



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
DIVISIÓN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL

**ESTABLECER UN PROTOCOLO PARA LA DETERMINACIÓN DE LÍPIDOS EN TEJIDO
HEPÁTICO DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETA ALTA EN GRASA Y SU RELACIÓN
CON ALTERACIONES EN EL METABOLISMO**

Modalidad: Actividades relacionadas con la profesión

Presenta:

Laura Stefania Berlanga Tavares

MATRÍCULA

2182030853

ASESORES:

Dra. María Angélica Gutiérrez Nava

Dr. Julio Isael Pérez Carreón

Lugar de realización: Laboratorio de Ecología Microbiana

Octubre, 2024

Tabla de contenido

MARCO TEÓRICO	4
ANATOMÍA MICROSCÓPICA DEL HÍGADO.....	4
ACUMULACIÓN NORMAL DE LÍPIDOS EN EL HÍGADO.....	5
BIOSÍNTESIS DE LAS VACUOLAS DE LÍPIDOS (VL)	6
ESTEATOSIS HEPÁTICA	8
ENFERMEDAD DEL HÍGADO GRASO NO ALCOHÓLICO (EHGNA).....	9
TÉCNICAS DE TINCIÓN HISTOLÓGICAS.....	10
COLORANTES HIDROFÓBICOS.....	11
TINCIÓN ROJO OLEOSO (<i>OIL RED O</i>)	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
OBTENCIÓN DE MUESTRAS	13
PROTOCOLO DE LA OPTIMIZACIÓN DE LA TINCIÓN ROJO OLEOSO (<i>OIL RED O</i>) EN TEJIDO FRESCO.....	13
PROCEDIMIENTO.....	14
<i>PROTOCOLO 1. OIL RED OAL 60% EN SOLUCIÓN ACUOSA.....</i>	<i>15</i>
<i>PROTOCOLO 2. OIL RED OAL 60% + ÁCIDO SALICÍLICO (6%) EN SOLUCIÓN ACUOSA.....</i>	<i>16</i>
MICROSCOPIA	16
RESULTADOS	17
OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO	17
ANÁLISIS DE LA ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS EN HÍGADOS DE RATAS ALIMENTADAS CON DIETA ALTA EN GRASA Y FRUCTOSA (HFFD)	21
CONCLUSIÓN	25
REFERENCIAS.....	26

INTRODUCCIÓN

Los trastornos metabólicos se originan por varios factores, aunque muchas veces están relacionados con el estilo de vida sedentaria, una dieta baja en fibra y el consumo de xenobioticos dietéticos. El síndrome metabólico (MetS) es una combinación de factores de riesgo, incluido un desequilibrio en el metabolismo de los carbohidratos y los lípidos, puede manifestarse como obesidad, diabetes (o hiperglucemia y resistencia a la insulina), hiperlipidemia (niveles elevados de triglicéridos y colesterol), enfermedades cardiovasculares (aterosclerosis e hipertensión) e incluso enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA).

Para comprender el estado metabólico de un individuo o animal, es crucial determinar el nivel de acumulación de lípidos de órganos como el hígado o los músculos, puesto que el contenido interhepático de triglicéridos se relaciona con diversas alteraciones metabólicas. Sin embargo, los diferentes métodos especializados para la determinación de lípidos (espectrometría de masas, biosensores ópticos, mecánicos y electroquímicos) [10] tienden a consumir mucho tiempo e implican una gran cantidad de muestra, además estos métodos requieren de mucha mano de obra y equipo específico de difícil adquisición para su realización.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue la optimización de un protocolo para la visualización de la acumulación de vacuolas de grasa en el hígado de ratas Wistar, por medio de la técnica de tinción rojo oleoso (ORO).

MARCO TEÓRICO

Anatomía microscópica del hígado

El hígado es una estructura tridimensional compleja que consta de elementos epiteliales y mesenquimales dispuestos en unidades microscópicas repetitivas. Esta organización estructural y funcional permite la evaluación de procesos patológicos difusos en pequeñas muestras de biopsia representativas. La estructura microscópica del hígado se representa de varias formas, siendo la más común el lóbulo. En el que la estructura central es la vénula hepática terminal (vena central) y la periferia está delimitada por los tractos porta. Estos últimos son canales que se originan en el hilio y recorren el hígado en un patrón ramificado. La estructura dentro de estos tractos incluye conductos biliares, arteria hepática, vena porta, vasos linfáticos, fibras nerviosas y algunas células inflamatorias [10].

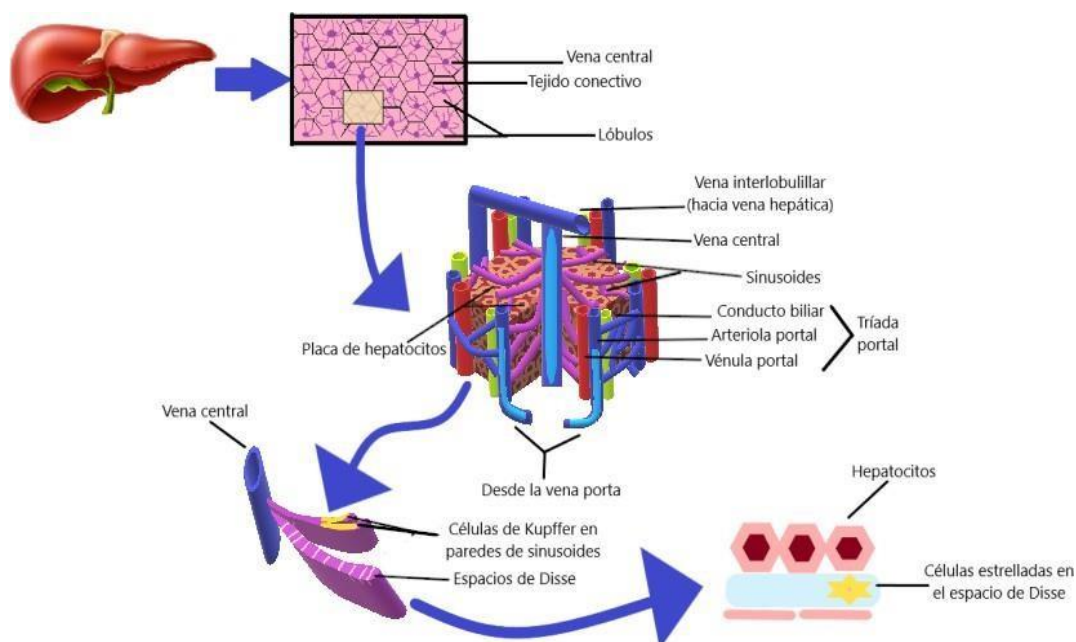


Figura 1. Unidad histológica del hígado. El lóbulo hepático con su forma hexagonal organizada y la distribución de la tríada portal. (Elaboración propia, adaptada de: OpenStax, 2013; Kanel, G., 2016)

Los sinusoides adyacentes, están revestidos por células endoteliales y de Kupffer, mientras que el espacio perisinusoidal, ubicado entre las células endoteliales y los hepatocitos,

contienen células estrelladas y fibras de colágeno. Los hepatocitos tienen un diámetro promedio de 25 a 40 μm y son poliédricos y multifacéticos. Las células tienen tres límites celulares distintos: Membranas sinusoidales, laterales (intercelulares) y canaliculares. El núcleo de las células hepáticas está ubicado centralmente dentro del hepatocito y mide aproximadamente 10 μm de diámetro [8].

Las células de Kupffer son células de revestimiento sinusoidal que funcionan como macrófagos tisulares. Las células endoteliales son células sinusoidales alargadas y aplanadas. Están presentes numerosas proyecciones citoplasmáticas y porosas agrupadas o espacios que varían en tamaño de 0.1 a 0.2 μm . Las células estrelladas se encuentran dentro de los agujeros perisinusoidales de las células hepáticas a lo largo del espacio de Disse y a menudo contienen gotitas de lípidos de tamaño variable que transportan una alta concentración de vitamina A (palmitato de retinol). El espacio de Disse se encuentra entre los hepatocitos y las células endoteliales [8].

Acumulación normal de lípidos en el hígado

Los principales lípidos en la dieta son los triglicéridos, el colesterol y los fosfolípidos; estos son un grupo heterogéneo de pequeñas moléculas hidrofóbicas o anfipáticas que sirven como bloques de construcción de las membranas celulares, como precursores de hormonas y son moléculas importantes para el almacenamiento de energía, la señalización celular y la comunicación entre órganos [20]. El hígado es clave en la regulación de la distribución de lípidos dentro del cuerpo, el mantenimiento de la homeostasis lipídica requiere de la coordinación de la captación, distribución, almacenamiento y utilización de lípidos en las células y órganos [9].

En respuesta al ayuno y la alimentación, los hepatocitos sintetizan, almacenan y secretan lípidos para mantener la homeostasis lipídica de todo el cuerpo. La captación externa de ácidos grasos y la síntesis interna *de novo* se equilibran mediante las tasas de degradación de ácidos grasos y la secreción de ácidos biliares a través de transportadores dependientes principalmente de ATP hacia los canaliculos y lipoproteínas a través del aparato secretor hacia la circulación. Estos procesos están regulados por una combinación de factores, como

la disponibilidad de sustratos y hormonas metabólicas. En condiciones fisiológicas, solo pequeñas cantidades de ácidos grasos se almacenan como lípidos en vacuolas lipídicas citosólicas en el hígado [21].

Los lípidos generalmente se compartimentan en orgánulos especializados llamados vacuolas de lípidos (VL), que permiten a las células almacenar y liberar lípidos de manera regulada. Adaptan su tamaño, abundancia, composición lipídica y proteica e interacciones entre orgánulos a los cambios metabólicos [21]. Consisten en un núcleo hidrofóbico de lípidos neutros (predominantemente triglicéridos y ésteres de colesterol) envueltos en una monocapa de fosfolípidos, incrustadas en esta monocapa hay proteínas heterogéneas y enzimas responsables de la síntesis o metabolismo de lípidos neutros [20].

La acumulación excesiva de VL en el hígado debido al metabolismo lipídico desregulado se considera una respuesta adaptativa al aumento del flujo de ácidos grasos libres de la dieta [5], el tejido adiposo y la lipogénesis *de novo* en los hepatocitos, promueve la activación de mecanismos patogénicos que conducen a la esteatosis, la inflamación hepatocelular y la fibrosis [20].

Biosíntesis de las vacuolas de lípidos (VL)

El metabolismo de los lípidos hepáticos consiste en el transporte de los triglicéridos dietéticos al hígado desde los intestinos (a través de quilomicrones). La síntesis hepática de los triglicéridos dietéticos a partir de los ácidos grasos y glicerol se producen bajo la influencia de la insulina en el estado posprandial. Los triglicéridos dietéticos se secretan en la sangre como lipoproteínas de muy baja densidad que se almacenan en el tejido adiposo como triglicéridos dietéticos reesterificados o se metabolizan ácidos grasos y se utilizan como fuente de energía.

Las fuentes de ácidos grasos para la formación de triglicéridos hepáticos, proviene del conjunto de plasma (ácidos grasos no esterificados; AGNE) o de ácidos grasos recién sintetizados en el hígado mediante lipogénesis *de novo* (LDN) (Figura 2). En la obesidad, la desregulación del metabolismo de los lípidos provoca un exceso de producción de ácidos grasos que altera tejido adiposo y vías metabólicas hepáticas. El exceso de triglicéridos dentro del hígado puede almacenarse como vacuolas en los hepatocitos [18].

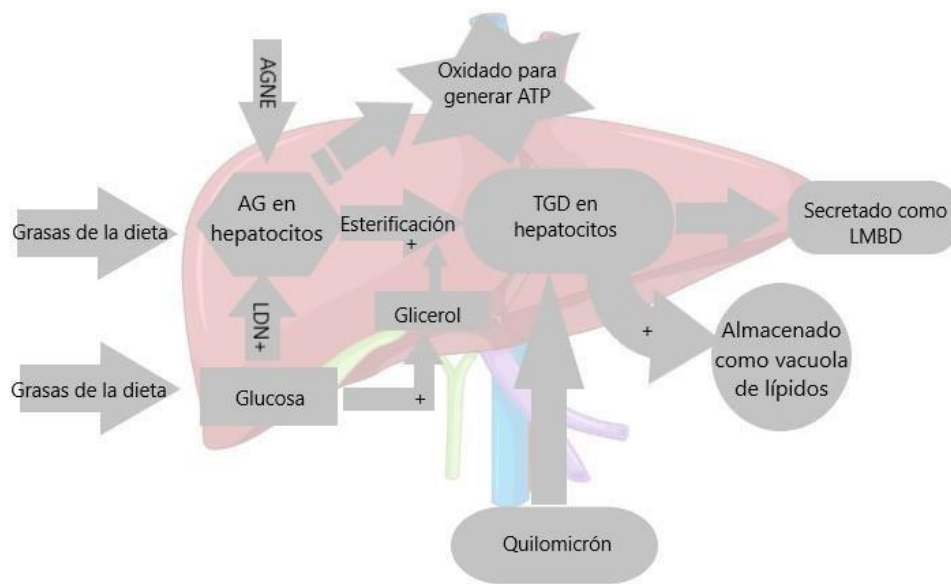


Figura 2. Metabolismo de lípidos en el hígado. Todos los pasos indicados por (+) son estimulados por la insulina. TGD: triglicéridos; LMBD: lipoproteína de muy baja densidad; AG: ácidos grasos; AGNE: ácidos grasos no esterificados; LDN: lipogénesis *de novo*; ATP: trifosfato de adenosina. (Elaboración propia, adaptada de: Qureshi, K. & Abrams, G.A., 2007).

La biosíntesis de las VL está controlada por el retículo endoplasmático (RE) (Figura 3), los ácidos grasos que ingresan al hígado se dirigen al RE para su esterificación. En el lado citosólico y luminal de las membranas de la bicapa del RE, hay enzimas específicas involucradas en la síntesis de lípidos neutros (acil-CoA:colesterol O-aciltransferasa 1 y 2; ACAT1 y ACAT2). Las diacilglicerol O-aciltransferasas 1 y 2 (DGAT1 y DGAT2) producen triglicéridos a partir de ácidos grasos citosólicos. La DGAT1 se encuentra exclusivamente en la membrana del RE y utiliza diacilglicerol (DAG) derivado de la lipólisis de triglicéridos en el citosol para resintetizar triglicéridos en el lumen del RE. La DGAT2 está presente tanto en la bicapa del RE como en la superficie de las VL y desempeña un papel crucial en la síntesis de triglicéridos *de novo* a partir de ácidos grasos.

Cuando la concentración citosólica de ácidos grasos es alta, la DGAT2 se reubica en la superficie de las VL y sintetiza triglicéridos para incorporarlos a las VD. Tanto la DGAT1 como la DGAT2 previenen la acumulación de lípidos lipotóxicos, como DAG y ácidos

grasos, que de otro modo activarían las vías de estrés del RE que conducen a la inflamación de los hepatocitos. La gemación del VL está relacionada con la concentración de triglicéridos en la membrana de la bicapa del RE. Un estudio reciente mostró que se forma una lente de VL a partir de la bicapa del RE cuando la concentración de triglicéridos oscila entre el 5 y el 10 % molar. En esta etapa, el crecimiento de la VL es impulsado por proteínas de clase I y clase II que se relocalizan en la membrana del RE para la síntesis de triglicéridos [21].

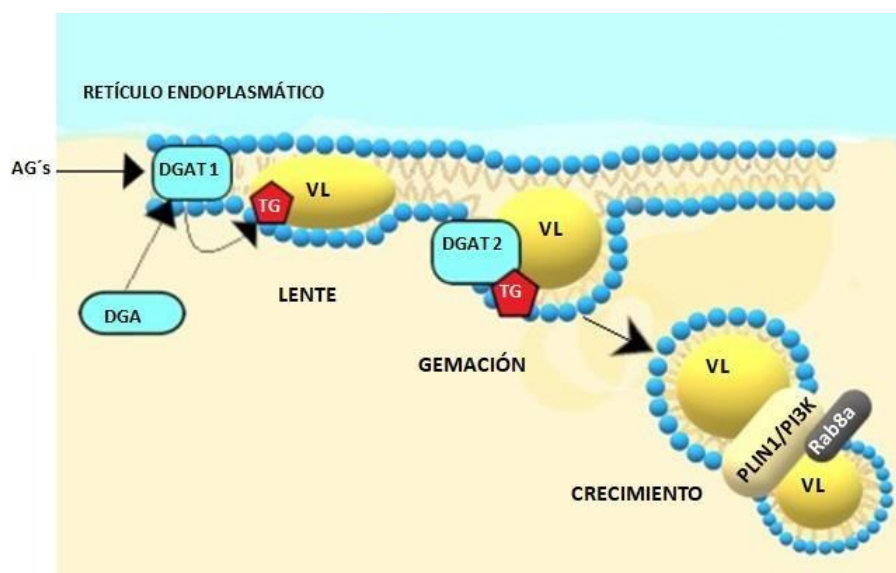


Figura 3. Biosíntesis de las vacuolas de lípidos. CIDE, efector inductor de muerte celular; DAG, diacilglicerol; DGAT1/2, diacilglicerol O-aciltransferasa 1/2; RE, retículo endoplasmático; AG's, ácidos grasos; VL, vacuola lipídica; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinasa; PLIN1, perilipina-1; TG, triglicérido. (Elaboración propia, adaptada de: Scorletti, E., 2022).

Esteatosis hepática

La esteatosis hepática se define como la acumulación de grasa interhéptica de al menos el 5% del peso del hígado. Se caracteriza por la acumulación de vacuolas de lípidos microvesiculares y/o macrovesiculares ricas en ácidos grasos dentro de los hepatocitos, en ausencia de inflamación o lesión hepática [14]. La infiltración de grasa se divide cualitativamente en tres categorías: leve (<30% de los hepatocitos están afectados), moderada

(30%-60% de los hepatocitos están afectados) y grave (>60% de los hepatocitos están afectados) [19].

Inicialmente, se cree que la síntesis de ácidos grasos y la acumulación de grasa en el hígado son hepatoprotectoras; sin embargo, el exceso de contenido de grasa interhéptica puede provocar disfunción metabólica hepática, inflamación y formas avanzadas de enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA). La esteatosis hepática no alcohólica está asociada con la obesidad, la diabetes tipo 2 y la dislipidemia [15].

Histológicamente, la esteatosis macrovesicular se caracteriza por una única vacuola de grasa voluminosa en los hepatocitos que desplaza el núcleo hasta el borde de la célula. Esto es el resultado del almacenamiento de lípidos intracelulares, lo que causa la expansión del volumen de los hepatocitos obstruyendo los espacios sinusoidales y aumentando la resistencia vascular en la microcirculación hepática [19].

Por otro lado, la esteatosis microvesicular se caracteriza por el hecho de que el citoplasma contiene pequeñas vesículas lipídicas de menos de 1 µm de diámetro sin dislocación nuclear. Se conoce poco sobre la patogenia de la esteatosis microvesicular, sin embargo, en muchos casos, un defecto primario puede ser una disfunción mitocondrial. En individuos con esta esteatosis existe una tendencia a un metabolismo celular más deletéreo, asociado al estrés oxidativo, que produce aniones superóxido y peróxido, induciendo edema mitocondrial y formación de mega-mitocondrias. Estos mecanismos están asociados a un proceso inflamatorio sistémico crónico de mayor intensidad [5, 19].

Enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA)

Los desequilibrios entre las tasas de formación de las vacuolas de lípidos, su movilización (lipolisis y autofagia) y la secreción de lipoproteínas o ácidos biliares pueden provocar acumulación excesiva de lípidos, una condición patológica conocida como enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA), es una enfermedad crónica hepática caracterizada por la presencia de lípidos en más del 5% de los hepatocitos. La EHGNA abarca diferentes estadios histopatológicos, que van desde la esteatosis hepática clínica asintomática hasta la

esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), definida histológicamente como lesión de los hepatocitos debido a inflamación y abombamiento hepatocelular. La progresión de la esteatosis a EHNA puede ir seguida del desarrollo de fibrosis (en el 25%-33% de las personas con EHGNA), cirrosis hepática (5% a 15% de las personas con EHGNA), insuficiencia hepática (38% de las personas después de 7 a 10 años del diagnóstico de EHGNA) y potencialmente carcinoma hepatocelular (2%-5%).

Actualmente se reconoce a la EHGNA como una enfermedad multisistémica que afecta a órganos extrahepáticos. También existen pruebas sólidas que respaldan la opinión de que la EHGNA aumenta el riesgo de diabetes tipo 2, enfermedades cardiovasculares, dislipidemia, hipertensión y enfermedad renal crónica. Debido a la creciente prevalencia de la obesidad, EHGNA se está volviendo una enfermedad más común, con una incidencia del 20% al 30% en los países occidentales y afecta en total a alrededor de 1.800 millones de personas en todo el mundo [20, 21].

Técnicas de tinción histológicas

El principio de la tinción histológica se basa en el tratamiento de secciones de tejido con colorantes en solución, que reaccionaran más o menos específicamente con estructuras tisulares y celulares definidas. Hay varias fases en el proceso de tinción histológica que involucran; corte, fijación, manipulación, tinción e inclusión. En su forma clásica no existe una teoría uniforme de la tinción de tejidos porque los mecanismos de unión de tinte con los diversos componentes celulares son bastante heterogéneos.

Por lo tanto, las tinciones histológicas convencionales deben considerarse en relación con el comportamiento químico y morfológico de las estructuras celulares. En general, las tinciones con tintes naturales como sintéticos pueden deberse a: reacciones químicas, adsorciones o absorciones físicas y procesos fisicoquímicos. Los procesos químicos y físicos se ejecutan en paralelo [1, 12]. Algunas tinciones y métodos histológicos contemporáneos no son los mismos que los utilizados en el pasado: esta evolución ha profundizado en la necesidad de procedimientos de tinción más precisos, menos complejos y eficientes [7].

Colorantes hidrofóbicos

Son una serie de colorantes específicos para lípidos, estos no se unen a elementos de los tejidos por afinidad química, sino porque se disuelven en ellos. Dentro de esta serie se encuentran el Sudán III, el Sudán IV, Rojo Nilo, el Sudán Negro y el rojo aceite O (ORO), que tienen utilidad para técnicas microscópicas citológicas, histológicas y anatomopatológicas [13].

Los colorantes Sudán III y IV son similares entre ellos, ambos son colorantes diazoicos utilizados para la tinción de lípidos, triglicéridos y lipoproteínas sobre secciones de tejido. Sudan III es comúnmente utilizado para la tinción de grasa fecal en el diagnóstico de la esteatorrea, bajo el microscopio muestra una tinción rojo anaranjado. Sudan IV se emplea mayormente en la industria para colorear sustancias no polares como aceites, grasas, ceras, diversos productos de hidrocarburos y emulsiones acrílicas; se puede preparar en propilenglicol, o mayoritariamente en algún disolvente orgánico, bajo el microscopio muestra una tinción marrón rojiza. Sin embargo, estos colorantes han sido gradualmente reemplazados por la tinción de aceite rojo oleoso (ORO) porque la coloración producida por este es mucho más intensa, lo que facilita la visualización.

Sudan Black tiene la apariencia de un polvo marrón oscuro a negro, tiene una tinción de un color azul-negro. Este colorante no es tan específico para lípidos, principalmente se utiliza para la diferenciación de trastornos hematológicos [3].

Tinción rojo oleoso (*Oil Red O*)

La tinción Rojo Oleoso u *Oil Red O* (ORO), es una técnica histológica diseñada para la visualización de células grasas y grasas neutras. Es un colorante diazo de lisocromo (tinte soluble en grasa) fácilmente soluble en benceno, cloroformo, ácido acético, éter, etanol, acetona, isopropanol y otros disolventes orgánicos, pero insoluble en agua. Se utiliza para teñir lípidos neutros, esterios de colesterol y lipoproteínas [2].

El principio es que la solubilidad de ORO en lípidos neutros es mayor que en la solución de tinte, durante la tinción ORO se transfiere de la solución de tinte a la grasa, de modo que las gotitas de lípidos se pueden teñir de color rojo. Debido a su permeabilidad celular esta técnica es utilizada ampliamente para la tinción de lípidos intracelulares y de tejido fresco, ya que la fijación con alcohol elimina los lípidos. Las grasas neutras, principalmente los triglicéridos, se pueden teñir con un tinte rojo anaranjado [2, 16].

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras

Se utilizaron muestras de hígado congelado provenientes de diferentes experimentos con ratas macho de la cepa Wistar, sometidas a una dieta alta en grasa. Los animales fueron proporcionados por la Unidad de Producción y Experimentación Animal-Bioterio (UPEAL-Bioterio) de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco (UAM-X).

Después de los respectivos protocolos experimentales, los hígados fueron extraídos, lavados en solución salina fisiológica (SSF), pesados y congelados en 2-metilbutano como crioprotector enfriado en hielo seco. Las muestras de hígado fueron guardadas a -70 C hasta su uso.

Protocolo de la optimización de la tinción rojo oleoso (*Oil Red O*) en tejido fresco

Para la optimización de la tinción rojo oleoso en tejido hepático de rata con el reactivo *Oil Red O* (Sigma-Aldrich), se hizo una búsqueda de artículos relacionados con la tinción, estos fueron recuperados y modificados de acuerdo a los requerimientos necesarios para obtener una tinción deseada. La tabla 1 muestra los reactivos utilizados en la optimización del protocolo.

Tabla 1. Reactivos utilizados en la tinción rojo oleoso en tejido fresco.

Nombre	Descripción
Ácido salicílico (J.T. Baker)	Para uso en laboratorio
Alcohol isopropílico (Acros)	Grado HPLC, 99.9%
Formaldehído (Sigma)	36.6-38% en H ₂ O
Glicerol (J.T. Baker)	Reactivo ultrapuro. Para uso en laboratorio
Hematoxilina de Harris (Hycel)	Solución colorante para diagnóstico clínico
PBS (solución salina tamponada con fosfato)	Concentración de trabajo 1X, 0.8% de NaCl, 0.2% de KCl, 0.11% de Na ₂ HPO ₄ y 0.02% de KH ₂ PO ₄
<i>Oil Red O</i> (Sigma)	Solución de aceite rojo oleoso con 0.5% de isopropanol

Procedimiento

A partir de los hígados congelados, se obtuvieron cortes histológicos a un grosor de 10 μm utilizando un criostato (Leica) fijando los tejidos en laminillas a una temperatura de -16 a -19°C.

Se utilizó una cámara húmeda (túper con tapa con papel absorbente húmedo) donde se colocó el portaobjetos durante el tiempo de tinción.

El primer intento, se realizó siguiendo el método que describe la hoja técnica del reactivo *Oil Red O* [22], las modificaciones que se aplicaron en el procedimiento solo fue la sustitución de los lavados de agua destilada por PBS. Así mismo, se realizaron modificaciones tomando como referencia algunos artículos que utilizaban el mismo reactivo, con respecto al tiempo y la dilución [14].

Con base en el resultado obtenido y buscando una mejor calidad en la tinción, el reactivo *Oil Red O* se mezcló con propilenglicol [23] y con ácido salicílico, además del uso de alcohol isopropílico en diferentes concentraciones [2].

Se recopilaron las observaciones de cada uno de los procedimientos, eligiendo dos protocolos y utilizando las siguientes soluciones de trabajo:

- **Alcohol isopropílico al 60%:** diluir el reactivo alcohol isopropílico con agua destilada.
- **Formalina al 3.7%:** diluir el formaldehído al 3.4% con PBS.
- **Hematoxilina de Harris al 20%:** diluir el reactivo Hematoxilina de Harris al 20% con agua destilada.
- **Hematoxilina de Harris al 40%:** diluir el reactivo Hematoxilina de Harris al 40% con agua destilada.
- **Medio de montaje acuoso:** Mezclar 9 partes de glicerol y 1 parte de PBS.
- **Rojo oleoso al 60%:** diluir el reactivo *Oil red O* al 60% con agua destilada
- **Rojo oleoso 60% - ácido salicílico 6%:** disolver el ácido salicílico en el reactivo *Oil red O*, una vez disuelto, diluir con agua destilada.

Protocolo 1. Oil red O al 60% en solución acuosa

El primer protocolo consistió en utilizar el reactivo *Oil Red O* diluido en agua, al 60% el cual se llevó a cabo en una cámara húmeda. La tabla 2 muestra el procedimiento.

Tabla 2. Protocolo 1: *Oil red O* al 60%, solución acuosa.

Formalina 3.7%	15 minutos
Agua destilada	Lavado rápido
Dejar secar totalmente	5 minutos aproximadamente
<i>Oil red O</i> al 60%	3-6 minutos, con leves movimientos (dependiendo de cómo avance la coloración)
Agua destilada	5 lavados estáticos de 1 minuto cada uno
Dejar secar totalmente	5 minutos aproximadamente
Hematoxilina de Harris al 20%, acuosa	40 segundos
Agua de la llave	Lavado rápido
Dejar secar totalmente y montar los preparados con el medio de montaje acuoso y cubreobjetos	

NOTA: Es importante dejar que los portaobjetos sequen completamente después de los pasos de tinción individuales para garantizar un resultado de tinción óptimo.

Protocolo 2. *Oil red O* al 60% + ácido salicílico (6%) en solución acuosa

Para una mejor nitidez en la tonalidad de la tinción se realizaron modificaciones al primer protocolo, sin embargo, el protocolo 2 es el protocolo que mejor funcionó usando ácido salicílico. La tabla 3 muestra el procedimiento.

Tabla 3. Protocolo 2: *Oil red O* al 60% + ácido salicílico (6%), solución acuosa.

Formalina 3.7%	15 minutos
Agua destilada	Lavado rápido
Dejar secar totalmente	5 minutos aproximadamente
<i>Oil red O</i> al 60% + ácido salicílico (6%)	3 minutos, con leves movimientos
Alcohol isopropílico al 60%	1 lavado rápido
Agua destilada	8 lavados estáticos de 1 minuto
Dejar secar totalmente	5 minutos aproximadamente
Hematoxilina de Harris al 40%, acuosa	2 minutos
Agua destilada	Lavado rápido
Dejar secar totalmente y montar los preparados con el medio de montaje acuoso y cubreobjetos	

NOTA: Es importante dejar que los portaobjetos sequen completamente después de los pasos de tinción individuales para garantizar un resultado de tinción óptimo.

Microscopía

Para observar cada una de las muestras se utilizó un microscopio (Motic) modelo BA310E equipado con una cámara MotiCamPro modelo 285A. Las imágenes fueron capturadas a diferentes aumentos utilizando los objetivos 10X y 40X.

RESULTADOS

Optimización del protocolo

Las primeras tinciones que se realizaron fueron siguiendo el protocolo utilizando el colorante *Oil Red O* y la hematoxilina sin diluir [14], los lavados *post* tinción fueron hechos con PBS, se observó que el tejido se secó y se quebró. Los núcleos se lograban observar y los lípidos se tiñeron muy poco, eran casi imperceptibles (Figura 4A). Posteriormente, los colorantes y el isopropanol se diluyeron con el propósito de disminuir precipitados y evitar la pérdida de las vesículas de grasa por acción del disolvente [22], con esto se logró que el tejido se tiñera más con el rojo aunque se observaba difuso, haciendo difícil la diferenciación (Figura 4B).

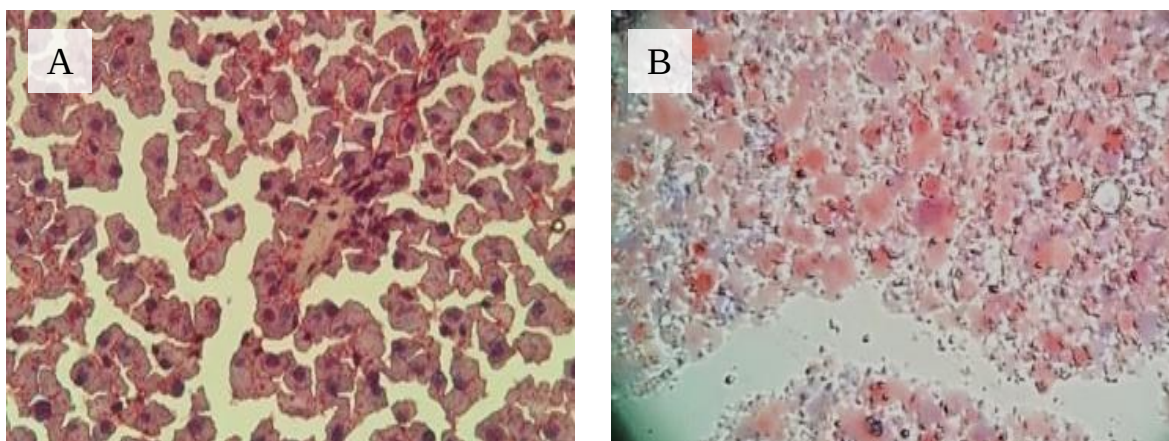


Figura 4. Tinción de rojo oleoso de cortes de hígado de 10 μm de grosor, provenientes de rata Wistar alimentada con dieta alta en grasa y fructosa (HFFD). A) Reactivos sin diluir, aumento 10X. B) reactivos diluidos. Aumento 40X.

Se realizó un nuevo experimento basado en los resultados anteriores, en el que se utilizó el reactivo *Oil Red O* sin diluir, la hematoxilina se diluyó al 40 % y se disminuyó considerablemente el tiempo de exposición de ambos colorantes, buscando que la diferenciación entre núcleos y vesículas lipídicas fuera mejor definida. Se observó que los lípidos parecen más nítidos, pero se presentaron sedimentos los cuales obstruyen la visión. El contraste con hematoxilina es imperceptible (Figura 5).

Procedimiento:

- Alcohol isopropílico al 60% 20 segundos (por gotas)
- Solución de ORO al 60% (10 minutos)
- Alcohol isopropílico al 60%, por gotas (20 s)
- Lavar con agua destilada (4 lavados/1 minutos)
- Hematoxilina al 40% (2 minutos)
- Lavar con agua destilada hasta quitar excedente

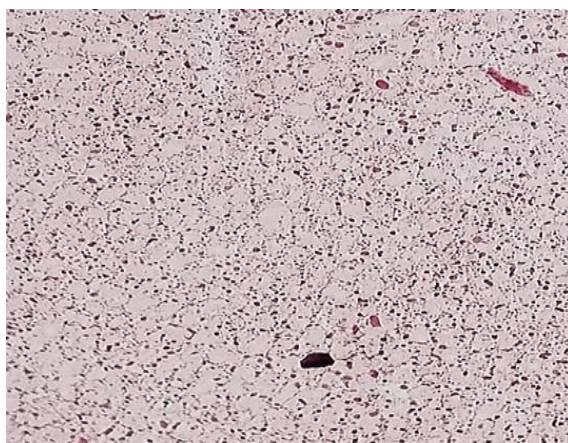


Figura 5. Tinción de rojo oleoso de cortes de hígado de 10 μm de grosor, provenientes de rata Wistar alimentada con dieta alta en grasa y fructosa (HFFD). Reactivo *Oil Red O* sin diluir, la hematoxilina diluida al 40 %. Aumento 5X.

Posteriormente se utilizó propilenglicol mezclándolo con el reactivo *Oil Red O* [23], de igual forma se utilizó para realizar los lavados. Con este protocolo se observó que las vesículas lipídicas son más específicas y nítidas, al igual que el contraste se percibe favorablemente (Figura 6).

Procedimiento:

- Propilenglicol al 100% (2 s)
- Mezcla de ORO con propilenglicol al 85% (5 min)
- Retirar excedente
- Propilenglicol al 85%
- Inmediatamente retirar excedente
- Lavar con agua destilada
- Contraste con hematoxilina al 20% (20 s)
- Lavar con agua de la llave

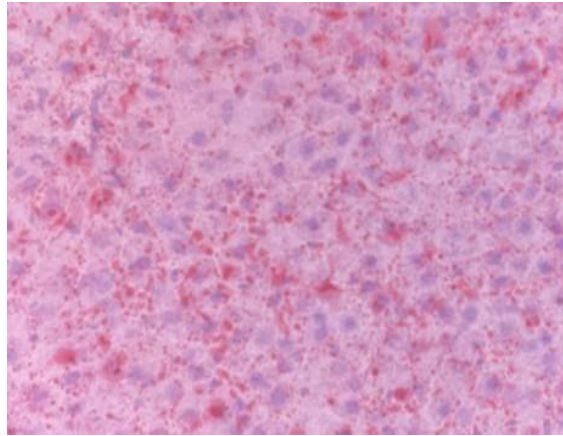


Figura 6. Tinción de rojo oleoso de cortes de hígado de 10 μm de grosor, provenientes de rata Wistar alimentada con dieta alta en grasa y fructosa (HFFD). El reactivo *Oil Red O* se mezcló con propilenglicol al 85%. Aumento 40X.

Con el fin de mejorar la tinción con el reactivo *Oil Red O* y tener un mejor contraste con los núcleos, se empleó ácido salicílico [2] con lo que se obtuvo un fondo de tinción más limpio y los lípidos teñidos con el *Oil Red O* de un rojo brillante. Se realizó una pequeña modificación cambiando el etanol por alcohol isopropílico, se mezcló el reactivo *Oil Red O* con el ácido salicílico y se diluyó, al igual que la hematoxilina (Figura 7A). Se realizó otro experimento en el que se disminuyó la concentración del alcohol isopropílico para los lavados, pero las vacuolas de lípidos disminuyeron la intensidad de su color y existía un considerable sedimento (Figura 7B).

Solución stock: 0.1 g de ácido salicílico +1 ml de Rojo Oleoso
Mezcla reacción: Diluir la solución stock al 60% con agua destilada

Procedimiento A:

- Colocar alcohol isopropílico al 60% (gotas)
- Mezcla reacción (10 minutos) en cámara húmeda
- Lavado con alcohol isopropílico al 60% (gotas)
- Sumergir 10 veces en agua destilada
- Contraste con hematoxilina al 40% (2 minutos)
- Lavar con agua destilada hasta quitar excedente

Procedimiento B:

- Mezcla reacción (3 minutos) en cámara húmeda
- 2 lavados con alcohol isopropílico al 5% (gotas)
- 8 Lavados con agua destilada con movimiento constante
- Contraste con hematoxilina al 40% (2 min)
- Lavar con agua destilada hasta quitar excedente

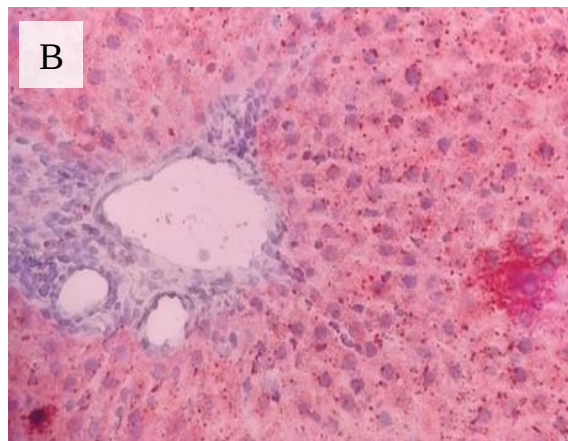
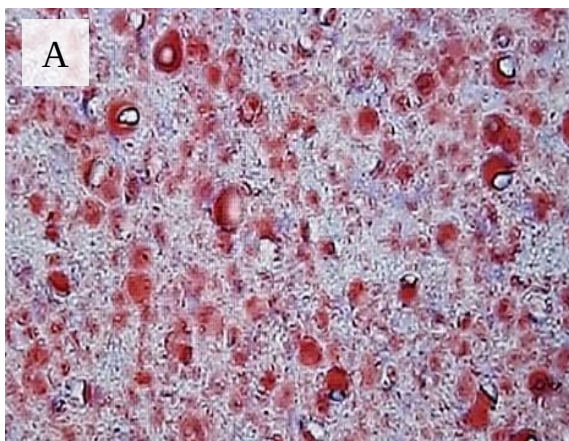


Figura 7. Tinción de rojo oleoso de cortes de hígado de 10 μm de grosor, provenientes de rata Wistar alimentada con dieta alta en grasa y fructosa (HFFD). El reactivo *Oil Red O* se mezcló con ácido salicílico al 6%. A) Un lavado con isopropanol al 60 %. B) 2 lavados con isopropanol al 5%. Aumento 40X.

Por los resultados anteriores, a continuación se muestra el protocolo con el que se obtuvieron los mejores resultados y por lo tanto, se considera el protocolo optimizado:

Protocolo optimizado

Oil red O al 60% + ácido salicílico (6%) en solución acuosa

Solución stock: 0.1 g de ácido salicílico +1 ml de Rojo Oleoso

Mezcla de reacción: Diluir la solución stock al 60% con agua destilada (6 ml stock + 4 mL H₂O).

Procedimiento:

- Colocar alcohol isopropílico al 60% (gotas)
- Mezcla reacción (10 minutos) en cámara húmeda
- Lavado con alcohol isopropílico al 60% (gotas)
- Sumergir 10 veces en agua destilada
- Contraste con hematoxilina al 40% (2 minutos)

Lavar con agua destilada hasta quitar excedente

Análisis de la acumulación de lípidos en hígados de ratas alimentadas con dieta alta en grasa y fructosa (HFFD)

Antes de tener el protocolo optimizado de tinción para la determinación de lípidos en tejido hepático, se analizaron hígados provenientes de un modelo animal, donde se administró dieta alta en grasa y fructosa (HFFD) durante seis semanas a ratas macho de la cepa Wistar. El experimento consistió en 4 grupos experimentales; dieta alta en grasa y fructuosa (HFFD), dieta alta en grasa y fructuosa con administración de bifidobacterias (HFFD+BB), dieta alta en grasa y fructuosa con administración de inulina (HFFD+INU), dieta alta en grasa y fructuosa con administración de bifidobacterias e inulina (HFFD+BB+INU) y 1 grupo control; dieta normal (DN).

Los tejidos hepáticos que se obtuvieron de cada uno de los grupos fueron teñidos con el protocolo *Oil Red O* al 60%, en solución acuosa. En la figura 8 se muestran imágenes de la tinción bajo el microscopio con un aumento de 10x. Se observa que en los grupos

experimentales la tinción varía desde un tono tenue hasta uno más intenso, esto pudo ser ocasionado debido a que se utilizaron diferentes laminillas para lograr representar la diferenciación entre cada uno de los grupos, sin embargo, se cometieron errores en el procesamiento de imagen, lo que conduce a imágenes segmentadas que representan grupos distintos de lo que es la realidad [4].

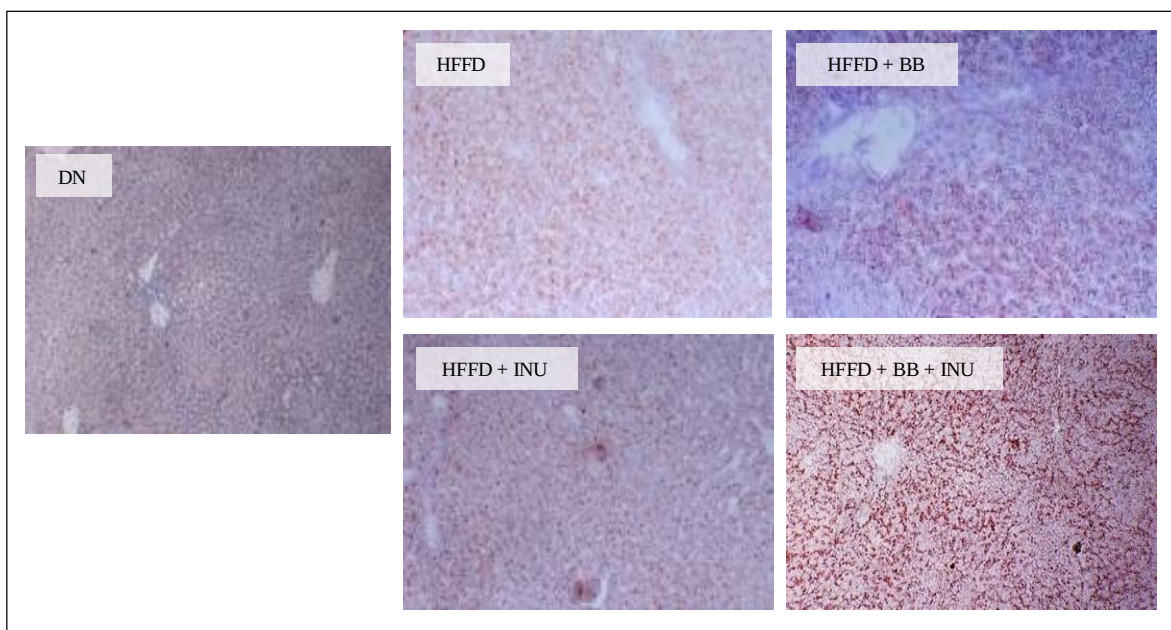


Figura 8. Imágenes representativas de la tinción *Oil Red O* al 60% en solución acuosa, en tejido hepático de rata. Capturadas al objetivo 10x.

La figura 9 muestra las mismas tinciones observadas con un aumento de 40x, con el cual se aprecia que el tejido se quebró, lo que indica que también hubo un exceso de deshidratación del tejido, provocando fragmentación y en el caso de HFFD+INU una tinción excesiva [4].

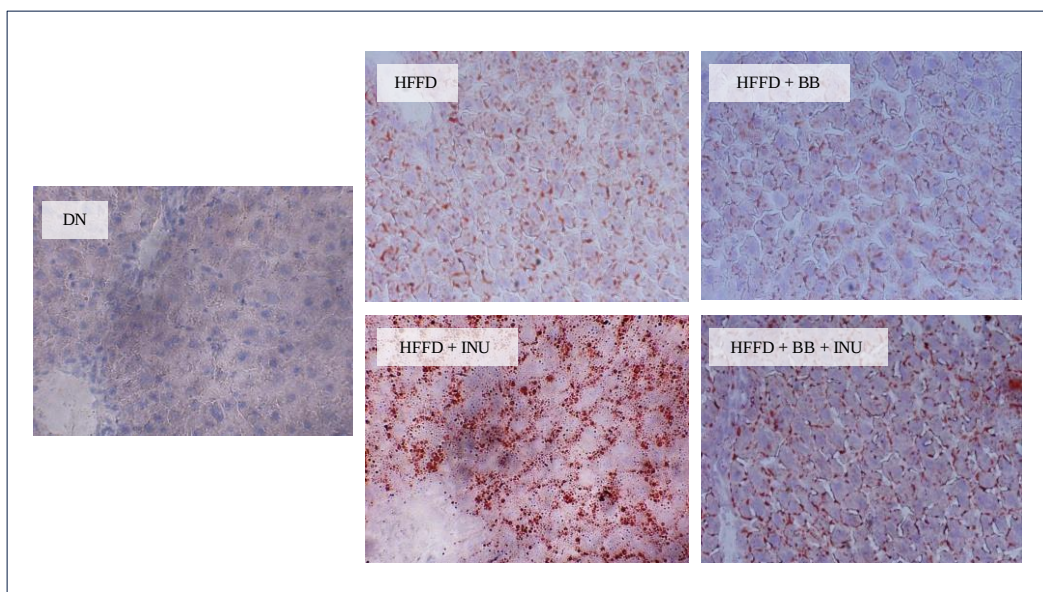


Figura 9. Imágenes representativas de la tinción *Oil Red O* al 60% en solución acuosa, en tejido hepático de rata. Capturadas al objetivo 40x.

Una vez que se optimizó el protocolo de tinción para la determinación de lípidos, se analizaron tejidos provenientes de un experimento “curso-temporal” con el mismo modelo animal de ratas macho Wistar alimentadas con dieta alta en grasa y fructosa (HFFD), en el cual se analizaron los tejidos a las 3, 6, 9 y 12 semanas. En la figura 10 se muestran imágenes de la tinción con el protocolo *Oil red O* al 60% + ácido salicílico (6%), solución acuosa, bajo el microscopio con un aumento de 10x. Se observa que la tinción tiene un color intenso con un fondo limpio, se utilizó una sola laminilla para colocar los tejidos provenientes de los diferentes tiempos (3, 6, 9 y 12 semanas) para obtener un resultado real que dependa únicamente del tejido y no de la tinción. Se logró observar una gran diferencia entre los grupos DN y los grupos HFFD, así como el incremento en la detección de lípidos por la tinción con el rojo oleoso a lo largo de las semanas.

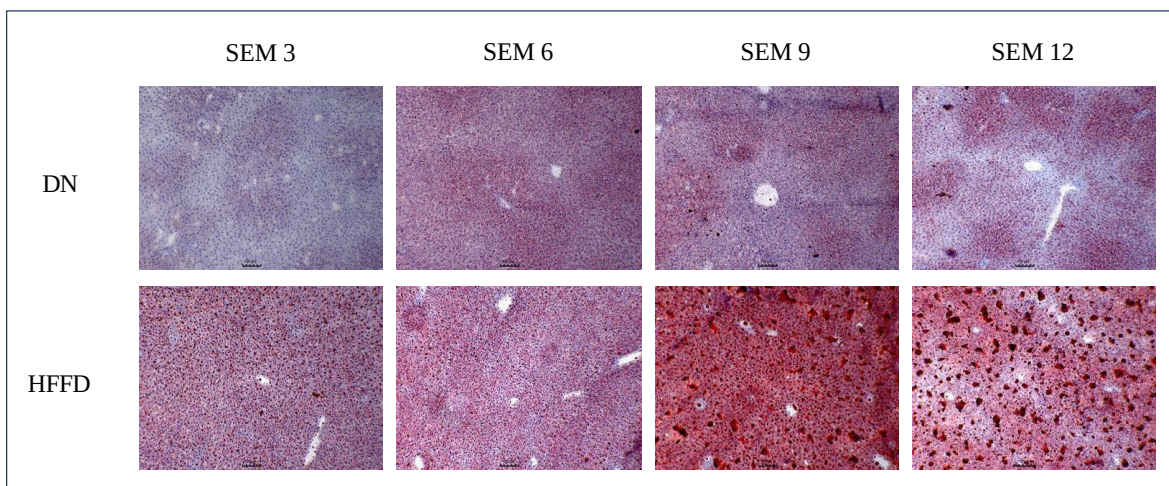


Figura 10. Imágenes representativas de la tinción *Oil red O* al 60% + ácido salicílico (6%), solución acuosa. Capturadas al objetivo 10x. Experimento curso-temporal a 3, 6, 9 y 12 semanas, DN; dieta normal, HFFD; dieta alta en grasa y fructosa.

La figura 11 muestra las mismas tinciones con un aumento de 40x, en comparación el protocolo anterior, los tejidos se observan íntegros, resultando en una tinción limpia y optima en referencia a la diferenciación entre las vacuolas de lípidos y los núcleos del hepatocito.

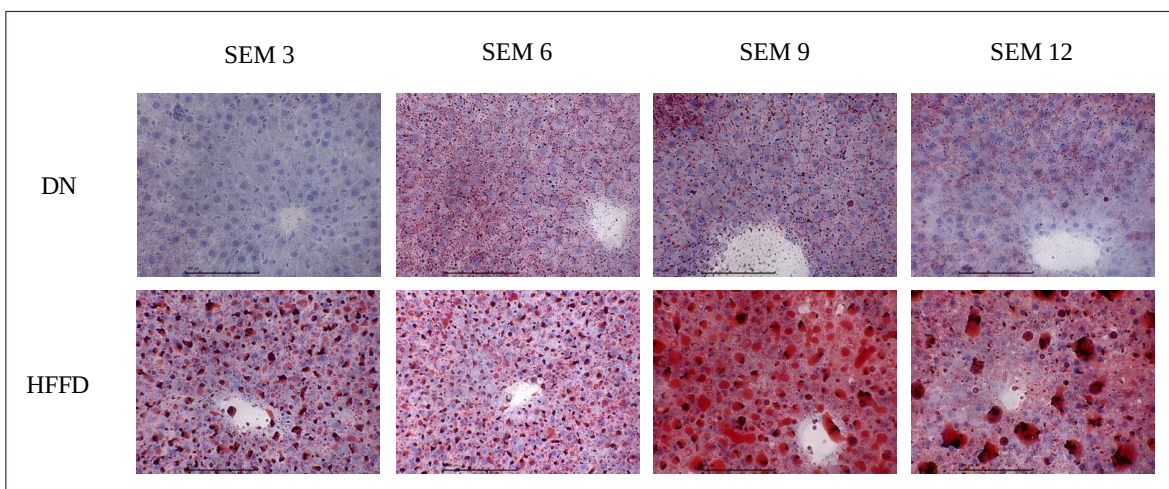


Figura 11. Imágenes representativas de la tinción *Oil red O* al 60% + ácido salicílico (6%), solución acuosa. Capturadas al objetivo 10x. SEM; semana, DN; dieta normal, HFFD; dieta alta en grasa y fructosa.

CONCLUSIÓN

Debido a los modelos experimentales utilizados en el laboratorio de Ecología Microbiana de la UAM-Xochimilco, donde se estudia el metabolismo de lípidos en modelos animales con dietas con alto contenido de grasa y fructosa, se requiere tener una metodología que permita la detección de la acumulación de grasas (principalmente triglicéridos) en el hígado.

Es por ello que se buscó desarrollar un protocolo para la detección de lípidos en tejido hepático utilizando la tinción rojo oleoso. En el presente trabajo, se logró establecer un protocolo optimizado de la tinción rojo oleoso combinado con ácido salicílico, en el que las imágenes recuperadas fueron satisfactorias conforme a la detección de la acumulación de vacuolas de lípidos.

Si bien, los resultados de la tinción fueron óptimos, sería recomendable continuar con la experimentación de la tinción con diferentes marcas o presentaciones del reactivo, con el fin de tener diversas alternativas que se ajusten a las necesidades del modelo animal que se desee analizar.

REFERENCIAS

1. Al-Tae, R, AL-Aameli, M. & Al-Qazwini, Y. (2019). Histological Techniques: A brief Historical Overview. Journal of Global Scientific Research. https://www.researchgate.net/profile/Yarub-Al-Qizwini/publication/338456523_Histological_Techniques_A_brief_Historical_Overview/links/5e15f179299bf10bc39bfa53/Histological-Techniques-A-brief-Historical-Overview.pdf
2. Du, J., Zhao, L., Kang, Q., He, Y. & Bi Y. (2023). An optimized method for Oil Red O staining with the salicylic acid ethanol solution. Adipocyte. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9980477/>
3. Fluoprobes. (s.f). Lysochrome dyes Sudan dyes, Oil red. Fat soluble dyes used for biochemical staining of triglycerides, fatty acids, and lipoproteins. <https://www.interchim.fr/ft/N/N13862.pdf>
4. Galton, A., Fouad, S., Landini, G. & Randell, D. (2017). Errors and Artefacts in Histopathological Imaging. Department of Computer Science, University of Exeter. University of Birmingham, UK. https://ceur-ws.org/Vol-2137/paper_11.pdf
5. Germano, C.W., Mega, P.F., Mattosinho, T.J.A.P., Dias, L.L.C, Gestic, M.A., Utrini, M.P., Chaim, F.D.M., Callejas-Neto, F., Chaim, E.A. & Everton, C. (2023) Microvesicular Steatosis in Individuals with Obesity: a Histological Marker of Non-alcoholic Fatty Liver Disease Severity. OBES SURG 33, 813–82, <https://doi.org/10.1007/s11695-023-06467-9>
6. Hove, M.T, Pater, L., Storm, Weiskirchen, S., Weiskirchen, R., Lammers, T. & Bansal, R. (2020). The hepatic lipidome: From basic science to clinical translation. Advanced Drug Delivery Reviews. Volume 159. Pages 180-197. ISSN 0169-409X. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X20300739>
7. Javaeed, A., Qamar, S., Ali, S., Mustafa, MAT., Nusrat, A. & Ghauri, SK. (2021). Histological Stains in the Past, Present, and Future. Cureus. 4;13(10):e18486. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8566793/>
8. Kanel, G. (2016). Liver: anatomy, microscopic structure, and cell types. Chapter 8. University of Southern California. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118512104.ch8#:~:text=The%20hepatic%20lobules%20are%20composed,stellate%20cells%20and%20collagen%20fibers>
9. Karagianni, P. & Talianidis, I. (2015). Transcription factor networks regulating hepatic fatty acid metabolism. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and

Cell Biology of Lipids. Volume 1851, Issue 1. Pages 2-8. ISSN 1388-1981.
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.05.001>.

10. Krishna, M. (2013). Microscopic anatomy of the liver. *Clinical Liver Disease*. Issue 2. Pages. 4-7.
https://journals.lww.com/cld/fulltext/2013/03001/Microscopic_anatomy_of_the_liver.2.aspx
11. Kubicek-Sutherland, J.Z., Vu, D.M., Mendez, H.M., Jakhar, S. & Mukundan, H. (2017) Detection of Lipid and Amphiphilic Biomarkers for Disease Diagnostics. *Biosensors*. 7(3):25. <https://doi.org/10.3390/bios7030025>
12. Kuhlmann, W. (2020). Histological staining techniques. *Laboratory Diagnostics & Cell Science*. https://www.kuhlmann-biomed.de/wp-content/uploads/2020/11/IET_introduct_04.pdf
13. Megías M, Molist P, Pombal MA. (2019). Atlas de Histología Vegetal y Animal. Técnicas Histológicas. <http://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/1-introduccion.php>
14. MERCK. (2024). Trilineage Differentiation of Multipotent Human Mesenchymal Stem Cells (MSCs) into Osteocytes, Adipocytes and Chondrocytes. <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/primary-cell-culture/mesenchymal-stem-cell-differentiation>
15. Nassir, F., Rector, RS., Hammoud, GM. & Ibdah, JA. (2015) Pathogenesis and Prevention of Hepatic Steatosis. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*.Mar; 11(3):167-75. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4836586/>
16. New comer supply. (2018). Oil Red O Stain, Isopropanol - Technical Memo <https://www.newcomersupply.com/documents/staining/procedures/Oil%20Red%20O%20Isopropanol.1277.pdf>
17. OpenStax. (2013). Anatomy & Physiology. <http://cnx.org/content/col11496>
18. Qureshi, K. & Abrams, G.A. (2007). Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. Jul 14; 13(26):3540-53. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4146793/>
19. Riva, G., Villanova, M., Cima, L., Ghimenton, C., Bronzoni, C., Colombari, R., Crestani, M., Sina, M, Brunelli, S., D'Errico, A., Montin, U., Novelli, L. & Eccher, A. (2018). Oil Red O Is a Useful Tool to Assess Donor Liver Steatosis on Frozen

Sections During Transplantation, Transplantation Proceedings. Volume 50. Issue 10. Pages 3539-3543. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2018.06.013>.

20. Scorletti, E. & Carr, R.M. (2022). A new perspective on NAFLD: Focusing on lipid droplets. *Journal of Hepatology*. Volume 76, Issue 4. Pages 934-945. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168827821021814>
21. Seebacher, F., Zeigerer, A., Kory, N. & Krahmer, N. (2020). Hepatic lipid droplet homeostasis and fatty liver diseases. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Volume 108. Pages 72-81. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.04.011>.
22. Sigma-Aldrich. (2021). Microscopía Oil red O-solución de tinción para la detección de lípidos neutrales en cortes congelados para microscopía. https://www.merckmillipore.com/INTERSHOP/web/WFS/Merck-ES-Site/es_ES/-/EUR/ShowDocument-File?ProductSKU=MDA_CHEM-102419&DocumentId=201312.027.ProNet&DocumentUID=3918899&DocumentType=PI&Language=ES&Country=NF&Origin=PDP
23. University of Utah. (s.f). OIL RED O - PROPYLENE GLYCOL – FAT. <https://webpath.med.utah.edu/HISTHTML/MANUALS/OILRED.PDF>