed either on regular chow (CD; n=12) or high fat diet 10 % (HFD, n=12). After 12 weeks, body weight, visceral abdominal fat, glucose tolerance test, mean arterial blood pressure and heart rate were significantly increased in rabbits fed on HFD. Plasma levels of total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, triglycerides, glutathione reduced/glutathione oxidized ratio and thiobarbituric acid reactive substances were similar in both diet groups. Insulin from plasma and HOMA index were higher in rabbits fed on HFD. Histological analysis showed hepatic microvesicular steatosis in this obesity model. In conclusion, HFD induced together with metabolic alterations characterizing the metabolic syndrome early liver injury compatible with microvesicular steatosis. Considering that in such conditions triglycerides levels and oxidative parameters were similar to controls, insulin resistance may be the earlier biomarker of liver injury in the metabolic syndrome.

Key Words: metabolic syndrome; rabbits; obesity; omega-6 fatty acids; high fat diet; steatosis.

1 INTRODUCCIÓN

El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de alteraciones metabólicas caracterizadas por obesidad central, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, disminución de los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL-C), aumento de triglicéridos (TG) e hipertensión arterial¹. El tejido adiposo de los individuos obesos libera grandes cantidades de ácidos grasos no esterificados, glicerol, hormonas, citoquinas proinflamatorias y otros factores que están involucrados en la resistencia a la insulina (RI)². Por lo tanto la RI está fuertemente relacionada con el acúmulo de grasa en el hígado³.

La enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD) es actualmente la enfermedad hepática más frecuente en los países desarrollados y se considera el componente hepático del SM⁴. La NAFLD se caracteriza por la presencia de grandes gotas de grasa en el hepatocito (esteatosis macrovesicular) o bien hepatocitos que contienen pequeñas gotas de grasa (esteatosis microvesicular). La esteatosis hepática puede ser simple o progresar hacia esteatohepatitis no alcohólica (NASH) si los factores que la causan persisten⁵. La NASH está caracterizada morfológicamente por evidencias de injuria hepatocelular, diferentes grados de cambios inflamatorios y fibrosis. La obesidad, especialmente abdominal, y la vida sedentaria son importantes factores de riesgo para NAFLD⁶. Un rasgo destacable en la patogénesis de NAFLD, tanto desde el punto de vista metabólico como histológico es el acúmulo de TG en el hígado. Liu y col⁷ demostraron que durante el desarrollo de NAFLD generado por el consumo de una dieta rica en grasas (DG), los niveles elevados de ácidos grasos libres se relacionaron con el aumento en el estrés oxidativo. Si bien muchos trabajos experimentales sugieren que el estrés oxidativo está asociado con la mayoría de los componentes de SM y NAFLD^{8, 9}, en un trabajo reciente hemos demostrado que puede haber un estado oxidativo normal en un modelo con SM inducido por una DG¹⁰.

Para prevenir la progresión de la enfermedad hepática simple a NASH o cirrosis es necesario conocer la fisiopatología y los factores de riesgo involucrados en el proceso con el objeto de desarrollar estrategias de intervención temprana. Por lo tanto, considerando que la DG está asociada con el SM y NAFLD, el presente estudio fue diseñado con el objetivo de evaluar los cambios morfológicos hepáticos y su asociación

con componentes que caracterizan el SM. para ello utilizamos un modelo experimental de obesidad con SM generado en conejos mediante la administración de una DG durante 12 semanas.

MATERIALES AND METODOS

Animales y dietas

Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la UNT. Se emplearon 24 conejos machos híbridos de Flandes que pesaron entre 850-1,000 g. Los animales fueron alojados en el bioterio del INSIBIO en jaulas individuales bajo condiciones controladas de temperatura y humedad y ciclos de 12 hs de luz/oscuridad. Después de una semana de aclimatación y consumo de 100 g diarios de alimento balanceado de engorde (GANAVE, Pilar, Argentina) los animales fueron separados aleatoriamente en dos grupos: un grupo (n=12) continuó recibiendo alimento balanceado (DC) y el otro grupo (n=12) recibió una dieta rica en grasas que consistió en agregar a la DC un 7% de aceite de maíz y 3% de manteca de cerdo (DG).

Los animales con DC recibieron el equivalente al 10 % de su peso corporal en alimento mientras que los animales con DG fueron alimentados *ad libitum*, ambos grupos durante 12 semanas. Los animales fueron pesados diariamente.

Determinaciones bioquímicas y clínicas

Al final de la intervención dietaria, los animales fueron ayunados durante 12 horas, pesados y anestesiados con ketamina (75 mg/kg) and diazepam (0.5 mg/kg). La presión arterial media (PAM) y la frecuencia cardiaca (FC) se midieron directamente mediante un catéter inserto en la arteria carótida y conectado a un transductor de presión (Gould-Statham P23, California, USA). Después de la medición de PAM la sangre fue recolectada desde el catéter en tubos conteniendo EDTA 10^{-7} M. El animal fue eutanizado mediante sobredosis de anestésico y se realizó una incisión por la línea media a fin de extraer el tejido adiposo visceral y el hígado, los cuáles fueron pesados. La GVA fue expresada como porcentaje de la grasa retroperitoneal y mesentérica con respecto al peso total del animal x 100.

El colesterol total (CT), HDL-C, lipoproteína de baja densidad (LDL-C), TG y glucosa fueron determinados por métodos colorimétricos mediante kits comerciales (Wiener, Argentina). La insulina se midió por radioinmunoanálisis (Merck Millipore, Massachusetts, USA).

La RI se estableció calculando el índice:

$$\text{HOMA} = \text{FIRI} \times \text{FPG}/22.5$$

donde FIRI es el nivel de insulina plasmático en ayunas ($\mu\text{U}/\text{ml}$) and FPG es el nivel de glucosa en ayunas (mmol/l).

Test de tolerancia a la glucosa

Se utilizó la técnica descrita por Georgiev y col¹¹. Los conejos fueron ayunados durante 12 hs, con consumo de agua *ad-libitum*. Para la obtención del plasma, se tomaron muestras de sangre de la vena marginal de la oreja. Las muestras se recolectaron con hematocritos heparinizados que posteriormente se centrifugaron durante 15 minutos a 3000 rpm. Se tomó la muestra basal correspondiente al minuto 0, se administró vía intraperitoneal una solución de glucosa al 20 % (10 ml/ kg de peso) y se procedió a la toma de muestra de sangre a los 60 y 120 minutos posteriores. Los niveles de glucosa en plasma se midieron usando reacciones colorimétricas con kits comerciales (Wiener, Rosario, Argentina) en espectrofotómetro a 505 nm y los resultados se expresaron en mg/dl.

Determinación de peroxidación lipídica y relación GSH/GSSH

La peroxidación lipídica en suero se evaluó midiendo las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) según Karbiner y col.¹². Brevemente, se procedió a desproteinizar 500 μl de suero con 1000 μl de ácido tricloroacético (TCA) al 10%, se centrifugó 15 minutos a 5000 rpm. Se recuperó una alícuota de 500 μl del sobrenadante, y se incorporó la misma cantidad de ácido tiobarbitúrico, se incubó en baño termostático a 100 ° C durante 45 minutos. Luego, se colocó en baño con hielo durante 10 minutos y se midió en espectrofotómetro a 540 nm. Los resultados fueron expresados como nmol/ mg de proteínas. Las proteínas se determinaron por el método de Lowry.

Para la determinación de la relación glutatión reducido/glutatión oxidado (GSH/GSSH), las proteínas del suero se precipitaron mediante la adición de TCA al 10%. La mezcla se centrifugó (15 min, 10.000 rpm, 4 ° C). El sobrenadante fue incubado con 0.3 mM NADPH y 6 mM ácido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoico (DTNB)

durante 2 minutos a temperatura ambiente para determinar los niveles de glutatión total (TGL). Luego, se añadió la enzima glutatión reductasa (0.077 U), y la mezcla se incubó durante 35 minutos. El sobrenadante (200 μ L) se incubó 15 minutos con DTNB 6 mM y buffer fosfato (pH 7.4) para la determinación del glutatión reducido (GSH). La absorbancia se midió a 412 nm. El GSH y TGL se calcularon usando una curva estándar GSH. El GSSG se calculó como $GSSG = TGL - GSH$. Los resultados se expresaron como μ g / mg de proteína, y las proteínas se determinaron por el método de Lowry.

Histología

El índice de masa hepático fue calculado como la relación entre el peso del hígado y el peso del animal x 100. Para el estudio histológico una porción del lóbulo izquierdo fue recolectado en tubos de 2 ml conteniendo solución al 10 % de formol buferado a pH 7. Las muestras se incluyeron en histoplast y se realizaron cortes de 3 μ m que fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Las secciones (cuatro de cada hígado) fueron codificadas y analizadas por el patólogo sin conocer las características de la dieta.

La esteatosis hepática y los grados de actividad NAFLD fueron evaluados en forma semicuantitativa de acuerdo a Kleiner y col¹³. Brevemente, los grados de esteatosis fueron definidos de la siguiente manera: 0: presencia de gotas grasas en el interior de < 5% de los hepatocitos; 1: presencia de gotas grasas intrahepáticas en 5–33 % de los hepatocitos; 2: presencia de gotas grasas intrahepáticas in 33–66 % de los hepatocitos; 3: presencia de gotas grasas intrahepáticas >67 % de los hepatocitos. El grado de actividad de NAFLD es la suma de tres rasgos evaluados de manera equivalente: esteatosis (0–3), inflamación lobular (0–3) y abombamiento hepatocelular (0–2). La medición del tamaño de las gotas de grasa y su densidad (número de gotas por mm²) fue realizada incorporando una cuadrícula al ocular. El tamaño de las gotas fue determinado de la siguiente manera: 10 gotas fueron elegidas aleatoriamente en cuatro campos de cada preparado.

La esteatosis microvesicular fue definida como la presencia no zonal y contigua de grupos de hepatocitos con gotas de grasa en su interior pero sin desplazamiento del núcleo en preparados de hígado teñidos con Hematoxilina-eosina.

Análisis estadístico

Los datos se presentan como media \pm error estándar. El test de t de Student para muestras pareadas o no pareadas fue empleado para comparar los dos grupos. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

RESULTADOS

Parámetros clínicos y bioquímicos.

Al cabo de 12 semanas de alimentación con DG al 10 % los animales presentaron incremento del peso corporal, de la GVA, de la PAM y de la FC con respecto a los animales alimentados con DC (**Tabla 1**).

Tolerancia a la glucosa, insulina y HOMA

Los conejos que recibieron una DG presentaron varias anormalidades de su metabolismo hidrocarbonado: mayores niveles de glucosa en ayunas, de insulina plasmática y del índice HOMA (Tabla 1), y una prueba de tolerancia a la glucosa anormal: 60 min: DC=175±14 mg/dl vs DG=265±20 mg/dl; 120 min: DC=134±15 mg/dl vs DG=180.8±10 mg/dl; $p<0.05$; test de t para muestras no pareadas).

Parámetros de estres oxidativo

No se observaron diferencias en los niveles de TBARS (DC: 0.98 ±0.16 μ moles/mg vs DG: 1.66±0.7 μ moles/mg). El TGL fue más alto en los animales alimentados con DC (DC: 4.56±0.56 μ g/mg vs DG: 2.51±0.18 μ g/mg, $n=12$, $p<0.05$, test de t para muestras no pareadas) mientras que GSH fue similar en ambos grupos dietarios (CD: 1.28±0.35 μ g/mg vs DG: 1.92±0.12 μ g/mg). GSSH fue significativamente menor en animales que recibieron DG (CD: 3.28±0.89 μ g/mg vs DG: 0.58±0.11 μ g/mg; $n=12$, $p<0.05$, test de t para muestras no pareadas). Por lo tanto la relación GSH/GSSH fue más alta en el suero de animales alimentados con DG con respecto a DC (DC: 0.3±0.12 μ g/mg vs DG: 3.9±0.11 μ g/mg; $n=12$, $p<0.05$, test de t para muestras no pareadas).

Histología hepática

La DG no modificó el peso del hígado (DC= 72.6 ± 3.0 g vs DG= 75.6 ± 4.0 g) o el índice de masa hepático (DC: 3.2 ± 0.14 % vs DG: 2.6 ±0.16 %).

La DG generó una esteatosis microvesicular (**Figura 1**). Se observaron numerosas gotas de grasa pequeñas alrededor del núcleo de los hepatocitos en el 100

% de los preparados analizados. Los hepatocitos tenían un aspecto casi “espumoso”. El tamaño medio de las gotas fue de $5 \pm 0.2 \mu\text{m}$ y la densidad fue de 2619 ± 6 vesículas/ mm^2 . No se observó evidencia de inflamación lobular o abombamiento. En el grupo DG el grado de actividad NAFLD, que refleja la severidad patológica de NAFLD fue de 2.1 ± 0.3 .

DISCUSIÓN

Una DG administrada durante 12 semanas produjo aumento de peso corporal, de PAM, FC, niveles de insulina y HOMA. La GVA también se incrementó sugiriendo que la acumulación de tejido adiposo visceral es sensible a una DG y por lo tanto una dieta de este tipo administrada durante 12 semanas puede desarrollar un modelo animal experimental con obesidad central. Estos hallazgos coinciden con trabajos previos^{14, 15}. Considerando que el metabolismo lipídico de los conejos es similar al del hombre y que desarrollan cambios fisiopatológicos que se asemejan a las características clínicas de individuos obesos humanos¹⁶, podemos considerar que el modelo desarrollado es un modelo experimental de SM.

Los niveles elevados de TG constituyen una anomalía dislipémica común en la obesidad inducida por DG^{17, 18, 19}. Sin embargo en este estudio encontramos valores normales de TG. Zhao y col.¹⁵ obtuvieron resultados similares a los nuestros. Considerando que en la población general existe un subgrupo de individuos obesos que no tienen factores de riesgo cardiometabólico tales como dislipemia²⁰, Taskinen y col.²¹ intentaron explicar esta observación. Ellos compararon sujetos obesos normotriglicéridémicos e hipertriglicéridémicos con igual grado de adiposidad e índice de masa corporal y demostraron que el incremento de TG plasmáticos es causado por la combinación de una secreción incrementada y un metabolismo disminuido de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lo que se asocia con niveles elevados de apo C III (apolipoproteína inhibidora de la lipólisis). La presencia de RI asociada con niveles normales de TG es un hallazgo común entre los individuos afro americanos²². La actividad de la lipoproteína lipasa (LPL) está relacionada con disminución de los niveles de TG y considerando que la síntesis y actividad de esta enzima es estimulada por la insulina²³, ha sido sugerido que la RI podría empeorar la actividad de la LPL. Sumner y col.²² encontraron que en los individuos afroamericanos la RI no está asociada con una reducción en la actividad de la LPL. Esta insensibilidad de la LPL a la insulina le permitiría seguir metabolizando los TG en presencia de RI y explicaría la coexistencia de RI y normotriglicéridemia en este grupo. Por lo tanto se puede hipotetizar que en el presente modelo la capacidad de metabolización de la VLDL es

capaz de compensar el incremento en su secreción manteniendo así los niveles de TG en sus valores normales.

Numerosos trabajos han demostrado que el estrés oxidativo juega un papel importante en la patogénesis del SM. El estrés oxidativo surge en un sistema cuando la producción de radicales libres que se generan en los procesos metabólicos fisiológicos exceden a la capacidad antioxidante del sistema^{24, 25}. Sin embargo, y en coincidencia con trabajos previos de nuestro laboratorio¹⁰ no encontramos estrés oxidativo en este modelo de conejo obeso con SM. Ammon y col.²⁶ demostraron en islotes pancreáticos de rata aislados que la glucosa incrementa el GSH y reduce GSSG en una manera dependiente de la dosis, mientras que la insulina disminuye el GSH. Si tenemos en cuenta que la RI es una condición fisiopatológica en la cual la célula es insensible a la acción de la insulina, podemos hipotetizar que en nuestro modelo el incremento de glucosa en ayunas y la RI son motivos por los cuales el equilibrio del sistema tiende a evitar la reducción de la síntesis de GSH. Este fenómeno explicaría el aumento en la relación GSH/GSSG e implicaría un mecanismo compensatorio del sistema para restaurar la homeostasis redox.

Los resultados del estudio histológico mostraron que la DG produce esteatosis microvesicular hepática sin abombamiento del hepatocito ni fibrosis. En coincidencia con estos hallazgos, Pagano y col²⁷ demostraron que la RI unida a varias alteraciones metabólicas propias del SM son rasgos comunes en la NAFLD temprana y jugarían un papel fundamental en el desarrollo de la enfermedad hepática. Lee y col.²⁸ sugieren que el SM sin dislipemia no sería suficiente para causar enfermedad hepática. Sin embargo, ellos arribaron a esta conclusión empleando un modelo de cobayo alimentado con una dieta alta en fructosa. Esto implica que una dieta de este tipo puede inducir un SM sin daño hepático pero ninguna conclusión puede arribarse con respecto al papel de una DG. En la patogénesis de la NAFLD.

La presencia de esteatosis microvesicular acompañada de RI pero en ausencia de niveles elevados de TG séricos y estrés oxidativo sugieren que la RI sería el principal biomarcador temprano de NAFLD en individuos con características clínicas de SM. Este punto de vista es reforzado por el trabajo de Storlien y col²⁹, quienes demostraron que la hiperinsulinemia predice el incremento del riesgo de la enfermedad

NAFLD en un periodo de seguimiento de 5 años, y esta asociación fue significativa después del ajuste para los cambios en el estado de obesidad y el índice de masa corporal a lo largo del periodo estudiado. Sin embargo, Matsuzawa-Nagata y col³⁰ encontraron que el estrés oxidativo es la causa que dispara la RI inducida por una DG. Probablemente la diferencia con nuestros hallazgos sea el modelo usado por estos autores (ratón), cuyo metabolismo lipídico es diferente del metabolismo de humanos y conejos³¹.

Conclusión: el consumo de una DG al 10% durante 12 semanas generó un modelo de conejo obeso con SM caracterizado por RI, intolerancia a la glucosa, aumento de la GVA y de la PAM. Este modelo mostró valores lipídicos plasmáticos normales y alteraciones histológicas hepáticas tempranas compatibles con la esteatosis microvesicular. Considerando que no se detectó incremento del estrés oxidativo, podemos afirmar que la RI sería un predictor más importante de los cambios tempranos en la morfología hepática que la dislipemia o el estrés oxidativo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Grundy SM, Brewer HB, Cleeman JI, Smith SC, Lenfant C for the Conference Participants. NHLBI/AHA Conference Proceedings: Definition of Metabolic Syndrome. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. *Circulation* 109: 433-438; 2004.
2. Frayn KN, Coppack SW. Adipose tissue and the insulin resistance syndrome. *Proc Nutr Soc.* 60: 375-80; 2001.
3. Gariani K, Philippe J, Jornayvaz FR. Non-alcoholic fatty liver disease and insulin resistance: From bench to bedside. *Diabetes and Metabolism* 39:16-26; 2013.
4. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 50: 1844-1850; 2001.
5. Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino R, Mecca F, Depetris N. Nonalcoholic Steatohepatitis, Insulin Resistance, and Metabolic Syndrome: Further Evidence for an Etiologic Association. *Hepatology* 35:367-372; 2002.
6. Jakobsen MU, Berentzen T, Sørensen TIA, Overvad K. Abdominal Obesity and Fatty Liver. *Epidemiol Rev* 29: 77-87; 2007
7. Liu J, Han L, Zhu L, Yu Y. Free fatty acids, not triglycerides, are associated with non-alcoholic liver injury progression in high fat diet induced obese rats. *Lipids in Health and Disease* 15:27; 2016. DOI 10.1186/s12944-016-0194-7.
8. Hopps E, Noto D, Caimi G, Averna MR. A novel component of the metabolic syndrome: The oxidative stress. *Nutr Metabol Cardiovasc Dis* 20:72-77; 2009.
9. Jarukamjorn K, Jearapong N, Pimson C, Chatuphonprasert W. A High-Fat, High-Fructose Diet Induces Antioxidant Imbalance and Increases the Risk and Progression of nonalcoholic Fatty Liver Disease in Mice. *Scientifica* 2016, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5029414>
10. Alarcon G, Roco J, Medina M, Medina A, Peral M, Jerez S. High fat diet-induced metabolically obese and normal weight rabbit model shows early vascular dysfunction: mechanisms involved. *Int J Obes (Lond)*; 2018. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0020-6>.

11. Georgiev IP, Kanelov IN, Dimitrova SS, Iliev YI, Tanev SI, Georgieva VL, Bivolarski BL, Vachkova EG, Grigorov II. An experimental model for evaluation of glucose tolerance in rabbit. *Bulgarian J Veter Med* 9: 27-35; 2006.
12. Karbiner MS, Sierra L, Minahk C, Fonio MC, Peral de Bruno M, Jerez S. The role of oxidative stress in alterations of hematological parameters and inflammatory markers induced by early hypercholesterolemia. *Life Sci* 2013; 93: 503–508.
13. Kleiner DE¹, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, Ferrell LD, Liu YC, Torbenson MS, Unalp-Arida A, Yeh M, McCullough AJ, Sanyal AJ. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 41:1313-21; 2005.
14. Jerez S, Scacchi F, Sierra L, Peral de Bruno M. Vascular hyporeactivity to angiotensin II and noradrenaline in a rabbit model of obesity. *J Cardiovasc Pharmacol* 59: 49-57; 2012.
15. Zhao S, Chu Y, Zhang C, Lin Y, Xu K, Yanq P. Diet- induced central obesity and insulin resistance in rabbits. *J Animal Physiol Animal Nutr* 92:105-111; 2007
16. Zhang X-J, Chinkes DL, Aarsland A, Herndon DN, Wolfe RR Lipid metabolism in diet-induced obese rabbits is similar to that of obese humans. *J Nutr* 138:515-521; 2008.
17. Eckel RH. The Complex Metabolic Mechanisms Relating Obesity to Hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:1946-1948; 2011.
18. Carroll JF, Luang MI, Hester RL, Cockrell K, Mizelle L. Hemodynamic alterations in hypertensive obese rabbits. *Hypertension* 26:465-470; 1995.
19. Arias-Mutis OJ, Marrachelli VG, Ruiz-Saurí A, Alberola A, Morales J, Such-Miquel L, Zarzoso M. Development and characterization of an experimental model of diet-induced metabolic syndrome in rabbit. *PLoS ONE* 2017; <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0178315>
20. Pataky Z., Bobbioni-Harsch E., Golay A. Open questions about metabolically normal obesity. *Int J Obes* 34, S18–S23; 2010.
21. Taskinen M-R, Adiels M, Westerbacka J, Soderlung S, Kahari J, Lundbom J. Dual Metabolic Defects Are Required to Produce Hypertriglyceridemia in Obese Subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31:2144-2150; 2011.

22. Sumner AE, Vega GL, Genovese DJ, Finleya K, Bergmanc RN, Bostond RC. Normal triglyceride levels despite insulin resistance in African Americans: role of lipoprotein lipase B. *Metab Clin Exp* 54: 902-909; 2005.
23. Eckel RH. Lipoprotein lipase, a multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N Engl J Med* 320:1060-1068; 1989.
24. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 114(12):1752-1761; 2004.
doi:10.1172/JCI200421625. /271028
25. Hopps E, Noto D, Caimi G, Averna MR. A novel component of the metabolic syndrome: The oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 20; 72-77; 2010.
26. Ammon HP, Grimm A, Lutz S, Wagner-Teschner D, Händel M, Hagenloh I. Islet glutathione and insulin release. *Diabetes* 29: 830-834; 1989.
27. Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino, R, Mecca F, Depetris N, Cassader M et al. Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association. *Hepatology* 35: 367-372; 2002.
28. Lee L, Alloosh M, Saxena R, Van Alstine W, Watkins BA, Klaunig JE et al. Nutritional model of steatohepatitis and metabolic syndrome in the Ossabaw miniature swine. *Hepatology* 2009. <https://doi.org/10.1002/hep.22904>
29. Storlien LH, Jenkins AB, Chisholmw J, Pascoes S, Khoum E, Kraegen W. Influence of dietary fat composition on development of insulin resistance in rats: relationship to muscle triglyceride and omega-3 fatty acids in muscle phospholipid. *Diabetes* 40:280-289; 1991.
30. Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, Nakamura S, Kurita S, Misu H et al. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism* 57: 1071-1077; 2008.
31. Bergen WG, Mersmann HJ. Comparative Aspects of Lipid Metabolism: Impact on Contemporary Research and Use of Animal Models. *J Nutr* 135: 2499-2502; 2005.

Legenda de Figura:

Figura 1. Cortes de hígado teñidos con Hematoxilina-eosina. A y C (10x de aumento): procedentes de animales alimentados con dieta control. B y D (63x de aumento): procedentes de animales alimentados con dieta rica en grasas al 10 %. Se observa que los cortes de hígados de animales con dieta grasa presentan pequeñas vesículas de grasa distribuidas uniformemente dando al hepatocito el aspecto de células espumosas pero sin desplazamiento de la posición central del núcleo. Estas características histológicas son compatibles con la definición de esteatosis microvesicular.