

## Artículo de investigación

Estudio del daño hepático de una dosis alta de oxitetraciclina en ratones (*Mus musculus*) hembras preñadasStudy of hepatic damage of a high dose of Oxytetracycline in pregnant female mice (*Mus musculus*)López-Ortega AA<sup>1</sup>, Aranguren AJ<sup>1</sup>, Salas Y<sup>1</sup>, Rodríguez K<sup>1</sup>, Acosta L<sup>2</sup>, Delgado N<sup>2</sup>.<sup>1</sup>Unidad Investigación Cs Funcionales Dr. H. Moussatché, Decanato de Ciencias Veterinarias, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", Venezuela. <sup>2</sup> Bioterio Central, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", Venezuela.e-mail: [alopez@ucla.edu.ve](mailto:alopez@ucla.edu.ve)

## RESUMEN

Entre los antibióticos que pueden causar hígado graso (HG) se encuentra la oxitetraciclina (OT). Este estudio tuvo como objetivo determinar el daño hepático de una dosis alta de OT en ratones hembras preñadas y su asociación con el estrés oxidativo (EO). Treinta ratones hembras NMRI distribuidas en tres grupos de diez animales: **Día 0** no preñado, **al Parto**, mantenido hasta el nacimiento, **al Destete**, mantenido hasta el destete. En todos, la mitad fue inyectada i.p. con dosis única de 100 mg/kg de OT, grupo experimental. Los resultados son la media±ES; la significación estadística se obtuvo mediante "t" Student. El HG se evaluó por histología y por la concentración de triglicéridos hepáticos. Como parámetros de EO, se determinó por espectrofotometría la concentración hepática de dienos conjugados (DC) y de MDA. La funcionalidad hepática fue evaluada por la actividad plasmática de las aminotransferasas ALT y AST mediante kits comerciales. Los resultados mostraron que una dosis alta de OT, a las 24 horas, en ratones hembras no preñadas (grupo Día 0) elevó los triglicéridos hepáticos, acompañada de hepatoesteatosis e incremento plasmático de ALT y AST. En ellos se constató EO, evidenciado por alta concentración de DC y MDA. Al parto las hembras preñadas experimentales, no presentaron modificación de los parámetros descritos en el grupo Día 0, poniendo en evidencia que a los 21 días después de la administración de una dosis alta de OT, no se mantuvo el efecto del antibiótico, un resultado similar fue obtenido en las hembras al momento del destete.

**Palabras clave:** oxitetraciclina, daño hepático, preñez.

## ABSTRACT

Among the antibiotics that can cause fatty liver (HG) is oxytetracycline (OT). This study aimed to determine the hepatic damage of a high dose of OT in pregnant female mice and its association with oxidative stress (OE). 30 NMRI female mice distributed in three groups of 10 animals: **Day 0** not pregnant, **to Parturition**, maintained until delivery, **to Weaning**, maintained until weaning. In all, half was injected i.p. with a single dose of 100 mg/kg OT, experimental group. The results are the mean±SE, the statistical significance was obtained by Student's t-test. HG was evaluated by histology and by the concentration of hepatic triglycerides. As OE parameters, the hepatic concentration of conjugated dienes (DC) and MDA was determined by spectrophotometry. Liver function was assessed by the plasma activity of the aminotransferases ALT and AST by commercial kits. The results showed that a high dose of OT, at 24 hours in non-pregnant female mice (Day 0 group) elevated the hepatic triglycerides, accompanied by hepatoesteatosis and increased plasma ALT and AST. OE was found in them, evidenced by high concentration of DC and MDA. At delivery, the experimental pregnant females did not present any modification of the parameters described in the Day 0 group, evidencing that at 21 days after the administration of a high OT dose, the effect of the antibiotic was not maintained, a similar result was obtained in the females at the time of weaning.

**Key words:** Oxytetracycline, hepatic damage, pregnancy.

Recibido: 19-06-2017

Aceptado: 17-09-2017

### INTRODUCCIÓN

Entre los agentes químicos que pueden causar hígado graso (HG) se encuentran las tetraciclinas, entre ellas la oxitetraciclina (OT), frecuentemente utilizada en animales para el tratamiento de retención de placenta [1], metritis [2], mastitis [3]. Estudios in vitro e in vivo han demostrado que derivados de la tetraciclina disminuyen la oxidación de los ácidos grasos y la secreción hepática de TG, con acumulación grasa en el hígado y muerte del ratón [4]. Experimentalmente, Ruiz et al. [5] han establecido que los radicales libres (RL) y en consecuencia la lipoperoxidación (LPO) hepática, están involucrados en la patogénesis del HG inducido por una dosis alta (100 mg/kg) de OT en ratones hembras. Experiencias realizadas en ratas albinas, han evidenciado que el uso de tetraciclina en altas dosis causa una LPO creciente y desempeña así un importante rol en la patogénesis del HG, caracterizado por una esteatosis micro vesicular cuya causa primaria sería una lesión mitocondrial [6].

Así mismo, se ha reportado que en las mujeres embarazadas se puede presentar un episodio de insuficiencia hepática, denominada HG agudo del embarazo (HGAE) que suele presentarse en las últimas semanas de la gestación cuyo curso clínico es: vómitos, acidosis láctica, hipoglicemia y grasa micro vesicular en el citoplasma de los hepatocitos [7]. Diferentes medicamentos aparecen involucrados con el HGAE, entre ellos: ácido valproico, tetraciclinas, lamiodarona, ácido acetilsalicílico y antiinflamatorios como el ibuprofeno [8]; la asociación de la tetraciclina con el HG del embarazo es más común que lo sugerido, de acuerdo a Wenk et al. [9].

Con base a estos antecedentes se planificó este estudio con el objetivo de determinar el daño hepático de una dosis alta de oxitetraciclina en ratones hembras preñadas y su asociación con el estrés oxidativo (EO) hepático, a la vez, que se observará la presencia de posibles anomalías neonatales de la progenie.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Población, Muestra y Manejo

Se utilizó ratones (*Mus musculus*) machos y hembras NMRI adultos con peso promedio de  $27,5 \pm 2,5$  g provenientes del Bioterio Central de la Universidad Centroccidental LA (UCLA). El pesaje de los ratones se realizó en una balanza para animales Ohaus (Triple Beam Balance, Serie 700, Florham Park, NJ, USA). Mediante un muestreo aleatorio simple se seleccionaron al azar treinta ratones adultos de cada sexo, colocados en jaulas individuales de acero inoxidable, bajo ciclos de 12 horas de luz/12 horas de

oscuridad en las condiciones estandarizadas del bioterio de la Unidad de Investigación en Ciencias Funcionales “Dr. Haity Moussatché” (UNIHM) del Decanato de Ciencias Veterinarias (DCV) de la UCLA, con libre acceso al agua y a un alimento comercial para ratones Ratarina® (Protinal, Venezuela). Todo el estudio fue conducido de acuerdo al Código de bioética y bioseguridad de FONACIT-Venezuela, 2009 [10].

Se dispusieron aleatoriamente tres grupos de diez hembras vírgenes cada uno, los cuales fueron denominados de acuerdo al momento en que se les practicó eutanasia: **Grupo Día 0:** a las 24 horas después de inyectar la OT y sin aparearlas, es decir, no preñadas, **Grupo al Parto y Grupo al Destete.** En cada uno de estos grupo, cinco de las hembras fueron inyectadas i.p. con clorhidrato de oxitetraciclina (OT) del Laboratorio Valmorca (Mérida, Venezuela) disuelto en solución fisiológica estéril 0,85 %, en **dosis única** de 100 mg/kg de peso corporal (sub-grupo experimental) mientras que las cinco restantes recibieron por vía i.p. sólo vehículo (sub-grupo control). Después de ser inyectadas las hembras tanto controles como experimentales, fueron dejadas por 24 horas y las hembras de los Grupos al Parto y al Destete fueron apareadas con un macho durante 10 días, enseguida se retiraron los machos y llevados a otro laboratorio.

En los tiempos señalados las hembras controles y experimentales, de cada uno de los 3 grupos, se les extrajo de la vena coccígea una muestra de sangre, la cual se vertió en tubo Eppendorf con anticoagulante (EDTA-Na<sub>4</sub> al 2%) y se separó los plasmas por centrifugación a 800 x G, durante 20 minutos en una microcentrífuga refrigerada Eppendorf modelo 5402 de Brinkman Instr. (Westbury, NY, USA). Obtenida la muestra de sangre y bajo ligera eterización se practicó eutanasia a los animales. Se disecó el hígado, se valoró su aspecto macroscópico y se colocó en buffer Tris-sacarosa 250 mM pH 7,2 a 4 °C, para luego ser pesado en una balanza analítica Sauter (Tipo 414, Ebingen, Alemania). Se homogeneizó un fragmento de hígado en tampón Tris-sacarosa 250 mM pH 7,2 a 4 °C, en un Potter (Bodine Electric Comp., modelo NSI-12, Chicago, ILL, USA).

#### Análisis de las muestras

Histopatología del tejido hepático: Una pequeña muestra de los hígados fué fijada en formol al 10% para su estudio histopatológico en el Laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital Veterinario “Dr. Humberto Ramírez Daza” del DCV-UCLA. Esta muestra fue incluída en parafina y se obtuvo secciones de 3 µm del tejido mediante el uso de un micrótopo Jung AG (Heidelberg, Alemania) y posterior tinción de los cortes con H&E (hematoxilina-eosina) según la técnica convencional.

Los plasmas obtenidos se mantuvieron a 4°C y en ellos se determinó la actividad de la alanina aminotransferasa (ALT) y de la aspartato aminotransferasa (AST) para evaluar la función hepática, utilizando el método colorimétrico según Dufour et al. [11] mediante kit Wiener lab (Rosario, Argentina). Los reactivos generales fueron de la casa Merck (Darmstadt, Alemania). En las diferentes determinaciones, tanto el blanco, estándar y muestras, se hicieron en duplicado. Todas las lecturas espectrofotométricas se realizaron en un Genesys 5 (Rochester, NY, USA).

En el sobrenadante del homogeneizado hepático se determinó la concentración de TG y los parámetros de EO (DC y MDA). La concentración de TG se cuantificó por método enzimático de acuerdo a Patton et al. [12], mediante kit de Qualitest (Caracas, Venezuela). Los resultados quedaron expresados en mg de TG/mg de proteínas, las cuales se cuantificaron mediante el kit Pierce (Rockford, IL, USA) basado en la técnica de Bradford [13].

Para la determinación de la concentración de DC se utilizó el método descrito por Wallin et al. [14] y los resultados se expresaron en moles de dienos conjugados/mg de proteínas. Por su parte el MDA se cuantificó mediante el método de TBARS (sustancias reaccionantes con el ácido 2-tio barbitúrico) de acuerdo a Ohkawa et al. [15] y los resultados se expresaron en nmoles de MDA/mg de proteínas.

### Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos en las unidades indicadas en cada técnica fueron analizados estadísticamente mediante el programa SPSS versión 17.0 para Windows. Los resultados quedaron expresados como el promedio de los valores obtenidos de cada experimento  $\pm$  error estándar de la media ( $\pm$ EEM) de las observaciones de las muestras. Para establecer la significancia estadística de los resultados, fue utilizada la prueba "t" de Student exigiéndose un 95% de certeza ( $P < 0,05$ ).

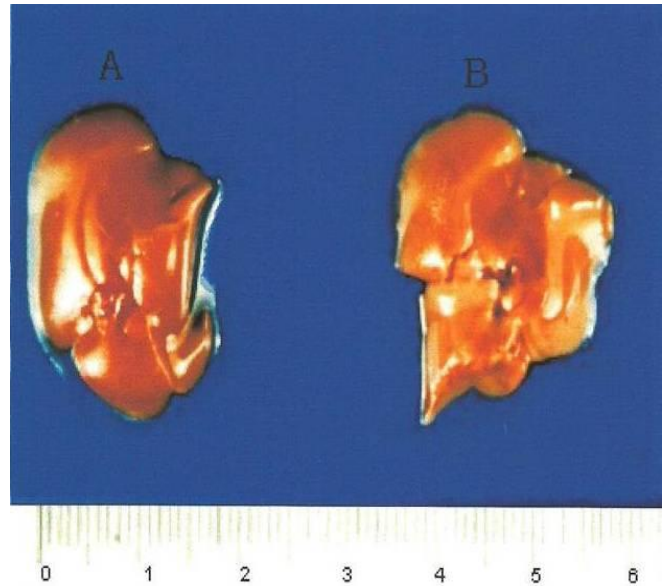
## RESULTADOS

### Efecto del tratamiento con una dosis alta de oxitetraciclina sobre el hígado de ratones hembras preñadas.

Análisis histopatológico del tejido hepático

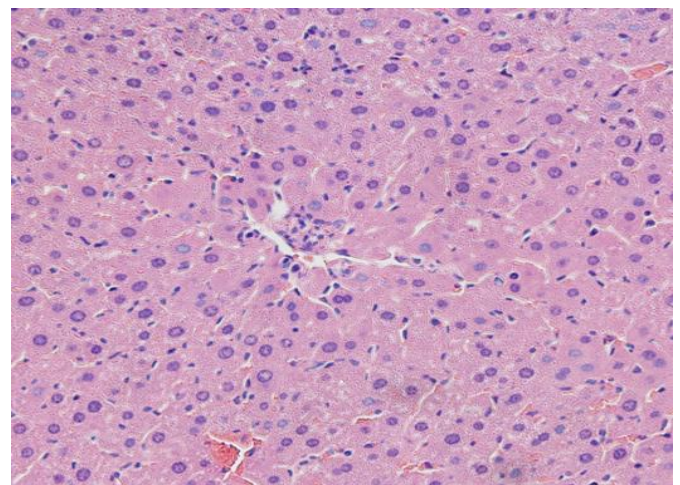
Hepatoesteatosis macroscópica.

**Figura 1.** A Hígado de ratón hembra control del grupo día 0. Mostró color oscuro. B Hígado de ratón hembra con hígado graso inducido por OT (100 mg/kg de peso corporal). Mostró color claro.



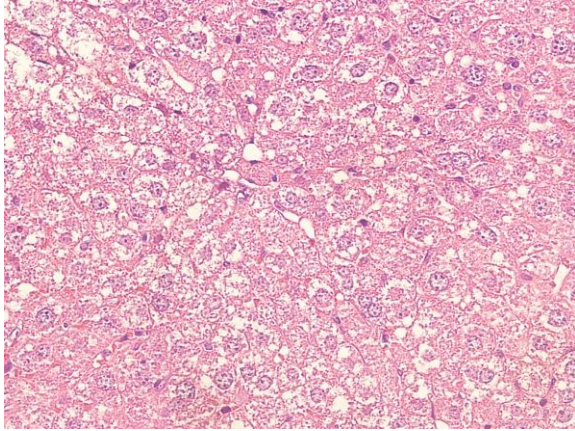
Hepatoesteatosis microscópica.

**Figura 2.** Fotomicrografía de hígado de ratón hembra control del grupo día 0. Se observó un hígado histológicamente normal de aspecto conservado. Tinción H&E 40X.



## Daño hepático preñez dosis alta oxitetraciclina.

**Figura 3.** Fotomicrografía de hígado de ratón hembra del grupo día 0 con hígado graso inducido por dosis alta de oxitetraciclina (100mg/kg de peso corporal). Se observó metamorfosis grasa hepática moderada. Tinción H&E 40X.



### Concentración de triglicéridos en el hígado

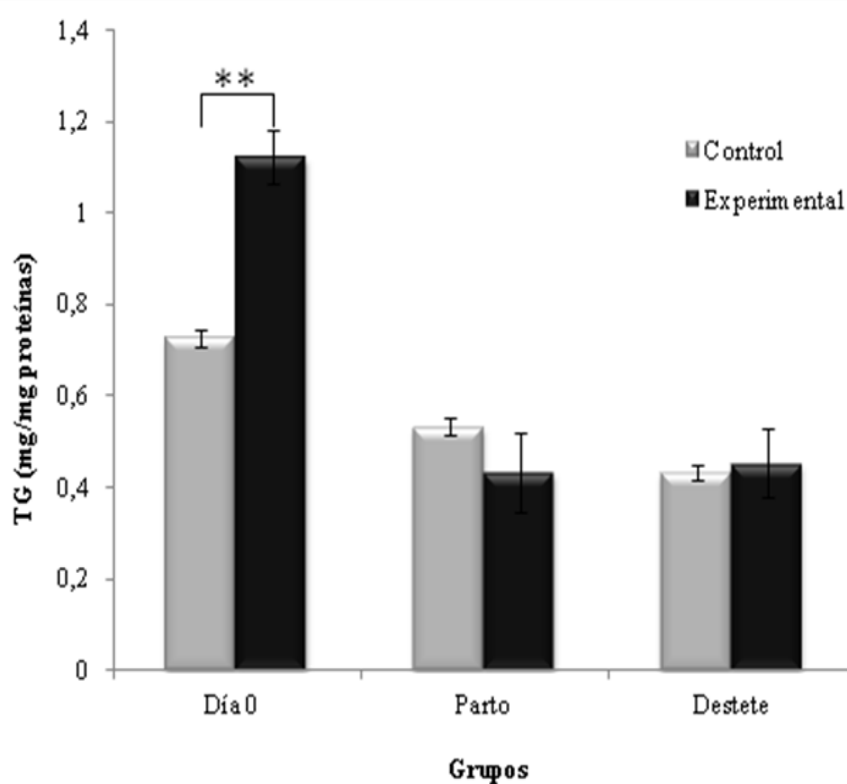
El tratamiento con una dosis alta de oxitetraciclina aumentó la concentración de triglicéridos hepáticos de forma estadísticamente significativa ( $P < 0,01$ ) en el grupo de Día 0 (FIG 4), lo cual corrobora los hallazgos histopatológicos de hepatoesteatosis obtenidos en el presente estudio.

### Determinación de la función hepática

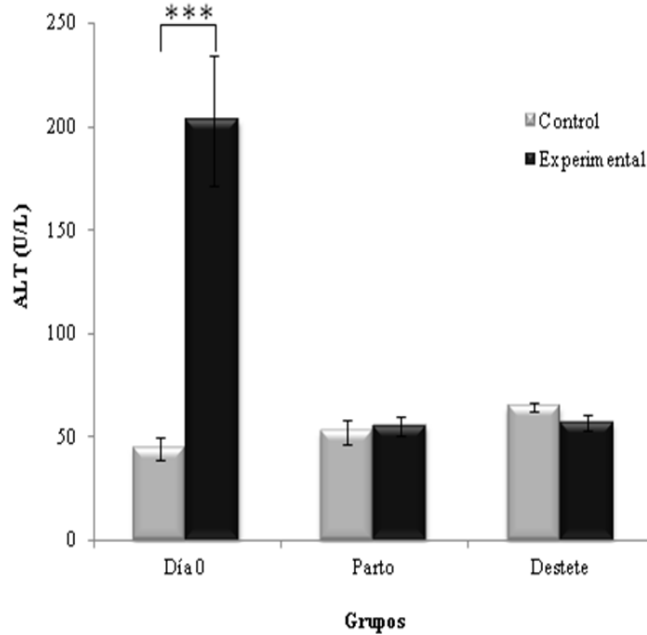
Actividad plasmática de la alanina aminotransferasa (ALT) y de la aspartato amino transferasa (AST)

El tratamiento con una dosis alta de oxitetraciclina aumentó de forma estadísticamente significativa ( $P < 0,001$ ) las actividades plasmáticas de la alanina aminotransferasa (ALT) y de la aspartato aminotransferasa (AST), en el grupo de día 0 (FIG 5 y FIG 6, respectivamente).

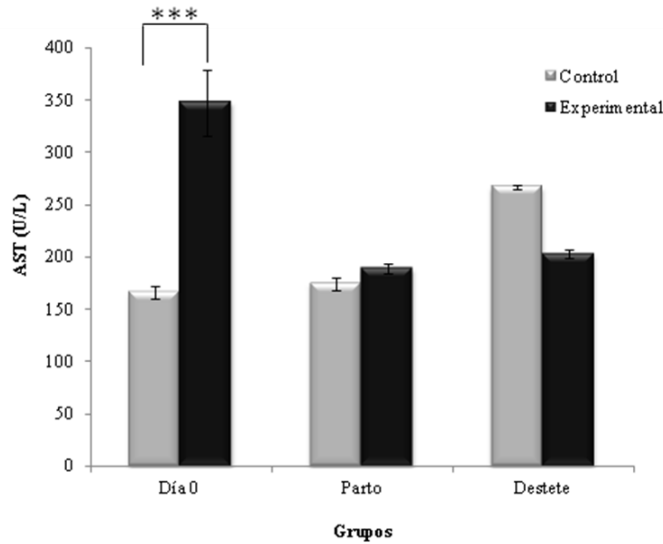
**Figura 4.** Concentración de triglicéridos (TG) hepáticos (mg/mg proteínas) en ratones hembras NMRI no preñadas (día 0) y preñadas (grupos al parto y al destete), tanto controles y como con hígado graso (grupo experimental), inducido por oxitetraciclina (100. mg/kg peso corporal). Los valores son la media  $\pm$  EEM de 5 animales/grupo; \*\*  $P < 0,01$ .



**Figura 5.** Actividad plasmática de la ALT (U/L) en ratones hembras NMRI no preñadas (día 0) y preñadas (grupos al parto y al destete), tanto controles y como con hígado graso (grupo experimental) inducido por oxitetraciclina (100. mg/kg de peso corporal). Los valores son la media  $\pm$  EEM de 5 animales/grupo; \*\*\* P<0,001.



**Figura 6.** Actividad plasmática de la AST (U/L) en ratones hembras NMRI no preñadas (grupo día 0) y preñadas (grupos al parto y al destete), tanto controles y como con hígado graso (grupo experimental), inducido por oxitetraciclina (100. mg/kg de peso corporal). Los valores son la media  $\pm$  EEM de 5 animales/grupo; \*\*\* P<0,001.



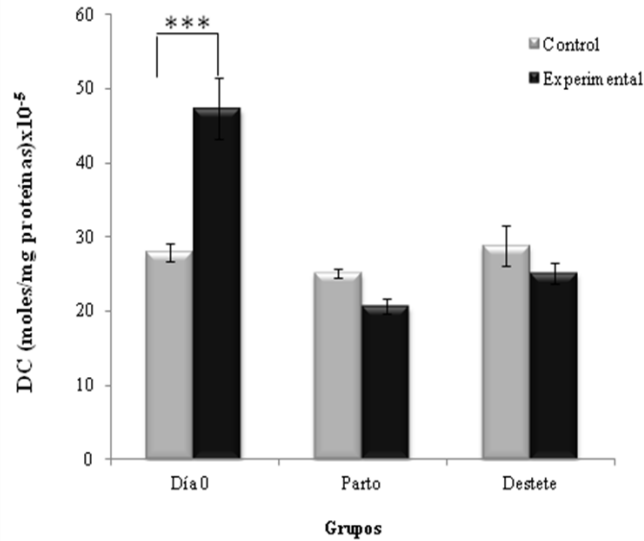
## Daño hepático preñez dosis alta oxitetraciclina.

### Efecto del tratamiento con una dosis alta de oxitetraciclina sobre el estrés oxidativo hepático.

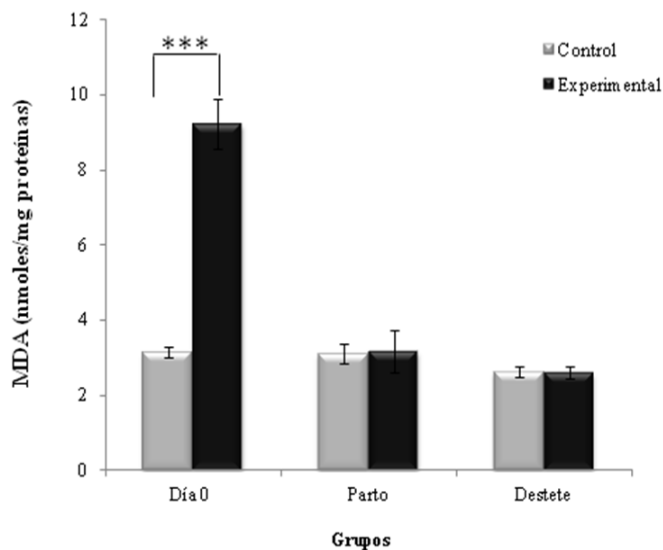
Cuantía de la lipoperoxidación (LPO) hepática: Concentración de dienos conjugados (DC) y de malondialdehído (MDA).

El tratamiento con una dosis alta de oxitetraciclina aumentó de forma estadísticamente significativa ( $P < 0,001$ ) las concentraciones hepáticas de los DC y de MDA en el grupo del día 0 (FIG 7 y FIG 8, respectivamente).

**Figura 7.** Concentración hepática de DC (moles/mg proteínas)  $\times 10^{-5}$  en ratones hembras NMRI no preñadas (día 0) y preñadas (grupos al parto y al destete), tanto controles como con hígado graso (grupo experimental), inducido por oxitetraciclina (100. mg/kg de peso corporal). Los valores son la media  $\pm$  EEM de 5 animales/grupo; \*\*\*  $P < 0,001$ .



**Figura 8.** Concentración hepática de MDA (nmoles/mg proteínas) en ratones hembras NMRI no preñadas (día 0) y preñadas (grupos al parto y al destete), tanto controles como con hígado graso (grupo experimental), inducido por oxitetraciclina (100. mg/kg de peso corporal). Los valores son la media  $\pm$  EEM de 5 animales/grupo; \*\*\*  $P < 0,001$ .



## DISCUSIÓN

El uso de las tetraciclinas constituye la conducta terapéutica de elección para los cuadros infecciosos en los planteles de producción animal [3]. En animales la oxitetraciclina produce hígado graso caracterizado por una esteatosis microvesicular por lesión mitocondrial inducida por RL [6]. En mujeres embarazadas se puede presentar insuficiencia hepática asociada a la administración de oxitetraciclina [7].

Los resultados obtenidos en la presente investigación señalan que los ratones hembras experimentales del grupo día 0, a las 24 horas de haberles administrado una dosis alta de OT, presentaron daño hepático acompañado por elevada concentración de triglicéridos en el hígado y cambios histopatológicos, tipificados por metamorfosis grasa hepática moderada (FIG 3). Estas modificaciones estructurales del tejido hepático son semejantes a las obtenidas en hepatocitos de ratas incubados con tetraciclina [16] y en cultivo primario con tetraciclina de hepatocitos de perro [17].

Además, en el grupo experimental del día 0 hubo una elevación significativa de los niveles plasmáticos de las transaminasas ALT y AST. La enfermedad hepática grasa no alcohólica es quizás la causa más habitual de elevación sérica de las aminotransferasas, en el mundo occidental y también en el asiático [18]. El daño hepático agudo o crónico, se asocia invariablemente con elevación plasmática de la ALT, enzima de ubicación intracelular mayoritariamente citoplasmática y de la AST localizada en dos regiones intracelulares: citoplasma y mitocondrias. La ALT presenta su mayor actividad en el hígado y el incremento de ella se visualiza como específica de daño hepático [19]. Por su parte, la AST se encuentra ampliamente distribuida en músculo esquelético, riñón, cerebro, hígado, corazón y así mismo en glóbulos rojos [20]. La alteración de dichos territorios se ve reflejada en un incremento plasmático de estas enzimas, la cual es proporcional a la cuantía del daño experimentado. La elevación enzimática de origen hepático es inducida por daño oxidativo del hígado, que provoca alteraciones de la permeabilidad de las membranas y finalmente lisis del hepatocito con liberación de la ALT y AST hacia la sangre. Yang y cols. [21] indican para la especie animal utilizada en este estudio, rangos normales de ALT (7 a 227 U/L) y de AST (37 a 329 U/L), cuya gran amplitud indicaría la participación de determinantes genéticas en estas variables.

El aumento de la concentración de radicales libres en las células causa estrés oxidativo (EO) que puede dañar seriamente la integridad de las estructuras celulares, entre ellas las membranas y en consecuencia afectar su funcionamiento. En el presente estudio, los marcadores de estrés oxidativo hepático (DC y MDA) aumentaron en forma altamente significativa en las hembras del grupo día 0 (hembras

no preñadas) inyectadas con una dosis alta de oxitetraciclina, tal como se puede apreciar en la FIG 7 y FIG 8, lo cual indica el establecimiento de un estado de EO hepático por acción de este antibiótico, resultado coincidente con reportes anteriores en ratones hembras tratadas con oxitetraciclina [5]. Como también en ratones bajo una dieta deficiente en metionina y colina, que induce moderada esteatosis microvesicular del hígado, con elevación de la concentración hepática de triglicéridos y de MDA [22].

Es relevante señalar que las hembras experimentales del grupo día 0, a las 24 horas de la administración de una dosis alta de OT, mostraron elevadas concentraciones hepáticas tanto de los dienos conjugados como del malondialdehído (FIGs 7 y 8). Recordemos [23] que los DC se originan al inicio de la degradación lipoperoxidativa (LPO) de los dobles enlaces de los lípidos insaturados (constituyentes de las membranas celulares) causada por los radicales liberados en el estado de EO; por su parte el MDA en conjunto con el 4-hidroxiacetaldehído (4-HDA), son productos finales de la secuencia de reacciones de la LPO. El hecho que en esta investigación, ambos indicadores (DC y MDA) se encuentren similarmente elevados, significa que la secuencia lipoperoxidativa se cumple completa debido a gran cuantía de RL generados por la OT, frente a esto, la respuesta antioxidante hepática deberá ser suficiente y sostenida, para poder equilibrar el EO. En este sentido la célula deberá activar mecanismos de reposición de los compuestos implicados en la defensa antioxidante hepática [24].

Al parto las hembras preñadas experimentales, no presentaron modificación de los parámetros descritos en el grupo de Día 0, poniendo en evidencia que a los 20-22 días después de la administración de una sola dosis alta de OT, no se mantiene el efecto del antibiótico ya descrito para el día 0. Un resultado similar fue obtenido en las hembras al momento del destete. Se deberá asegurar la persistencia del HG con dosis sucesivas de la OT pues una dosis única inicial no lo asegura abriendo la posibilidad que el efecto hepatoesteatósico del antibiótico se revertiría [25].

Cave señalar que en relación al efecto de una dosis alta de OT sobre la progenie de ratones hembras, no se observó anomalías neonatales.

## CONCLUSIONES

Este estudio aporta nuevos conocimientos sobre el efecto de una dosis alta (100 mg/kg de peso corporal) de oxitetraciclina, así, a las 24 horas de haberla inyectado se observó en ratones hembras NMRI no preñadas (grupo día 0), una elevación estadísticamente significativa de la concentración de triglicéridos hepáticos acompañada de hepatoesteatosis e incremento de los niveles plasmáticos de las

transaminasas ALT y AST, indicativo de disfunción hepática. En estos animales también se constató el establecimiento de un estado de estrés oxidativo en el hígado, debido a su elevado grado de lipoperoxidación, evidenciado por alta concentración de dienos conjugados y malondialdehído, utilizados en este estudio como marcadores de daño oxidativo hepático, inducido por la generación de radicales libres liberados en el proceso inflamatorio que acompaña a la hepatoesteatosis.

Al parto las hembras preñadas experimentales, no presentaron modificación de los parámetros descritos en el grupo de Día 0, poniendo en evidencia que a los 20-22 días después de la administración de una dosis alta de OT, no se mantuvo el efecto del antibiótico, ya descrito para el día 0; un resultado similar fue obtenido en las hembras al momento del destete. En cuanto al efecto del tratamiento con una dosis alta de oxitetraciclina sobre la progenie, no hubo anomalías neonatales en cuanto a alteraciones morfológicas corporales, tampoco en el peso promedio de las camadas al nacer, ni luego a los 15-20 o 25 días después de nacidas.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA, Venezuela), por el financiamiento otorgado a este estudio (Proyecto 011-VE-2012).

### BIBLIOGRAFÍA

[1] Patel RV, Parmar SC. Retention of fetal membranes and its clinical perspective in bovines. *Sch J Agric Vet Sci* 2016; 3(2):111-116.

[2] Armengol R, Fraile L. Comparison of two treatment strategies for cows with metritis in high-risk lactating dairy cows. *Theriogenology* 2015; 83(8):1344-1351.

[3]. De Briyne N; Atkinson J; L. Pokludová L; Borriello SP. Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Vet Record* 2014. 175(13): 327-335.

[4] Labbe G, Fromenty B, Fréneaux E, Morzelle V, Lettéron P, Berson A, and Pessayre, D. Effects of various tetra-cycline derivatives on in vitro and in vivo  $\beta$ -oxidation of fatty acids, egress of triglycerides from the liver, accumulation of hepatic triglycerides, and mortality in mice. *Biochem Pharmacol* 1991; 41: 638-641.

[5] Ruiz de Rivero M, Mendoza C, López-Ortega AA. Estrés oxidativo en el hígado graso inducido por oxitetraciclina en ratones hembras. *Gaceta Cs. Vet* 2009; 14(2): 80-86.

[6] Hautekeete M, Degott C, Benhamou J. Microvesicular steatosis of the liver. *Acta Clin Bleg* 1990; 45(5): 311-326.

[7] Duarte J, Díaz S, Lee VE, Castro J, Velásquez V. Hígado graso agudo del embarazo: experiencia de 8 años. *Med Int Méx* 2007; 23(5): 464-470.

[8] Ribalta J. Mecanismos fisiopatológicos de la esteatosis microvesicular (hígado graso agudo del embarazo). *Medwave*, Edición Enero 2003. IV Curso Bienal Internacional de Ciencias en Gastroenterología Esteatohepatitis, Chile. 8-09-2003,

[9] Wenk RE, Gebhardt FC, Bhagavan BS, Lustgarten JA, McCarthy EF. Tetracycline-associated fatty liver of pregnancy, including possible pregnancy risk after chronic dermatologic use of tetracycline. *J Reprod Med* 1981; 26:135-141.

[10]. Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT). Norma para utilización de animales en investigación. En: Código de Bioética y Bioseguridad. Capítulo 3. Tercera edición. Caracas, Venezuela, pp 33-35. 2009.

[11] Dufour RD, Lott, JD, Nolte, FS., Gretch, DR, Koff, RS, Seeff LB. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance Characteristics of Laboratory Tests. *Clin Chem* 2000; 46: 2027-2049.

[12] Patton JG, Dinh DM, Mao SJ. Phospholipid enhances triglyceride quantitation using an enzyme kit methods. *Clin Chim Acta* 1982; 118(1): 125-128.

[13] Bradford MA. A rapid and sensitive method for the quantities of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.

[14] Wallin B, Rosengren B, Shertzer H, Camejo G. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: Its use for evaluation of antioxidants. *Anal Biochem* 1993; 208, 10-15.

[15] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358.

[16] Shen C, Meng Q, Schmelzer E, Bader A. Gel entrapment culture of rat hepatocytes for investigation of tetracycline-induced toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; 238(2): 178-187.

[17] Amacher DE, Martin BA. Tetracycline-induced steatosis in primary canine hepatocyte cultures. *Fundam Appl Toxicol* 1997; 40: 256-263.

[18] Alam S, Noor-E-Alam SM, Chowdhury ZR, Alam M, Kabir J. Nonalcoholic steatohepatitis in nonalcoholic fatty liver disease patients of Bangladesh. *World J Hepatol* 2013; 5(5): 281-287.

[19] Giannini EG, Testa R, Savarino V. Liver enzyme alteration: A guide for clinicians. *Can Med Associat J* 2005; 172(3): 367-379.

[20] Larreal YL, Andrade EL, Cuevas YE, Mendoza AS, Montiel MV, Levy AC, Valero NJ. Pruebas de



funcionalismo hepático en pacientes con infección viral aguda. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2012; 46(1): 38-46.

[21] Yang SH, Chang SY, Tu Y, Lawson GW, Martin O, Bergo MO, Fong LG, Young SG. Severe hepatocellular disease in mice lacking one or both CaaX prenyltransferases. *J Lipid Res* 2012; 53(1): 77-86.

[22] Zhang YKJ, Yeager RL, Tanaka Y, Klaassen CD. Enhanced expression of Nrf2 in mice attenuates the fatty liver produced by a methionine- and choline-deficient diet. *Toxicol App Pharmacol* 2010; 245(3): 326-334.

[23] Halliwell, B. y Gutteridge, J. (2015). Free radicals in biology and medicine. 5ta Ed. Editorial Oxford University Press. pp 140-150.

[24] Sordillo LM, O'Boyle N, Gandy JC, Corl CM, Hamilton E. Shifts in Thioredoxin reductase activity and oxidant status in mononuclear cells obtained from transition dairy cattle. *J Dairy Sci* 2007; 90: 1186-1192.

[25] Lau JKC, Zhang X, Yun J. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. *J Pathol* 2017; 241(1): 36-44.