



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL COTRATAMIENTO
METFORMINA-RIFAMPICINA SOBRE UN MODELO DE
ACUMULACIÓN LIPÍDICA EN CÉLULAS HEPG2**

Tesis que presenta:

Biól. Karla Karina Rojas Flores

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias

En la especialidad de Toxicología

Director de Tesis

Dr. Arnulfo Albores Medina

CDMX

Agosto, 2018

Este trabajo se realizó en el Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav-IPN), bajo la tutoría del Dr. Arnulfo Albores Medina. Durante el desarrollo de esta investigación se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca otorgada con No. 589331

RESUMEN

En situaciones de hacinamiento poblacional es frecuente que los padecimientos se compliquen y concurran patologías como es el caso de la diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) y la tuberculosis (TB), padecimientos que deben ser tratados con fármacos específicos. El primero, con un hipoglicemiante como la metformina (MTF) y el segundo con rifampicina (RIF). El tratamiento de la diabetes *mellitus* (DM) es crónico mientras que aquel de la TB es por tiempo prolongado. Es posible que la administración conjunta de MTF y RIF afecten fisiológicamente a los pacientes, por lo que investigamos cuales son los efectos que los fármacos, de manera independiente y cuando se administran conjuntamente, tienen en el metabolismo de las células hepáticas, específicamente sobre la homeostasis lipídica, empleando un modelo *in vitro*, la línea celular HepG2. Los resultados muestran que la exposición a MTF (0.04, 0.5, 1 y 2 mM) no afecta la viabilidad celular mientras que RIF (10 μ M) si lo hace. Respecto a la acumulación de lípidos, RIF (5 y 10 μ M) indujo una acumulación lipídica estadísticamente significativa, la cual fue medida con el ensayo de rojo oleoso y empleando al ácido palmítico (300 μ M) como control positivo. En contraste, MTF no incrementó los lípidos intracelulares. Cuando las células HepG2 se co-trataron (RIF 10 μ M; MTF 0.05 mM), se observó una disminución significativa en la acumulación lipídica provocada por RIF, misma que fue comprobada mediante el análisis de superficie de interacción sinérgica (SIS), donde los 12 co-tratamientos mostraron un efecto infra-aditivo en la disminución de acumulación lipídica, además de corroborar los efectos individuales que cada fármaco ejerce en la línea celular HepG2. Los resultados presentados sugieren que la MTF previene los efectos de acumulación lipídica causada por RIF. Por otra parte, el tratamiento con RIF únicamente puede constituir un buen procedimiento para desarrollar esteatosis en un modelo *in vitro* con utilidad para estudiar a la enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA). Finalmente se proponen los posibles mecanismos implicados en dicho efecto mediante la construcción de una ruta metabólica empleando KEGG.

ABSTRACT

In overcrowding sanitary conditions deteriorate and frequently pathologies concur as is the case of diabetes *mellitus* type 2 (DM) and tuberculosis (TB). The first, with at metformin treatment (MTF) and the second with rifampicin (RIF). DM treatment is chronic while TB is long-term. It is possible that the coadministration of MTF and RIF may physiologically affect patients, so we investigated the effects these drugs, either independently or coadministered on the metabolism of cells hepatic, specifically on lipid homeostasis, using a HepG2 cell line. Results show that exposure to MTF (0.04, 0.5, 1 and 2 mM), does not affect cell viability while RIF (5 y 10 μ M) does it. Regarding lipids, RIF (10 μ M) induced a statistically significant accumulation, as measured by the oil red test and using palmitic acid (300 μ M) as a positive control. In contrast, MTF did not increase intracellular lipids. However, RIF (10 μ M) and MTF (0.05 mM) significantly decreased lipid accumulation. A synergistic interaction surface analysis (SIS) showed that the 12 cotreatments tested had an infra additive effect on lipids accumulation. Results suggest that MTF prevents lipids from accumulation. On the other hand, treatment with RIF can only be a good procedure to develop steatosis in an *in vitro* model useful for studying nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Finally, the possible mechanisms involved in this effect are proposed through the construction of a metabolic pathway using the KEGG.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por permitirme llegar hasta etapa de mi vida de una manera bastante satisfactoria

A mi tutor académico el **Dr. Arnulfo Albores**, por su valiosa contribución en mi formación académica.

A mis asesores de tesis el **Dr. Mariano Enrique Cebrán García** y el **Dr. Pablo Muriel de la Torre** por sus comentarios y sugerencias para el buen desarrollo de este proyecto.

A el **Dr. Francisco Javier López Muñoz** del Cinvestav- Sede Sur por la aportación del modelo de superficie de interacción sinérgica y por sus valiosos comentarios.

A la **Dra. María Fernanda López** del **Departamento de Zoología del IPN** por sus valiosas aportaciones en KEGG.

A todos los profesores del **Departamento de Toxicología del Cinvestav-IPN**, por su valiosa contribución a mi formación académica.

A la **Dra. Irais Poblete Naredo** por su valioso apoyo en el desarrollo de este proyecto, ya que con su conocimiento y experiencia se lograron montar las técnicas empleadas en este proyecto.

A la **Q.F.B Patricia Vázquez Vázquez** por su valioso apoyo técnico y por la amistad brindada.

A todos los integrantes del **Laboratorio 6 de Toxicología** por su amistad y convivencia **Elvira Gómez, Sandra Reyes, Elena Herrera**, que gracias a ustedes hicieron de mi estancia una experiencia muy gratificante

A todos mis compañeros de generación de Maestría por apoyarme de manera profesional y personal.

DEDICATORIAS

Este trabajo va dedicado especialmente a mi Padre Raúl Rojas, quien ha sido y será uno de los pilares más importantes en mi vida, gracias por tu amor, tus consejos y tu apoyo incondicional, por hacerme una mujer fuerte e independiente capaz de cumplir lo que me proponga y enseñarme el verdadero significado de ser Padre.

A mi madre Verónica Flores y mi hermano César Rojas por su amor y apoyo incondicional a lo largo de mi vida.

A mi preciosa princesa Ellie Cruz Rojas, por ser esa luz que le faltaba a mi vida, gracias hermosa por ser mi fuente de inspiración constante y hacerme cada día una mejor persona, antes pensaba que no se podría ser más feliz en la vida, ahora sé que tú eres el sentido de toda mi vida.

A mi esposo Alfonso Cruz, gracias por apoyarme y cuidar de mi en todo momento, por tu tiempo, por tu amor y tus consejos

A mi familia, por estar siempre a mi lado y apoyarme incondicionalmente, muchas gracias.

A mi queridísimo Club de toby, Roberto Galván, Elim Alfaro, Juan Carlos Rubio y Víctor Cirilo (que en paz descanse), muchas gracias por cuidarme, apoyarme y mostrarme lo valioso que es tener su amistad.

A mi Relax Time, Elvira, Sandra, Anita, Sol, Christian, Lirio, Laura, Andrés por brindarme su valiosa y divertida amistad, apoyarme en todo momento y hacer muy grata mi estancia en el Cinves.

ÍNDICE

RESUMEN.....	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
DEDICATORIAS.....	vi
ÍNDICE	vii
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS.....	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Asociación diabetes <i>mellitus</i> y tuberculosis	1
1.1.1 Aspectos generales sobre la diabetes <i>mellitus</i>	4
1.1.2 Historia natural de la diabetes tipo 2	5
1.1.3 Manejo terapéutico de la diabetes <i>mellitus</i> tipo 2.....	6
1.2 Metformina (MTF).....	7
1.2.1 Mecanismo de acción	7
1.2.2 Farmacocinética	8
1.2.3 Uso terapéutico.....	8
1.2.4 Efectos adversos	9
1.2.5 Contraindicaciones	10
1.3 Aspectos generales sobre la tuberculosis.....	11
1.3.1 Historia natural de la tuberculosis	12
1.3.2 Manejo terapéutico de la tuberculosis	13
1.4 Rifampicina (RIF)	14
1.4.1 Mecanismo de acción	14
1.4.2 Farmacocinética	14

1.4.3 Efectos adversos	15
1.4.5 Contraindicaciones	15
1.5 Hepatotoxicidad inducida por fármacos.....	16
1.5.1 Factores de riesgo	16
1.5.2 Mecanismos de hepatotoxicidad	17
1.5.3 Esteatosis inducida por fármacos o enfermedad de hígado graso.....	18
1.5.3.1 Aspectos generales sobre la enfermedad de hígado graso.....	19
1.5.3.2 Historia natural de la enfermedad de hígado graso no alcohólico	20
1.5.4 Alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos en la enfermedad de hígado graso no alcohólica	20
1.5.4.3 Los receptores activados por proliferación de peroxisomas (PPARS).....	24
1.5.5 Antecedentes de fármacos que causan daño hepático.....	26
1.5.5.1 Rifampicina	26
1.5.5.2 Metformina.....	27
1.6 Justificación.....	28
1.7 Hipótesis	29
1.8 Objetivo general	29
1.8.1 Objetivos particulares	29
1.9 Diseño experimental.....	30
2. MÉTODOS	31
2.1 Reactivos.....	31
2.2 Células HepG2	31
2.2.1 Cultivo celular HepG2	31
2.2.2 Ensayo de viabilidad celular por el método de MTT	31
2.3 Inducción de esteatosis hepática en células HepG2	32
2.4 Tinción con rojo oleoso	33
2.5 Cuantificación de rojo oleoso	34

2.6 Análisis estadístico	35
3. RESULTADOS.....	37
3.1 Evaluación del efecto del cotratamiento RIF-MTF en la viabilidad celular.....	37
3.2 Inducción de esteatosis hepática en células HepG2.....	38
3.2.1 Cuantificación de la inducción de esteatosis hepática.....	39
3.3 Tinción con rojo oleoso en células hepg2.....	40
3.3.1 Evaluación del efecto del tratamiento con MTF.....	40
3.3.2 Cuantificación de lípidos con tratamiento de MTF.....	41
3.3.3 Evaluación del efecto de los cotratamientos con MTF y RIF	42
3.3.4 Cuantificación de lípidos en cotratamiento RIF-MTF.....	43
3.4 Análisis de Superficie de Interacción Sinérgica	44
3.5 Integración de resultados	51
4. DISCUSIÓN	53
4.1 Evaluación del efecto del cotratamiento RIF-MTF sobre la viabilidad celular	53
4.2 Inducción de esteatosis hepática en las Células HepG2.....	55
4.3 Evaluación del efecto del tratamiento con MTF.....	59
4.4 Evaluación del efecto de los cotratamientos con MTF y RIF	61
4.5 Análisis de Superficie de Interacción Sinérgica.....	63
5. CONCLUSIONES.....	65
6. PERSPECTIVAS.....	66
7. REFERENCIAS.....	67
8. APÉNDICES	77
Apéndice I. Protocolo para Fijación celular en paraformaldehido.....	77
Apéndice II. Protocolo de preparación con rojo oleoso.	78
Apéndice III. Análisis de las combinaciones MTF-RIF para SIS.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la metformina.....	7
Figura 2. Mecanismo de acción de la metformina en la gluconeogénesis hepática.....	8
Figura 3. Farmacocinética de la metformina	9
Figura 4. Estructura química de la rifampicina	14
Figura 5. Historia natural de la esteatosis hepática no alcohólica (EHGNA) basada en la hipótesis de los dos “hits”	20
Figura 6. Lipogénesis <i>de novo</i>	23
Figura 7. Estrategia Experimental.....	30
Figura 8.Efecto del cotratamiento RIF-MTF sobre la viabilidad celular.....	37
Figura 9. Imágenes de las células HepG2 teñidas con rojo oleoso.	38
Figura 10. Cuantificación de los triglicéridos por tinción con rojo oleoso en células HepG2.	39
Figura 11. Imágenes de las células HepG2 teñidas con rojo oleoso.	40
Figura 12. Cuantificación de los triglicéridos por el método de rojo oleoso en células HepG2.	41
Figura 13. Imágenes de las células HepG2 co-tratadas teñidas con rojo oleoso.....	42
Figura 14. Cuantificación de triglicéridos por el método de rojo oleoso en células HepG2	43
Figura 15. Efecto de la acumulación lipídica obtenida de RIF y MTF individualmente y en combinación.....	45
Figura 16. El efecto de acumulación lipídica producido por diferentes concentraciones y combinaciones de RIF y MTF.	47
Figura 17. Determinación de la superficie de interacción sinérgica (SIS) del cotratamiento RIF-MTF.....	48
Figura 18. Cotratamiento RIF 10 μ M- MTF 5 mM.....	49
Figura 19. Mecanismo de inducción y disminución de acumulación lipídica propuesto en el cotratamiento RIF-MTF en células HepG2.	51

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales manifestaciones patológicas causas por hepatotoxicidad	17
Tabla 2. Condiciones asociadas con la EHGNA	19
Tabla 3. Manifestaciones hepatotóxicas causadas por rifampicina	26
Tabla 4. Manifestaciones hepatotóxicas causadas por metformina.....	27
Tabla 5. Concentraciones utilizadas durante tratamiento de 48 h.	32
Tabla 6. Concentraciones utilizadas para inducción de esteatosis en la línea HepG2.	33
Tabla 7. Concentraciones utilizadas en tinción con rojo oleoso	34
Tabla 8. Concentraciones utilizadas en cotratamiento para evaluar la acumulación lipídica.	44

LISTA DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS

DM= Diabetes Mellitus

TB= Tuberculosis

MTF= Metformina

RIF=Rifampicina

DM1=Diabetes Mellitus tipo 1

DM2= Diabetes Mellitus tipo 2

TBP= Tuberculosis Pulmonar

C3b= Moléculas del Complemento

IgG= inmunoglobulinas

MBP= Proteínas de Unión a Manosa

SPA= Factor surfactante A

IL-12= Interleucina 12

TNF- α = Factor de Necrosis Tumoral alfa

NK= Células Natural killer

IF- γ = Interferón gamma

TB-MFR= Tuberculosis Multi-fármaco-Resistente

LHIF= Lesión Hepática Inducida por Fármacos

ALT= Alanino Transferasa

FA= Fosfatasa Alcalina

CYP 450= Citocromo 450

EHGNA= Enfermedad de Hígado Graso no Alcohólica

FATP= Proteínas Transportadoras de Ácidos Grasos

FAT/CD36= Translocasa de Ácidos Grasos

FABP= Proteína de Unión a Ácidos Grasos

PPARS= Receptores Activados por Proliferación de Peroxisomas

PPREs = Regiones Promotoras Proliferadoras de Peroxisomas

SREBP1c: Proteína de Unión al Elemento de Esteroles-1c.

TG= Triglicéridos

VLDL= Secreción de Proteína de Muy Baja Densidad

ChREBP= Proteína de Unión al Elemento de Respuesta a Hidratos de Carbono

FAS= Ácido Graso Sintetasa

ACC= Acetil coA Carboxilasa

SCD1= Esteroil CoA Desaturasa 1

MTT= Bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

AP= Ácido Palmítico

F= Fructosa

BSA= Albúmina Sérica Bovina

DMSO= Dimetil sulfóxido

ABC= Área Bajo la Curva

SIS= Superficie de Interacción Sinérgica

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Asociación diabetes *mellitus* y tuberculosis

De acuerdo a datos de la Federación Internacional de Diabetes (FID), se estima que el número de personas con DM en el mundo se ha incrementado de 135 millones en 1995, a 387 millones en la actualidad, y se estima que para el 2035 hayan 592 millones de personas afectadas. La DM2 es el principal problema de salud en México y es de las primeras causas de muerte. La FID reportó que en el año 2014 México ocupó la sexta posición entre los países con el mayor número de personas con DM (8.7 millones), al igual que pronosticó que para el año 2030 México ocupará el quinto lugar con un número estimado de enfermos de 15.7 millones. Los datos que proporciona la encuesta nacional de salud y nutrición 2016 (ENSANUT 2016) demuestran que la prevalencia de DM por diagnóstico previo fue de 9.4%, lo que significa que existen 6.8 millones de mexicanos con la enfermedad.

Por otra parte, la TB constituye una de las principales causas de muerte dentro de las enfermedades transmisibles. Se estima que en el 2013 alrededor de 9.0 millones de personas en el mundo desarrollaron esta enfermedad. En el continente Americano alrededor de 280 000 personas se ven afectadas por todas las formas de tuberculosis cada año (WHO, 2013).

En México, una muestra representativa nacional de 2 716 casos con baciloscopia positiva de tuberculosis indicó que 22% de los casos totales muestreados fueron asociados con DM2. Dada la importancia creciente para la salud pública de la comorbilidad de TB-DM2 y su repercusión costosa sobre la sociedad nace el interés por el desarrollo de este proyecto.

Históricamente, la asociación entre TB-DM ha sido reconocida durante siglos. Obras publicadas desde el siglo XVI describen los signos y síntomas de pacientes diabéticos infectados por *Mycobacterium tuberculosis* (Rajalakshmi *et al.*, 1999). Con la introducción de la insulina en 1920, el descubrimiento de la estreptomina en 1940 y el subsecuente desarrollo de medicamentos para el tratamiento de ambas enfermedades, dicha asociación se creía deshecha (Kapur *et al.*, 2013). No obstante, pese a la inclusión de diversos fármacos y medidas que disminuyeron notablemente las tasas de letalidad para las personas que padecían DM o TB, la incidencia de estas dos patologías, actualmente siguen representando dos grandes problemas de salud pública a nivel mundial situándolas en la categoría de reemergentes (Lewandowski *et al.* 2015). Aunque se desconoce la

direccionalidad de ambas enfermedades, se ha observado que el riesgo de desarrollar tuberculosis activa va de 2.44 a 8.33 veces en pacientes diabéticos, dejando un campo abierto de cuestionamientos sobre el manejo clínico de estas dos enfermedades.

La TB es la enfermedad de origen bacteriano que ocasiona el mayor número de defunciones en diversos países. Se estima que una tercera parte de la población a nivel mundial padece tuberculosis latente, es decir, que dicho sector poblacional es portador de *Mycobacterium tuberculosis* y no desarrolla la enfermedad, situación que se da en más del 90% de los casos, siendo del 5 al 10% de la población la que presenta la enfermedad. La tasa de mortalidad anual por TB es del 25% atribuyéndole 1.5 millones de fallecimientos, lo que la sitúa en la segunda causa de muerte a nivel mundial dentro del marco de enfermedades infecciosas (Lewandowski *et al.* 2015).

Asia, África, América y el Pacífico Occidental corresponde a las regiones con mayor incidencia de TB, siendo Brasil, Camboya, China, Etiopía, Filipinas, India, Myanmar, Uganda y Vietnam los países con alta carga de este padecimiento desde 1990 (Lewandowski *et al.* 2015). Particularmente, la prevalencia de TB se presenta en países en vías de desarrollo o de bajos ingresos (Stevenson *et al.* 2007).

En contraste, la DM afecta a todos los países, en particular a los de alto poder socioeconómico, así como países de ingresos bajos y medios, (Shaw *et al.* 2010) convirtiéndose en una de las principales causas de muerte y discapacidad en el mundo. Existen 387 millones de personas con DM y se prevé que para el año 2030 dicha cifra aumentara a unos 33 millones (ADA 2015). Estudios recientes muestran que cerca del 10 al 30% de pacientes con TB desarrollan DM (Restrepo *et al.*, 2007, Nijland *et al.* 2006, Singla *et al.* 2006, Shetty *et al.*, 2006). La OMS reporta que el 40% de los casos de TB son concurrentes con VIH siendo esta la comorbilidad más frecuente seguida de un 15 % de los casos asociados a DM (Marais *et al.* 2013).

En México, por el contrario, las comorbilidades asociadas con mayor frecuencia a la TB son DM (22%), desnutrición (14 %), VIH (10%) y alcoholismo (6%) (SINAVE, 2014). En el periodo de 2000 a 2013 se reportó un aumento del 208% en las tasas de incidencia de ambas enfermedades. En el año 2010, la Secretaría de Salud en México reconoce la comorbilidad de TB-DM y aplica la Estrategia Nacional para la atención integral de la TB-DM, la cual sigue vigente y se encuentra aunada a diversas directrices internacionales que estableció la OMS y la Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades

Respiratorias. A pesar de existir diversas estrategias de control, el binomio TB-DM prevalece reportándose 4,269 casos nuevos en el año 2014 (Dávila *et al.* 2015).

Se tiene conocimiento que las infecciones empeoran el control de la DM y la TB no es la excepción. Existen estudios que indican que la TB causa intolerancia a la glucosa y que los medicamentos utilizados para tratar la infección causada por *Mycobacterium tuberculosis* pueden empeorar el control glucémico en pacientes con DM (Dooley *et al.*, 2009).

A nivel mundial y en nuestro país, más del 90 % de los casos de DM corresponden a diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) (FID, 2014) y el 80.5 % de los casos de TB corresponden a tuberculosis pulmonar (TBP) (WHO, 2014). El manejo terapéutico para DM2 consiste en una monoterapia a base de MTF, el cual es el fármaco más frecuentemente utilizado para el tratamiento de esta patología en adultos (ADA 2015). Por otra parte, el manejo terapéutico de TB se basa en un esquema de polifarmacia, donde la RIF constituye el medicamento base a lo largo del tratamiento (Sia *et al.*, 2011).

En pacientes diabéticos administrados con isoniazida y durante tratamiento de TB se ha observado una toxicidad superpuesta que se ve reflejada en riesgo de desarrollar neuropatía periférica (Niemi *et al.* 2001). Otros estudios señalan que la RIF puede ocasionar hiperglucemia directa o indirecta a través de las interacciones con fármacos hipoglucemiantes orales (Atkinson *et al.*, 2001). A pesar de lo anterior, la interacción entre MTF y RIF ha sido poco estudiada, pues se supone que la MTF no causa interacciones fármaco- fármaco con otros medicamentos (Scheen *et al.*, 1996).

Existe un solo estudio que evalúa la interacción RIF-MTF en plasma sanguíneo de humanos donde se reporta que la RIF incrementa los parámetros farmacocinéticos de la MTF, encontrándose concentraciones elevadas de este fármaco después de 0.5 y 1 h de tratamiento con RIF, interacción que se ve reflejada en una mejora del efecto hipoglucemiante de la MTF (Cho *et al.* 2011). La importancia clínica de los efectos de RIF en coadministración con MTF debe ser estudiada, puesto que a pesar de tener un resultado favorable en el estudio (Cho *et al.* 2011), se desconoce la magnitud de la interacción y los efectos que en otros sistemas que dependan de la energía, puedan tener.

1.1.1 Aspectos generales sobre la diabetes *mellitus*

La DM es un conjunto de enfermedades de naturaleza crónica y de etiología multifactorial que se caracterizan por una deficiencia en la secreción de insulina, que provoca hiperglucemia, lesiones vasculares y alteraciones en los niveles lipídicos séricos (González *et al.* 2014). La insulina es una hormona secretada por las células β pancreáticas en los islotes de Langerhans en respuesta a niveles elevados de nutrientes en la sangre, controlando funciones energéticas críticas como el metabolismo de la glucosa y los lípidos (Madiraju *et al.* 2014).

La clasificación de este padecimiento incluye 4 formas clínicas: la diabetes tipo 1 (DM1) la cual es definida por una deficiencia absoluta de insulina debido a la destrucción de las células beta pancreáticas, la diabetes tipo 2 (DM2) caracterizada por una disminución progresiva de la producción de insulina o un incremento en la resistencia a la misma, la diabetes gestacional y otros tipos específicos (ADA 2015)

De acuerdo con la FID; China, India, Estados Unidos, Brasil, Rusia y México en orden descendente son los países con mayor número de diabéticos. Se estima que más del 80% de las muertes por diabetes se registran en países de ingresos bajos y medios (FID, 2014)

En México, desde el año 2000 la incidencia de DM es más alta en mujeres (442.23 casos por cada 100 mil mujeres) que en los varones (326.81 casos por cada 100 mil hombres) y las defunciones en el mismo año se representaron en un 62% en mujeres y 61% en hombres (INEGI,2011). En 2010 este padecimiento causó cerca de 83 000 defunciones en el país y se estima que la tasa de mortalidad anual fue del 3%. Sin embargo, estas estimaciones no son exactas puesto que parte de la población desconocen tener esta condición médica (INSP, 2015). Además de su creciente impacto, las complicaciones de este padecimiento figuran entre las principales causas de ceguera, insuficiencia renal y amputación de miembros inferiores de tipo no traumático (Magee *et al.* 2013)

La incidencia de DM1 generalmente se produce antes de los 40 años, siendo mayor en personas de 4 a 14 años. En la actualidad no existen cifras confiables y recientes sobre el número de casos de DM1 en México, en el año 2010 el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) declaró atender a más de 400 mil niños con este padecimiento (FMD. ORG, 2010). Por otra parte, la DM2 representa el 90% de los casos mundiales y se debe en gran medida a un peso corporal excesivo e inactividad física (Kapur *et al.*, 2013).

En nuestro país, la Secretaría de Salud señala que más del 14 % de los mexicanos mayores de 20 años padecen DM2, siendo esta en 2011 la segunda causa de muerte, puesto que del 94% de personas a quienes se les ha diagnosticado la enfermedad y, de las cuales, sólo el 5% lleva con rigor su tratamiento. Se estima que la esperanza de vida de personas con este padecimiento se reduce entre 5 y 10 años. En México, la edad promedio de personas que fallecen por DM en 2010 fue de 66.7 años (Delgado-Sánchez et al. 2015) Los costos económicos asociados al tratamiento de este padecimiento representan una grave carga para el Sector Salud y para los pacientes. Se estima que la atención de DM absorbe el 15% de los recursos totales del Sistema Nacional Mexicano de Salud calculando un costo de 707 dólares por persona al año (PAE, 2013-2018).

1.1.2 Historia natural de la diabetes tipo 2

La DM2 o diabetes no insulino-dependiente se presenta en personas con grados variables de resistencia a la insulina o deficiencia relativa. Su fisiopatología implica órganos y tejidos como el páncreas, el hígado, el músculo esquelético, tejido adiposo, cerebro, tracto gastrointestinal y renal. La disminución en la capacidad de metabolizar la glucosa aunado a la disminución progresiva de las células β pancreáticas conduce a una alteración de la secreción de insulina dando como resultado un estado de hiperglicemia característico de este padecimiento (DeFronzo, 2009).

Si bien, las causas específicas de este padecimiento son desconocidas, existen factores asociados con el riesgo de padecer DM2 como lo son factores genéticos, genes asociados a la insulina y disfunción de las células β pancreáticas (PPARG, KCNJ11, WFS1, HNF1B) (Grant *et al.* 2009) factores fisiológicos, entre ellos la edad, asociando un aumento en la prevalencia de DM2 con el envejecimiento (CDC, 2014), el sobrepeso y la inactividad física, siendo estos últimos los principales factores de incidencia de DM en el mundo.

Algunos estudios han señalado que las dietas ricas en carbohidratos rápidamente absorbibles resultan en niveles elevados de glucosa e insulina en sangre (Hu *et al.*, 2011). El humo de cigarrillo representa riesgo para desarrollar esta enfermedad. En un estudio de meta análisis se señala que el riesgo de desarrollar DM2 es del 45% comparado con personas no fumadoras, esto se relaciona con el número de cigarrillos consumidos (Willi *et al.*, 2016). Por otra parte, el consumo de alcohol de forma moderada se ha asociado con una disminución del riesgo de padecer DM2 (Koppes *et al.* 2005). Sin embargo, el consumo excesivo de alcohol lleva consigo múltiples daños al metabolismo, incluyendo el exceso de ingesta calórica y obesidad, incrementando los niveles de triglicéridos, pancreatitis,

disturbios en el metabolismo de la glucosa y el deterioro de la función hepática (Baliunas *et al.* 2009).

1.1.3 Manejo terapéutico de la diabetes mellitus tipo 2

En personas con alto riesgo de desarrollar DM2, el uso de fármacos como MTF o inhibidores de la α -glucosidasa son utilizados para el control de la glucemia.

Los objetivos establecidos para el tratamiento de un paciente con DM2 son principalmente dos, el primero a corto plazo cuya misión es mejorar la calidad de vida del paciente disminuyendo síntomas como la fatiga, poliuria infecciones y complicaciones metabólicas agudas. El segundo, a largo plazo para evitar complicaciones micro y macroangiopáticas (Scheen *et al.*,2003).

En primera instancia el tratamiento consiste en el desarrollo de un plan que contemple la reducción de peso en sujetos con obesidad, incrementado la actividad física acompañado de terapias nutricionales. Si los niveles de glucemia no disminuyen en 3 meses después de la iniciación de la terapia de dieta y ejercicio, se hace necesario el uso de fármacos (ADA 2015).

Una vez que el paciente necesita terapia farmacológica para el control de la glucemia, el medico recurre a lineamientos establecidos por organismos internacionales con la finalidad de seguir un enfoque orientado al apoyo del paciente, considerando eficacia, costo, efectos adversos y comorbilidades.

La guía establecida por la Asociación Americana de Diabetes establece 3 líneas de tratamiento. La primera línea de tratamiento consiste en una monoterapia oral ajustando progresivamente la dosis hasta conseguir los niveles de glucemia deseados. El fármaco de elección para iniciar esta terapia es una biguanida, la MTF, la cual se utiliza particularmente en pacientes con sobrepeso, tolerancia a este fármaco y si no existe contraindicación. La MTF tiene un bajo costo, su seguridad ha sido demostrada, ejerce un efecto neutral en el peso corporal y se le han asociado beneficios cardiovasculares. En los pacientes con DM2 recientemente diagnosticados y con diversos síntomas de descontrol metabólico, debe considerarse iniciar el tratamiento con insulina, con o sin otros fármacos.

Si el tratamiento con MTF a las dosis máximas toleradas no alcanza o no mantiene el objetivo de control glucémico en un periodo de 3 meses, se recurre a la segunda línea de tratamiento, en la cual se añade un segundo agente oral: sulfonilurea, tiazolidinediona o inhibidor de la dipeptidil peptidasa 4 (inhibidor DPP-4). La tercera línea de tratamiento

consiste en añadir un tercer agente oral: inhibidor de SGLT2, agonista de receptor GLP-1 o insulina (Bailey *et al.*, 2000).

1.2 Metformina

La MTF es un hipoglucemiante oral de primera elección en el tratamiento de DM2. Es una molécula hidrofílica básica cuya difusión pasiva a través de la membrana celular es muy limitada. Se deriva de compuestos biguanidas extraídos de las semillas de *Galega Officinalis* (**Figura 1**) (Fridlyand *et al.*, 2006).

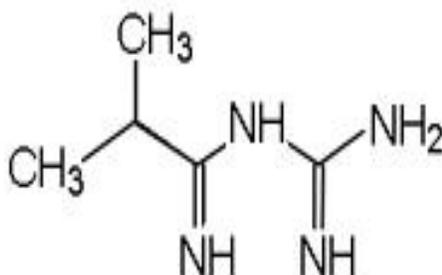


Figura 1. Estructura química de la metformina

1.2.1 Mecanismo de acción

Su mecanismo de acción, a diferencia de las sulfonilureas y otros fármacos, se basa en que la MTF promueven la sensibilidad a la insulina, inhibiendo la absorción gastrointestinal de la glucosa y disminuyendo la gluconeogénesis hepática sin incrementar la secreción de insulina, por lo cual el riesgo de desarrollar hipoglucemia es mínimo (Madiraju *et al.*, 2014).

Uno de los mecanismos de acción propuestos y más aceptados es a través de la activación de la proteincinasa activada por AMP. La AMPK es una proteína que mide el estado de energía celular y sistémica que desempeña un papel de protección de las funciones celulares en condiciones de bajo valor energético. Es activada por el incremento en la proporción AMP-ATP, que cambia cuando hay un desequilibrio en la producción y consumo de ATP. Cuando AMP se une a una de las subunidades de AMPK se genera un cambio conformacional que inhibe la desfosforilación de Thr en el bucle de activación de la subunidad α de esta molécula. Esta AMPK activada cambia a las células de un estado anabólico a uno catabólico, cerrando las vías de consumo de ATP y restaurando el equilibrio energético. Como resultado de esta activación, la AMPK es capaz de regular la síntesis de glucosa, lípidos y proteínas y a su vez estimula la oxidación de ácidos grasos y el consumo de glucosa.

Pese a lo descrito anteriormente, el mecanismo exacto por el cual la MTF ejerce su función aún no se ha esclarecido, se tiene conocimiento que su efecto ocurre por la inhibición en la cadena respiratoria mitocondrial en el complejo I, sin afectar los demás complejos (**Figura 2**) (Martinez *et al.*, 2014).

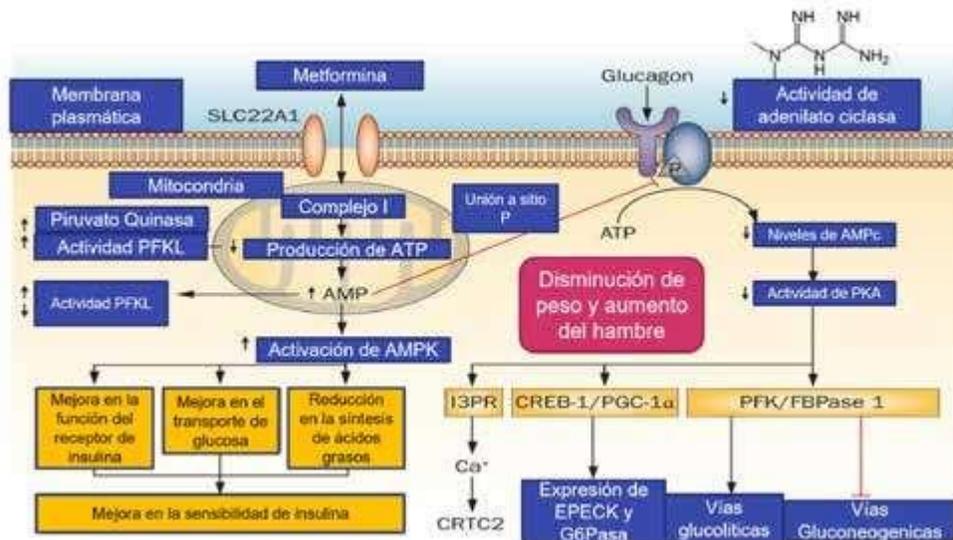


Figura 2. Mecanismo de acción de la metformina en la gluconeogénesis hepática.
Tomada de Valtier *et al.*, 2017

1.2.2 Farmacocinética

La administración de MTF es a través de la vía oral, su absorción se completa a las 6 h de haber sido ingerida; a dosis de 0.5 -1.5 g tiene una biodisponibilidad oral de 50-60% en condiciones de ayuno. La MTF se distribuye rápidamente y no presenta unión a proteínas plasmáticas. Se sugiere que este medicamento no sufre metabolismo hepático debido a que no se han identificado metabolitos conjugados, pero se acumula en tejidos como hígado, riñón, glándulas salivales y tracto gastrointestinal (Mayer *et al.*, 1997).

El tiempo de vida media de este fármaco en plasma es de 1.5 a 4.7 h. El efecto hipoglucemiante se alcanza a las 4 h de haber sido administrada y persiste durante 24 h. Después de la administración oral, la MTF se absorbe en los enterocitos a través del transportador de monoaminas plasmáticas (PMAT) y el transportador orgánico de cationes 3 (OCT 3) en la membrana apical y deja los enterocitos a través de OCT1 en la membrana basolateral. La MTF pasa directamente al hígado a través de la vena porta en concentraciones plasmáticas de 40-70 μM . La absorción de MTF en el hígado se realiza a través del OCT1/3 en la membrana de los hepatocitos y su eliminación se da

fundamentalmente a través de la vía renal, puesto que la tasa de aclaramiento renal oscila entre 552 ml/min a 642 ml/min, hecho que supera el aclaramiento de creatinina, lo que indica la secreción tubular renal del fármaco (**Figura 3**) (Somogy *et al.*, 1987). Su biodisponibilidad tiende a reducirse con la coadministración de acarbosa. No obstante, la interacción con otros medicamentos afecta poco la farmacocinética del fármaco (Scheen *et al.*, 1994). Se cree que la MTF no causa interacciones fármaco-fármaco con otros medicamentos. No obstante, existen estudios que sugieren que la MTF afecta la farmacocinética de fármacos administrados conjuntamente (Cho *et al.* 2011).

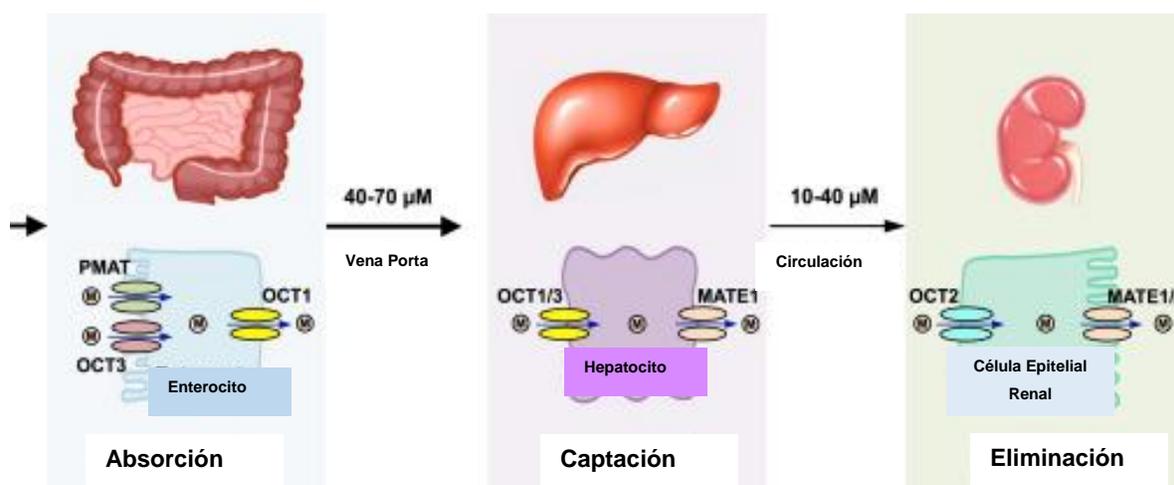


Figura 3. Farmacocinética de la metformina
Tomada y Modificada de *He et al.*,2015

1.2.3 Uso terapéutico

En pacientes con DM2, la monoterapia con MTF va de 0.5-3 g por día, siendo ésta la dosis diaria máxima aprobada por la FDA. Además de que se ha comprobado que su uso está relacionado con la reducción de complicaciones macrovasculares de la enfermedad, reducción de peso corporal (Golay *et al.*, 2008), reducción de los niveles séricos de colesterol, lipoproteína de baja densidad (LDL) y triglicéridos (TG) (Gómez *et al.*, 2013).

1.2.4 Efectos adversos

La acidosis láctica es una de las reacciones adversas poco frecuentes y ocurre cuando el medicamento está contraindicado. Por otro lado, los efectos adversos más comunes corresponden a las alteraciones gastrointestinales (anorexia, náuseas, vomito, espasmos abdominales y disentería) que se observan en un 20% de los pacientes. Estas complicaciones son dosis dependientes y suelen ser transitorias.

1.2.5 Contraindicaciones

Su uso se restringe en personas con condiciones de insuficiencia renal, insuficiencia cardiaca, insuficiencia hepática, alcoholismo crónico, embarazo, lactancia, infecciones graves, desnutrición severa, cetoacidosis, hipersensibilidad al fármaco, diabetes gestacional, DM1 y en pacientes politraumatizados.

1.3 Aspectos generales sobre la tuberculosis

La TB es una enfermedad crónica, sistémica causada por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. canettii*), que afecta principalmente al sistema respiratorio (Daniel 2006). Descubierta en 1882 por Robert Koch, la TB es considerada como una de las enfermedades infecciosas más antiguas de la humanidad. La tuberculosis pulmonar (TBP) es la forma clínica que con mayor frecuencia se presenta en el ser humano (Gradmann *et al.*, 2006).

El principal agente causal de TB en el humano es *Mycobacterium tuberculosis*, se trata de un bacilo aerobio inmóvil, de crecimiento lento (15-20 h) que no forma esporas. Su envoltura celular es poco usual, no produce cápsula de polisacáridos, presenta una membrana citoplasmática cubierta por una extensa capa de peptidoglicanos unidos a arabinogalactanos que se encuentran esterificados con ácidos micólicos presentes en la pared celular. La pared celular posee un elevado contenido de lípidos de alto peso molecular, constituida por tres capas de ácidos micólicos, cera "D", glucoproteínas, trehalosa, 6,6 dimicolato sulfátidos y micósidos. Ningún componente por si solo es considerado como factor de patogenicidad, no obstante, la trehalosa 6,6-dimicolato se relaciona con las cepas más virulentas. Los ácidos micólicos son ácidos grasos de cadena larga que se encuentran esterificados con los polisacáridos de la pared están relacionados con ácido resistencia. Cabe mencionar que la pared celular contiene lípidos libres (ácidos micocerósicos, fosfolípidos y ácidos grasos de cadena corta), polipéptidos y polisacáridos (Knechel *et al.*, 2009).

1.3.1 Historia natural de la tuberculosis

La infección por *Mycobacterium tuberculosis* ocurre por inhalación del microorganismo en aerosoles de pacientes bacilíferos con lesiones pulmonares abiertas. En 1948, Wallgren describe un patrón general de la progresión de la patología en cuatro etapas. La primera etapa (3-8 semanas) después de que el agente bacilar se implanta en los alveolos, las bacterias se difunden por la linfa a los ganglios linfáticos regionales en el pulmón, formando el complejo de Ghon, dado que el bacilo tuberculoso no produce toxinas, el organismo tarda en iniciar la respuesta inmune y se multiplica libremente. En la segunda etapa (3 meses), las bacterias se difunden hasta los ganglios hiliares y la corriente sanguínea pudiendo llegar a diferentes órganos. La tercera etapa consta de pleuresías (3 a 7 meses) acompañada de un dolor severo en el pecho y en esta etapa el paciente puede tardar 2 años. La última etapa o resolución del complejo primario donde la enfermedad no progresa puede tardar hasta 3 años. En esta etapa el desarrollo de lesiones extrapulmonares es lento, presentando dolor crónico en algunos pacientes (Smith *et al.*, 2003).

Mycobacterium tuberculosis al ser introducida en el hospedero es opsonizada por moléculas del complemento (C3b), inmunoglobulinas (IgG), proteínas de unión a manosa (MBP) y el factor surfactante A (SPA), lo que permite a la bacteria ingresar al macrófago de forma eficiente. Si bien no se conoce la patogenia por completo, se tiene conocimiento que su principal mecanismo de infección es impedir la fusión del fagosoma con los lisosomas. Una vez que el bacilo inicia su infección en los macrófagos alveolares, produce lisis celular e infección de nuevas células monocíticas. A nivel celular, la micobacteria se sitúa en los fagosomas de los macrófagos para evitar la fusión con los lisosomas que contienen enzimas proteolíticas. Los macrófagos secretan interleucina 12 (IL-12) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) que aumentan la inflamación localizada al reclutar linfocitos T, células natural *killer* (NK), diferenciación de linfocitos TH1 aunado a la secreción de interferón gamma (IF- γ), que activa a los macrófagos infectados y con ello aumenta la fusión de fagosomas, lisosomas y la destrucción intracelular. El TNF- α estimula la producción de óxido nítrico y de intermediarios reactivos del nitrógeno que potencia la destrucción intracelular. Cuando la concentración bacteriana es alta, la respuesta inmune celular da lugar a la necrosis tisular (Cooper *et al.*, 2009).

Diversos factores del hospedero están implicados en el proceso como lo son la activación local de la cascada de complemento, la isquemia y la exposición a enzimas hidrolíticas generadas por los macrófagos (O'Garra *et al.*, 2013).

1.3.2 Manejo terapéutico de la tuberculosis

En pacientes con TB activa, el tratamiento incluye diferentes esquemas que se maneja de diversas formas según lo prescrito por el personal médico. El tratamiento primario acortado con fármacos de primera línea, el retratamiento estandarizado con fármacos de segunda línea para tuberculosis multi-fármaco-resistente (TB-MFR) y el retratamiento individualizado con fármacos de segunda línea para TB-MFR. Según la OMS y la NOM-006-SSA2-2013, los casos nuevos de TB se deben manejar bajo el tratamiento primario acortado que debe ser aplicado durante 25 semanas hasta completar 105 dosis, el esquema se divide en 2 fases; una fase intensiva (60 dosis) y una fase de sostén (45 dosis). En caso de abandono, recaída o infección se utiliza un retratamiento polifarmacéutico primario por 8 meses. Si el tratamiento primario y el retratamiento primario no son exitosos, se recomienda una evaluación por el Comité Estatal de Farmacorresistencia (COEFAR) para determinar un tratamiento estandarizado acorde a la situación que generalmente tiene una duración de 24 meses, en caso de fracaso en el retratamiento estandarizado se emplea un retratamiento individualizado. Los fármacos de primera línea son: isoniacida, rifampicina, etambutol, estreptomina y pirazinamida, mientras que los fármacos de segunda línea incluyen la estreptomina aminoglucósidos, kanamicina y amikacina.

Una vez iniciado el tratamiento, el paciente tiene que ser sometido a evaluaciones de seguimiento, las cuales consisten en evaluaciones clínicas por lo menos una vez al mes, con la finalidad de evaluar la adherencia y los efectos adversos de los medicamentos tuberculosos.

En los pacientes con tratamiento para TBP se deben obtener muestras de esputo y evaluación con microscopia al menos una vez al mes hasta que se obtengan 2 muestras negativas de forma consecutiva (Sia *et al.*, 2011).

1.4 Rifampicina

La RIF es un fármaco de primera línea, el cual se activa contra bacilos de *Mycobacterium tuberculosis* en fase de crecimiento y en fase estacionaria con actividad metabólicamente baja lo que la hace esterilizante *in vivo* y acorta el tratamiento de TB de 12-19 meses a solo 9 meses.

1.4.1 Mecanismo de acción

La RIF interfiere con la síntesis de ARN al unirse con la subunidad β de la ARN polimerasa e interfiere con la síntesis de ácido nucleico en el proceso de replicación bacteriana. La resistencia a RIF en *Mycobacterium tuberculosis* involucra mutaciones en el gen *rpoB* que codifica a la subunidad β de la ARN polimerasa (Goldstein *et al.*, 2014).

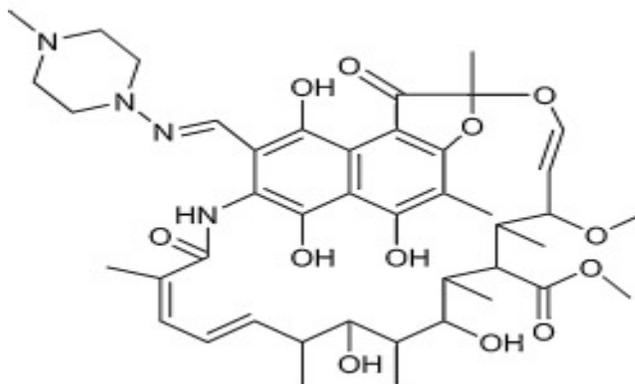


Figura 4. Estructura química de la rifampicina

1.4.2 Farmacocinética

Después de la administración oral en condiciones de ayuno, la absorción de RIF es rápida y completa. Después de 2 h de la administración, RIF alcanza una concentración sérica máxima a una sola dosis de 600 mg. El tiempo de vida media de RIF (600 mg) es de 2.5 h. Este fármaco se distribuye rápidamente en diversos órganos y tejidos, posee la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica solo si existe inflamación en las meninges y la barrera placentaria. Aproximadamente el 80% de la RIF que se transporta por torrente sanguíneo se une a proteínas plasmáticas, en particular a la albumina.

La RIF induce su propio metabolismo en el hígado debido a que induce a CYP 450 principalmente a las isoformas *CYP 3A4*, *CYP 2C9*, *CYP2E1*, *CYP 2C19* (Kanebratt *et al* 2008). Al ser el hígado el principal órgano metabolizador, en los hepatocitos es probable que el fármaco se someta a un proceso de desacetilación generando su principal metabolito 25-O-deacetylirifampicina que es microbiológicamente activo y que al igual que la RIF está sometido a circulación enterohepática. La eliminación del fármaco es por medio de bilis y heces (65%), el resto es excretado en forma de orina (Donald *et al.* 2011).

1.4.3 Efectos adversos

En tratamientos con dosificación diaria o intermitente, se pueden observar reacciones cutáneas leves, anorexia, náuseas, urticaria, somnolencia, fiebre, diarrea, cefalea, visión borrosa, pérdida de apetito y vomito.

Otras reacciones adversas que se manifiestan con los regímenes intermitentes con dosis altas incluyen leucopenia, hemólisis con anemia, jadeos, shock, e insuficiencia renal. Los efectos renales, incluyendo nefritis intersticial, glomerulonefritis y síndrome nefrótico son consideradas reacciones de hipersensibilización (Niemi *et al.*, 2001).

1.4.5 Contraindicaciones

La RIF está contraindicada en pacientes con hipersensibilidad al fármaco, con hepatopatía activa y en personas con consumo crónico de alcohol ya que su uso puede aumentar el riesgo de inducir hepatitis (Chen *et al.*, 2006).

1.5 Hepatotoxicidad inducida por fármacos

El daño hepático relacionado con medicamentos constituye un grave problema de salud pública con amplias implicaciones para los pacientes, los proveedores de atención médica, la industria farmacéutica y las agencias que se encargan de la regulación de medicamentos (Ghabril *et al.*, 2011).

Se considera como reacción adversa, hepática o hepatotóxica a toda lesión o daño hepático causado por la exposición a un medicamento u otros agentes no farmacológicos, a las dosis empleadas para el tratamiento profiláctico o terapéutico. La lesión hepática inducida por fármacos (LHIF) ya sea la relacionada con la dosis o la de idiosincrasia, es la causa más común de la retirada de fármacos en el mercado y se define como el aumento de más de tres veces el límite superior normal de alanino transferasa (ALT), más de dos veces el límite superior normal de fosfatasa alcalina (FA) o una bilirrubina total aumentada más de dos veces el límite superior normal asociado a cualquier elevación en la alanino aminotransferasa o fosfatasa alcalina (Navarro *et al.*, 2006).

El hígado juega un papel central en el metabolismo y en la eliminación de medicamentos y por lo tanto, es susceptible a LHIF. Aunque se estima que su incidencia varía entre 1 en 10 000 o 1 en 100 000 pacientes, la LHIF puede requerir un trasplante ortotópico de hígado o incluso llevar a la muerte del paciente (Massart *et al.*, 2017).

1.5.1 Factores de riesgo

La susceptibilidad individual al daño hepático farmacológico depende de factores tanto genéticos como adquiridos. Dichos factores actuarán mediante la inducción o inhibición del sistema citocromo 450 (CYP 450), o bien, mediante la interferencia con los sistemas enzimáticos detoxificadores. Los factores de riesgo comúnmente relacionados con las reacciones adversas hepáticas son los factores genéticos, la edad, el sexo, los factores metabólicos y hormonales, el consumo de alcohol, el uso concomitante de otros medicamentos y la presencia de determinadas enfermedades subyacentes (Björnsson *et al.*, 2016).

1.5.2 Mecanismos de hepatotoxicidad

A nivel global la lesión hepática causada por fármacos es muy frecuente y existen una gran variedad de fármacos que son considerados como xenobióticos hepatotóxicos que originan lesión hepática en distintas formas: esteatosis, colestasis, fibrosis, cirrosis, carcinoma hepatocelular y alteraciones circulatorias intrahepáticas. Los mecanismos por los cuales llevan a cabo dicho daño son los relacionados con disfunción mitocondrial, inhibición o alteración en la oxidación β de los ácidos grasos, alteración en los transportadores biliares, lo que genera apoptosis, necrosis, autofagia y con ello muerte celular (Pessayre *et al.*, 2012).

Las principales manifestaciones clínico-patológicas de hepatotoxicidad asociadas a DILI se muestran en la siguiente tabla (**Tabla 1**) (Kass *et al.*, 2007; Labbe *et al.*, 2008; Amacher *et al.*, 2002).

Tabla 1. Principales manifestaciones patológicas causas por hepatotoxicidad

Afección	Descripción
Hepatitis aguda	Inflamación parénquimal, necrosis y células de Kupffer en los sinusoides.
Hepatitis crónica	Fibrosis
Hepatitis fulminante	Necrosis e inflamación
Hepatitis colestásica	Inflamación y daño hepático
Colestasis	Tapones biliares en la zona 3
Hepatitis granulomatosa	Granulomas en tractos portales o parénquima
Esteatosis macrovesicular	Gotas de lípidos en el citoplasma del hepatocito
Esteatosis microvesicular	Diminutas gotas de lípidos en el citoplasma del hepatocito
Esteatohepatitis	Esteatosis, inflamación lobular, hepatocitos englobados y fibrosis pericelular.

1.5.3 Esteatosis inducida por fármacos o enfermedad de hígado graso no alcohólica

La enfermedad de hígado graso no alcohólica (EHGNA) es una característica histológica común de varias enfermedades hepáticas y su incidencia se encuentra en aumento debido a la rápida propagación de DM y obesidad en el mundo entero (Klener *et al.*, 2014).

Numerosos fármacos han sido asociados con esta condición, como la amiodarona, dronedona, metotrexato, tamoxifeno, ácido valproico, tetraciclinas, aspirina, ibuprofeno, glucocorticoides, agentes quimioterapéuticos, nucleósidos inhibidores de la reversa transcriptasa.

La esteatosis hepática es una forma rara de LHIF y se puede presentar como esteatosis microvesicular, macrovesicular y esteatohepatitis dependiendo del mecanismo particular del fármaco, cabe mencionar que todas las condiciones mencionadas con anterioridad corresponden al espectro de EHGNA (Liane *et al.*, 2015).

La esteatosis microvesicular se caracteriza por la formación de pequeñas gotas lipídicas dentro del hepatocito que no desplazan al núcleo y es asociada clínicamente con un aumento en los niveles de aminotransferasa en el suero, acidosis láctica e insuficiencia hepática aguda. En contraste, la esteatosis macrovesicular es caracterizada histológicamente por una gran vacuola que llena todo el hepatocito desplazando al núcleo a la periferia de la célula y esta es asociada con la acumulación de triglicéridos en el hepatocito, ya sea por una alteración en la β oxidación de los ácidos grasos, una reducción en la secreción de proteína de muy baja densidad (VLDL), aumento de la síntesis *de novo* de ácidos grasos, aumento en la captación de ácidos grasos, o una inducción de resistencia a la insulina (Miele *et al.*, 2017).

La esteatohepatitis se caracteriza histológicamente por esteatosis, inflamación lobular y lesión hepatocelular (Cuerpos de Mallory) y en algunos casos fibrosis peri-sinusoidal. Su desarrollo puede ser considerado como la precipitación de la esteatosis preexistente o como una enfermedad hepática *de novo* (Ramachandran *et al.*, 2009).

1.5.3.1 Aspectos generales sobre la enfermedad de hígado graso

La EHGNA fue descrita por primera vez en 1958 por Westwater y Fainer y es definida como una entidad clínica que se caracteriza por la presencia de una acumulación anormal de TG en el citoplasma de más del 5% de los hepatocitos del parénquima hepático. Esta entidad incluye un amplio espectro de lesiones hepáticas que van desde una simple esteatosis hepática sin inflamación hasta el desarrollo de cáncer hepatocelular (Benedict *et al.*, 2017).

La EHGNA es actualmente la causa más común de enfermedad hepática crónica. Su prevalencia en la población general oscila entre el 20 y 30 % y se presenta tanto en niños como en adultos. Aunque esta afección tiene etiología multifactorial (**Tabla 2**), la obesidad es el factor que se asocia con mayor relevancia (Sanyal *et al.*, 2002). Esta condición es más frecuente en pacientes con condiciones metabólicas preexistentes, sobre todo en personas que padecen DM2, donde se ha estimado una prevalencia del 69% (Torres *et al.*, 2012).

Tabla 2. Condiciones asociadas con la EHGNA

1. Resistencia a la Insulina	-Obesidad -Diabetes
2. Desorden en metabolismo lipídico	-Hipertrigliceridemia -Abetalipoproteinemia -Hipobetalipoproteinemia -Lipodistrofia -Síndrome de Christian- Weber
3. Pérdida de peso severa	-Inanición
4. Fármacos	-Amioderona -Tamoxifen -Diltiazem
5. Exposiciones a Tóxicos	- Solventes Industriales

Tomado y Modificado de Zafrani *et al.*, 2004.

En México no existen estadísticas precisas sobre la prevalencia de EHGNA, no obstante, se considera que esta afección crece a la par de la obesidad y la DM. De acuerdo con la Secretaría de Salud, esta condición hepática se encuentra dentro de las 10 primeras causas de enfermedad y muerte en los mexicanos (IMSS, 2014). En la Ciudad de México la incidencia y prevalencia de hígado graso en la población adulta es del 14 y 16 % respectivamente.

1.5.3.2 Historia natural de la enfermedad de hígado graso no alcohólico

La teoría de la patogénesis de la EHGNA se basa en la hipótesis de los “2 *hits*”, la cual establece que la esteatosis es el primer “*hit*”, el cual consiste en la acumulación de TG en el hígado, sensibilizando a este órgano para el desarrollo de la lesión mediada por el segundo “*hit*”, que consiste en la presencia de citocinas inflamatorias, disfunción mitocondrial y estrés oxidativo, lo que a su vez conduce a la esteatohepatitis y/o fibrosis (Dowmann *et al.*, 2010).

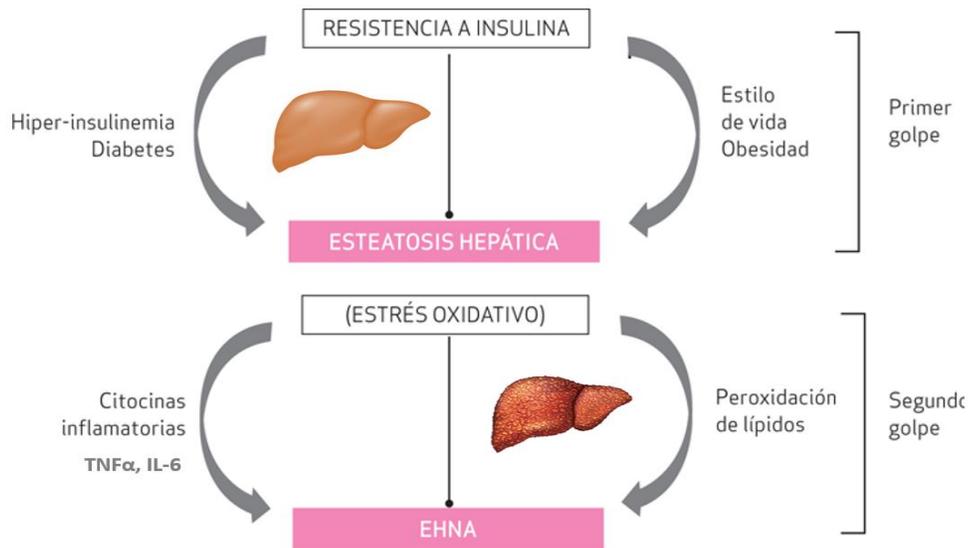


Figura 5. Historia natural de la esteatosis hepática no alcohólica (EHGNA) basada en la hipótesis de los dos “*hits*”. El primer *hit* consiste en la acumulación de triglicéridos como gotas de lípidos dentro del hepatocito que es la causa de la esteatosis. Mientras que el segundo “*hit*” es la esteatosis asociada con la inflamación, muerte celular y fibrosis, se refiere a la esteatohepatitis (EHNA) Modificada de Dowmann *et al.*, 2010.

1.5.4 alteraciones en el metabolismo de los ácidos grasos en la enfermedad de hígado graso no alcohólica

Como se ha mencionado con anterioridad, la EHGNA se caracteriza por una acumulación de TG en el parénquima hepático y las fuentes de ácidos grasos que contribuyen con el desarrollo de esta enfermedad hepática son:

-La liberación de ácidos grasos en el plasma provenientes del tejido adiposo periférico hacia el hígado. Los ácidos grasos libres en el plasma se consideran la principal fuente de los ácidos grasos que fluyen desde el tejido adiposo hacia el hígado en estado de ayuno y representan la mayor fuente de TG intrahepáticos.

-Los ácidos grasos provenientes de la lipogénesis *de novo*

-Los ácidos grasos de la dieta, los cuales ingresan al hígado a través de quilomicrones derivados del intestino delgado (Musso *et al.*, 2009).

En condiciones normales, los ácidos grasos provenientes de la dieta, principalmente TG y el exceso de hidratos de carbono son convertidos en ácidos grasos libres que son transportados al hígado y almacenados en el tejido adiposo como TG re-esterificados, o usados como una fuente de energía por el músculo. En ayuno, los TG almacenados en el tejido adiposo son hidrolizados a ácidos grasos libres y transportados al hígado en donde son usados para formar fosfolípidos, colesterol o convertidos en cuerpos cetónicos para ser usados como combustible en el tejido extrahepático (Mehta *et al.*, 2002).

La acumulación excesiva de grasa en el hígado ocurre en respuesta a un incremento en la liberación de ácidos grasos libres derivados del tejido adiposo, incremento de la ingesta de ácidos grasos en la dieta, incremento de la lipogénesis *de novo*, reducción en la oxidación de los ácidos grasos y disminución en la producción de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y de muy baja densidad (VLDL). El incremento en los ácidos grasos libres provoca resistencia a la insulina, debido a que provocan que se generen fallas en la liberación de VLDL, las cuales son el producto de la esterificación de los ácidos grasos libres en condiciones normales desde el hígado hacia el torrente sanguíneo; esto contribuye a la acumulación de TG en los hepatocitos (Postic *et al.*, 2008)

Por otra parte, la resistencia a la insulina promueve la lipólisis del tejido adiposo e hiperinsulinemia. La lipólisis periférica moviliza los ácidos grasos libres e incrementa el consumo de ácidos grasos en el hígado promoviendo la acumulación de grasa, la glucógenolisis y el incremento en la síntesis de ácidos grasos libres, mientras que simultáneamente, inhibe la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos (Watkins *et al.*, 2013)

Así mismo, la hiperinsulinemia también favorece la acumulación de TG hepáticos por la disminución en la capacidad del hígado de re-esterificar los TG y su salida del hepatocito para su almacenamiento en el tejido adiposo, debido a ello, la resistencia a la insulina se considera el principal mecanismo en el desarrollo de EHGNA (Musso *et al.*, 2003).

1.5.4.1 Lipogénesis *de novo*

La lipogénesis *de novo* es una vía metabólica que sintetiza ácidos grasos a partir del exceso de hidratos de carbono. En condiciones fisiológicas normales la lipogénesis *de novo* tiene lugar principalmente en el hígado y en el tejido adiposo y colabora en el mantenimiento de la homeostasis de TG. Diversos estudios han reportado que en condiciones basales la contribución de grasa hepática por la vía de lipogénesis *de novo* es menor al 5%; sin embargo, en condiciones patológicas como la EHGNA, se ha descrito que la lipogénesis *de novo* hepática es una fuente significativa de depósitos de grasa en el hígado, de aproximadamente 30% (Postic *et al.*, 2008).

La actividad de las vías lipogénicas son dependientes de las condiciones nutricionales y está claramente establecido que la transcripción de las enzimas lipogénicas requieren tanto de la insulina como de la glucosa para ser inducidas. En esta vía de lipogénesis *de novo*, la glucosa dietaria es convertida en acetil-CoA a través de la glicolisis y la oxidación del piruvato, acetil-CoA después es convertida en malonil-CoA por la acetil-CoA carboxilasa (ACC); por otro lado, la sintetasa de ácidos grasos (FAS) cataliza la formación de ácido palmítico, de acetil-CoA y malonil-CoA. El ácido palmítico es después elongado y desaturado por la elongasa de cadena larga 6 (ELOVL6) y esterol-CoA desaturasa-1 (SCD1) para generar ácidos grasos monoinsaturados, los cuales son los principales ácidos grasos que constituyen los TG. Glicerol-3-fosfato aciltransferasa (GPAT) después cataliza la esterificación de glicerol-3-fosfato por la glicolisis con una nueva síntesis de ácidos grasos para generar ácidos lisofosfatídicos; estos ácidos lisofosfatídicos son sustratos de 1 acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa (AGPAT) para catalizar la formación de ácidos fosfatídicos, así mismo, estos ácidos fosfatídicos son procesados a diacilgliceroles por lipina 1, seguido de la formación de TGs a través de acil-CoA, diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) (Kawano *et al.*, 2013).

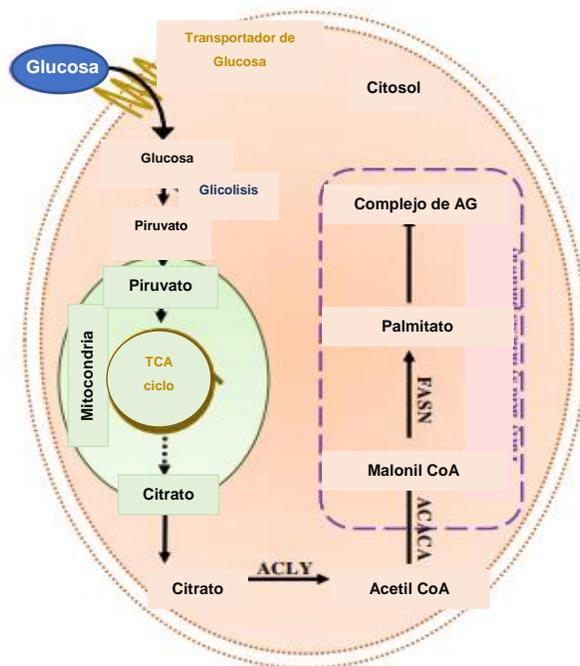


Figura 6. Lipogénesis *de novo*. La glucosa es transportada por el transportador GLUT4, entra a la vía glicolítica y se genera piruvato. Este piruvato es convertido en citrato que sale de la mitocondria y es convertido en acetil-CoA por la enzima ATP- citrato liasa (ACLY). La acetil-CoA carboxilasa (ACACA) hidroliza la acetil-CoA para generar malonil-CoA, que después es utilizado como sustrato para la producción de palmitato saturado de 16 carbonos por la enzima biosintética el ácido graso sintasa (FASN). Tomado y Modificado de Ameer *et al.*, 2014.

La lipogénesis *de novo* se controla principalmente a nivel transcripcional y está mediada por la insulina y la glucosa que actúan mediante la activación de dos factores de transcripción principales: la proteína de unión al elemento de esteroides 1 (SREBP1c) y la proteína de unión al elemento de respuesta a hidratos de carbono (ChREBP). SREBP1c es un factor de transcripción que promueve la expresión de genes pro-lipogénicos, incluyendo a FAS, ACC, SCD1 entre otros (Kawano *et al.*, 2013).

1.5.4.2 Alteración del transporte de lípidos

El consumo de ácidos grasos en el hígado contribuye a establecer la homeostasis de los triglicéridos hepáticos. La velocidad del consumo de ácidos grasos del plasma a las células hepáticas depende de la concentración de ácidos grasos plasmáticos y de la capacidad hepatocelular del consumo de éstos. La capacidad en la absorción de los ácidos grasos depende del número y la actividad de proteínas de transporte en la membrana plasmática sinusoidal de los hepatocitos. Los principales transportadores de membrana plasmática de los ácidos grasos libres son las proteínas transportadoras de ácidos grasos (FATP), como la translocasa de ácidos grasos (FAT/CD36) y la proteína de unión a ácidos grasos (FABP) (Koo *et al.*, 2013)

Estudios *in vivo* indican que la pérdida de la función de cualquiera de estas proteínas transportadoras disminuye considerablemente la tasa de consumo de ácidos grasos (Falcon *et al.*, 2010). En otro estudio, se ha observado que la expresión hepática de CD36 se incrementa en pacientes con EHGNA, y es un mediador del aumento en la absorción de los ácidos grasos no esterificados, así mismo, se ha observado que el aumento en la expresión de CD36 en modelos *in vivo* incrementa el contenido de TG hepáticos (Koonen *et al.*, 2007).

1.5.4.3 Receptores activados por proliferación de peroxisomas (PPARS)

Los receptores nucleares son una super familia de factores de transcripción que responden a ligandos naturales o sintéticos incluyendo compuestos endógenos, como hormonas esteroides, ácidos grasos, ácidos biliares, vitaminas, colesterol; ligandos exógenos, incluyendo varios fármacos y toxinas (Wagner *et al.*, 2011).

Los PPARS son una subfamilia de receptores nucleares que deben su nombre al hecho de que responden al estímulo con drogas que estimulan la proliferación de los peroxisomas. Se han identificado 3 isoformas en mamíferos, PPAR α , PPAR β/δ y PPAR γ . Los PPARS son factores de transcripción que regulan la expresión de sus genes blanco a través de la unión a los elementos de respuesta específicos en las regiones promotoras para proliferación de peroxisomas (PPREs) en los sitios potenciadores de sus genes blanco (Berger *et al.*, 2002).

Los PPARs juegan un papel fundamental en el metabolismo de los lípidos, ya que se unen a ligandos naturales y sintéticos y se expresan de forma importante en los tejidos que participan en el metabolismo de los lípidos. Las isoformas de PPAR α y PPAR β regulan la expresión de genes involucrados con la oxidación de lípidos y se expresa en tejidos con una alta tasa metabólica, como el músculo, el hígado, el corazón y el tejido adiposo pardo. Por otra parte, PPAR γ se destaca por su capacidad para activar genes lipogénicos y de la diferenciación de adipocitos (Bugge *et al.*, 2010)

En condiciones fisiológicas normales, PPAR α es el subtipo que mayormente se expresa en el hígado y es el principal regulador de la respuesta hepática al ayuno, ya que incrementa el flujo de ácidos grasos hacia el hígado, incrementa el consumo y la oxidación de los ácidos grasos incrementa las apolipoproteínas HDL, disminuye la producción de VLDL, así como la modulación del metabolismo de los aminoácidos y la gluconeogénesis. PPAR γ por su parte, incrementa la lipogénesis y la sensibilidad a la insulina, mientras que PPAR β es un regulador del metabolismo de los ácidos grasos ya que su activación incrementa el transporte y el flujo de estos y controla la homeostasis de la glucosa a través de promover la sensibilidad a la insulina (Tailleux *et al.*, 2012).

En condiciones patológicas como la EHGNA, la expresión de los PPARs y sus genes blancos se modifica. Estudios *in vivo* indican que ratones *knock out* para la expresión de PPAR α desarrollan esteatosis hepática y muestran elevación en los niveles de TG y colesterol plasmáticos. En el caso del receptor PPAR γ , se ha demostrado que su expresión se incrementa en modelos animales con esteatosis hepática. Diversos modelos murinos con obesidad y DM2, desarrollan esteatosis hepática y expresan niveles aumentados de PPAR γ en el hígado. En el caso de PPAR β , que se expresa en menor proporción en el hígado, se ha observado en estudios *in vivo* con esteatosis hepática el tratamiento con agonistas de este receptor muestra una reversión en el padecimiento y en la inflamación, ya que promueve el metabolismo de los lípidos e inhibe procesos inflamatorios. En el caso contrario, la deficiencia en la expresión de PPAR β en este modelo muestra que los animales son más sensibles a agentes químicos hepatotóxicos, tales como azoximetano y CCl₄, los cuales promueven la fibrosis y la cirrosis hepática. Por lo que se llega a la conclusión de que PPAR β es un factor protector contra la inflamación y la fibrosis. Es posible que debido a que PPAR β se expresa en las células hepáticas, su actividad contribuya a la disminución del contenido de lípidos ya que promueve el proceso de β -oxidación de los ácidos grasos (Tailleux *et al.*, 2012).

1.5.5 Antecedentes de fármacos que causan daño hepático

1.5.5.1 Rifampicina

La RIF es un antibiótico macrocíclico que pertenece al grupo de las rifamicinas, las cuales se extrae de los cultivos de *Streptomyces mediterranei*, mediante hidrólisis y reducción de la rifamicina B. Este fármaco por si solo es capaz de provocar toxicidad hepática tanto en modelos *in vivo*, *in vitro* y en humanos, además de que es capaz de incrementar la toxicidad hepática de otros antituberculosos como la isoniazida y pirazinamida debido a su potente inducción del CYP450 (Shen *et al.*, 2009).

La lesión hepática por RIF se encuentra bien documentada (**Tabla 3**). Los tratamientos a largo plazo con este fármaco es asociada con elevaciones transitorias en los niveles de aminotransferasa, también, se ha observado que RIF altera los niveles de bilirrubina sérica

El mecanismo de toxicidad hepática propuesto para este fármaco es a través de la alteración lipídica de la membrana debida a un aumento de estrés oxidativo (EO). La RIF altera principalmente la captación de sales biliares y bilirrubina, compitiendo por su unión con proteínas intracelulares y produciendo lesión hepática de tipo colestásico. Los niveles de bilirrubina disminuyen con la inducción enzimática del glucorónido de bilirrubina por parte de la RIF, la cual se une con las bilirrubinas e incrementa su excreción biliar.

Tabla 3. Manifestaciones Hepatotóxicas causadas por Rifampicina

Tipo de Lesión	Tipo de Estudio	Referencia
R causa lesión toxica directa en los hepatocitos de rata.	<i>In vitro</i>	Cheng et al., 2009 & Meng et al., 2006
R+I induce apoptosis de hepatocitos en ratones	<i>In vivo</i>	Shih et al., 2013 & Cheng et al., 2011
R causa colestasis intrahepática.	<i>In vivo</i>	Zhang et al., 2009
R induce acumulación lipídica Asociada con la regulación PPARγ	<i>In vivo</i>	Huang et al., 2016
R induce colestasis en ratones	<i>In vivo</i>	Cheng et al., 2009
R induce acumulación lipídica en línea HepaRG	<i>In vitro</i>	Cortina et al., 2013

1.5.5.2 Metformina

La MTF actúa como un agente sensibilizador de la insulina, disminuyendo las concentraciones plasmáticas de esto e induce a una mayor utilización periférica de la glucosa y disminuye la producción de glucosa hepática. MTF no sufre metabolismo hepático, debido a ello se ha considerado seguro desde el punto de vista hepático. A pesar de su eficacia clínica, la MTF se ha asociado con distintos efectos adversos, entre los que encontramos, anorexia, diarrea, náuseas, vomito, hinchazón y su uso a largo plazo ha reportado disminución en los niveles séricos de ácido fólico y vitamina B12. Su riesgo principal es la acidosis láctica, y para minimizarlo, dicho fármaco no se debe administrar en pacientes con insuficiencia hepática o cardiovascular (Kutoh, 2005).

Se desconoce el mecanismo por el cual la MTF causa hepatotoxicidad, ya que, aunque se concentra en el hígado, no presenta metabolismo hepático y se excreta inalterada por la orina. No existen datos dependientes de la dosis, lo cual, junto con el periodo de latencia de varias semanas entre la introducción del fármaco y la aparición clínica, hace pensar en una reacción de tipo idiosincrático (Nisbet *et al.*, 2004).

Aunque la incidencia sea muy baja, la hepatotoxicidad por MTF debe tenerse en cuenta en los pacientes diabéticos que reciben MTF y desarrollan alteraciones hepáticas (**Tabla 4**).

Tabla 4. Manifestaciones hepatotóxicas causadas por metformina

Tipo de Daño	Tiempo de Tratamiento (Semanas)	Referencia
Hepatitis	6	Deutsh <i>et al.</i> , 2004
Hepatitis/ Colestasis	4	Babich <i>et al.</i> , 1998
Colestasis	5	Desilets <i>et al.</i> ,2001
Colestasis	4	Nammour <i>et al.</i> , 2003
Hepatitis/ Colestasis	3	Kutoh, 2005
Hepatitis	2	Cone <i>et al.</i> , 2010

1.6 Justificación

Hoy en día, la TB y la DM2 son problemas de salud pública prioritarios que afectan tanto a niños como adultos y de manera independiente, ocupan el segundo lugar en las estadísticas de morbilidad nacional (conjuntamente afectan al 36% de la población). El manejo terapéutico de estas comorbilidades es, por supuesto, más complejo que el tratamiento de cada una de ellas individualmente. Los efectos secundarios de la DM2, por ejemplo, sobre el sistema inmunitario, hace a los pacientes más susceptibles a contraer TB. En México, se estima que más del 39% de los casos de TB se presentan en individuos con pobres condiciones socioeconómicas, sanitarias y clínicas, por ejemplo, desnutrición, casa habitación insalubre, hacinamiento y DM2. La concurrencia de estas patologías sinergiza su impacto en los pacientes, lo que hace necesario su estudio, tal es el caso de la comorbilidad TB-DM2, la que ha sido referida desde hace décadas, pero los efectos de su cotratamiento, en particular los hepáticos han sido poco estudiados. Un aspecto importante es el manejo terapéutico, puesto que, ambos padecimientos requieren de tratamientos prolongados en los que las interacciones entre estos medicamentos pueden interaccionar e incluso, resultar en nuevas patologías. La polimedicación resultante del tratamiento de estas enfermedades concurrentes, puede inducir daño hepático, por ejemplo, citólisis hepática y colestasis, e inclusive, desarrollar enfermedades complejas como hígado graso no alcohólico, esteatohepatitis, cirrosis o hepatocarcinoma.

Tomando en cuenta que la RIF y la MTF son los fármacos de elección para el tratamiento de TB y DM2, y que ésta última interfiere con el metabolismo de los fármacos antituberculosos, se hace prioritario estudiar el efecto independiente de MTF o RIF, y de manera conjunta sobre la homeostasis lipídica, puesto que estos medicamentos causan daño hepático.

1.7 Hipótesis

El cotratamiento con rifampicina y metformina aumentarán la acumulación lipídica en las células HepG2.

1.8 Objetivo general

Determinar el efecto del cotratamiento con rifampicina y metformina sobre la acumulación lipídica en células HepG2.

1.8.1 Objetivos particulares

- Estimar las concentraciones en que Rifampicina o Metformina y en co-exposición resultan en muerte celular.
- Desarrollar un modelo de acumulación lipídica *in vitro* en la línea HepG2 con los estímulos de ácido palmítico y Rifampicina.
- Cuantificar la acumulación lipídica a través de la tinción con rojo oleoso en las células HepG2 con Rifampicina y/o Metformina.
- Determinar el tipo de sinergismo farmacológico entre Rifampicina y Metformina a través del modelo de superficie de interacción sinérgica (SIS)
- Diseñar una posible ruta metabólica del cotratamiento Rifampicina y Metformina con ayuda de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG).

1.9 Diseño experimental

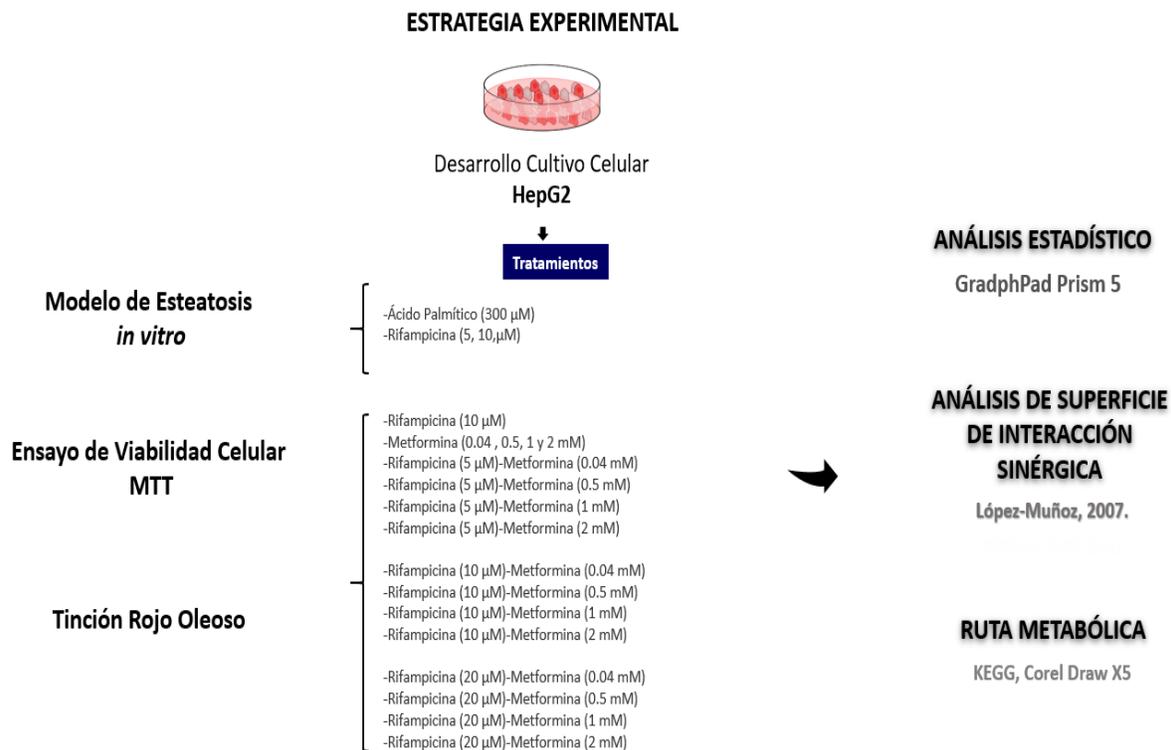


Figura 7. Estrategia Experimental. Se desarrollo el cultivo de la línea celular HepG2 y se aplicaron los tratamientos correspondientes durante un tiempo de 48 h. Posteriormente se evaluó la viabilidad celular mediante la técnica de MTT y se realizó la tinción con el colorante rojo oleoso. Los resultados se analizaron con el software GradhPad Prism 5 y el modelo de Superficie de Interacción Sinérgica del Dr. Francisco López. La construcción de la ruta metabólica se realizó empleando el KEGG y el programa Corel Draw X5.

2. MÉTODOS

2.1 Reactivos

Medio DMEM, alto en glucosa, Rifampicina ($C_{43}H_{58}N_4O_{12}$), Metformina ($C_4H_{11}N_5$), rojo oleoso ($C_{26}H_{24}N_4O$), paraformaldehído ($OH(CH_2O)$), isopropanol (C_3H_8O), fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4), dimetil sulfóxido DMSO (C_2H_6OS), 3-(4,5 dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) se obtuvieron de Sigma–Aldrich (San Louis, MO), albumina bovina sérica (BSA) (US biological, Boston MA); tripsina-EDTA 0.25%, penicilina/estreptomina, suero fetal bovino (FBS) (GIBCO, Thermo Fisher Scientific Gaithersburg, MD) filtro de disco con membrana de 0.2 μm (Thermo Scientific, Nalgene Syringe Filters), fosfato de sodio monobásico ($NaHPO_4$) proporcionado por el Dr. Olivier Barbier, ácido palmítico proporcionado por el Dr. Víctor Calderón.

2.2 Células HepG2

HepG2 es una línea celular perpetua, derivada de un adolescente caucásico que padecía de cáncer hepático (Sahu, 2007). Este modelo celular es ampliamente utilizado como modelo hepático, debido a que muestra una gran cantidad de funciones hepáticas y de expresión enzimática (Gomez-Lechon *et al.*, 2007). Esta línea celular fue proporcionada por el Dr. Arturo Ortega Soto (Depto. de Toxicología Cinvestav-IPN).

2.2.1 Cultivo celular HepG2

Las células HepG2 se cultivaron en medio DMEM (alto en glucosa) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), penicilina (100U/mL) y estreptomina ($\mu g/mL$). Los cultivos celulares fueron mantenidos en una incubadora a 37°C en una atmosfera humificada con 95% de aire y 5% de CO_2 .

2.2.2 Ensayo de viabilidad celular por el método de MTT

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizado por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazan producido (Mosmann, 1983).

2.2.2.1 Procedimiento

Las células fueron cultivadas a una densidad de 4 a 5×10^4 células por pozo en placas de 24 pozos. Una vez que alcanzaron confluencia se trataron bajo las siguientes concentraciones de RIF y MTF por 48 horas (**Tabla 5**).

Tabla 5. Concentraciones utilizadas durante tratamiento de 48 h.

Fármaco A	Fármaco B	Combinaciones	
Rifampicina	Metformina	Rifampicina	Metformina
μM	mM	μM	mM
5	0.04	5	0.04
10	0.50	5	0.50
20	1.00	5	1.00
	2.00	5	2.00
		10	0.04
		10	0.50
		10	1.00
		10	2.00
		20	0.04
		20	0.50
		20	1.00
		20	2.00

Una solución de MTT fue preparada disolviendo 5 mg/mL en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.5 y esterilizada en autoclave. El ensayo colorimétrico fue utilizado de acuerdo al descrito por Mosmann (1983). Después de 3 horas de incubación con el reactivo, se adicionaron 200 μL de DMSO para disolver los cristales de formazan, el cambio de coloración fue evaluado por densidad óptica utilizando un lector de placas Tecan M200 (Tecan, Infinete M200), a una longitud de onda de 550 nm.

2.3 Inducción de esteatosis hepática en células HepG2

2.3.1 Fundamento

La esteatosis hepática en humanos se asocia con la acumulación intracelular de lípidos y la subsecuente formación de gotas lipídicas en el citoplasma de los hepatocitos, asociado a un incremento del tamaño del hígado (hepatomegalia) (Araya *et al.*, 2004). El modelo de esteatosis se realizó utilizando la línea celular HepG2, esta línea celular bajo estímulos de ácido oleico (AO), ácido palmítico (AP) o fructosa (F) induce similitudes morfológicas similares a hepatocitos con esteatosis (Janorkar *et al.*, 2009).

2.3.2 Procedimiento

Para llevar a cabo los tratamientos se sembraron en multipozos de 6 un total de 1.5×10^5 células (Okamoto *et al.*, 2002). Una vez alcanzado el 70% de confluencia, las células se incubaron 24 h en medio libre de suero (o BSA 1 %) antes de aplicar los tratamientos. Las células HepG2 al 70% de confluencia fueron tratadas con ácido palmítico 300 μM , diluido en albúmina sérica bovina (BSA) al 3%. Por otra parte, RIF 5, 10 y 20 μM se disolvió en DMSO al 1%. Con el ácido palmítico, la acumulación lipídica se observa a las 6, 12, 24, 48 y 72 h (Lin *et al.*, 2007) y con la RIF se tiene reportado a las 24 y 48 h (**Tabla 6**) (Zhang *et al.*, 2013).

Tabla 6. Concentraciones utilizadas para inducción de esteatosis en la línea HepG2.

Ácido Palmítico μM	Rifampicina μM
300	5
	10
BSA 3%	20
	DMSO 1%

2.4 Tinción con rojo oleoso

2.4.1 Fundamento

La tinción con colorantes solubles en aceites se basa en su mayor capacidad de solubilidad sobre las estructuras lipofílicas de las células sobre el disolvente en el que se encuentran al momento de ser aplicados. Rojo oleoso es un colorante liposoluble que se une específicamente a los triglicéridos y oleatos de colesterol, confiriéndoles una coloración rojiza (Ramírez *et al.*, 1992).

2.4.2 Procedimiento

Las células fueron cultivadas a una densidad de 2.5×10^5 células por pozo en placas de 12 pozos. Una vez que alcanzaron confluencia se trataron bajo las siguientes concentraciones durante 48 horas (**Tabla 7**).

Tabla 7. Concentraciones utilizadas en tinción con Rojo Oleoso

Fármaco A	Fármaco B	Combinaciones	
Rifampicina μM	Metformina mM	Rifampicina μM	Metformina mM
5	0.04	5	0.04
10	0.50	5	0.50
20	1.00	5	1.00
	2.00	5	2.00
		10	0.04
		10	0.50
		10	1.00
		10	2.00
		20	0.04
		20	0.50
		20	1.00
		20	2.00

Una vez concluidos los tratamientos, las células se lavaron 3 veces con PBS, posteriormente para fijar las células se utilizó paraformaldehído al 4% (Apéndice I) y se dejó incubando durante 60 min en agitación a temperatura ambiente. Terminado el tiempo de incubación, las células se lavaron 3 veces con PBS.

Para la tinción con el colorante, se prepararon 3 mg de rojo oleoso que fueron disueltos en 1 mL de isopropanol (solución stock), de este stock se realizó una dilución con agua en relación 60:40, filtrando 2 veces con filtro de 0.45 μM (Apéndice II). A cada pozo de células se les agregó 1 mL de esta dilución y se incubó durante 60 min a temperatura ambiente. Después de la tinción, las células se lavaron 2X con agua destilada o PBS para eliminar el colorante no unido y se visualizaron al microscopio para tomar las fotografías correspondientes.

2.5 Cuantificación de rojo oleoso

2.5.1 Fundamento

El rojo oleoso tiñe específicamente triglicéridos y esterés de colesterol (Ramirez *et al.*, 1992), por lo tanto, la absorbancia del rojo oleoso es proporcional a la cantidad de triglicéridos presentes en las células.

2.5.2 Procedimiento

Una vez teñidas las células se secaron a temperatura ambiente y se procedió a extraer el colorante con isopropanol colocando 1 mL en cada pozo en una placa de 12 y se leyó a 510 nm de absorbancia. El contenido de lípidos totales fue expresado por medio del cociente de la absorbancia de la muestra sobre el blanco (Control) multiplicado por cien, para obtener el porcentaje de lípidos presentes en cada muestra.

2.6 Análisis estadístico

Los datos se analizaron en el programa estadístico Prism V.5.0 (Graphpad Software inc. San Diego, CA). Los resultados de tres experimentos independientes se expresaron como la media \pm error estándar de la media (EEM). Los datos se analizaron por método de Análisis de Varianza (ANOVA) con prueba *post hoc* Tukey o Dunett. Los asteriscos (*) denotan las diferencias entre concentraciones/tiempos del mismo grupo. Se tomo como diferencia significativa * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

2.7 Análisis de Superficie de Interacción Sinérgica

2.7.1 Fundamento

El análisis de “Superficie de Interacción Sinérgica” (SIS) proporcionado por el Dr. Francisco Javier López Muñoz del Departamento de Farmacobiología del Cinvestav- Sede Sur (López-Muñoz., ,1994) es un modelo cuyo propósito es analizar diversas proporciones de combinaciones o interacciones farmacológicas entre 2 fármacos, de manera que el análisis permite detectar tanto las combinaciones más eficaces, así como las combinaciones que generan los mejores efectos de disminución o infra aditivos. Por lo tanto, el modelo permite determinar las mejores combinaciones para el efecto esperado o a estudiar, así como el tipo de sinergismo que se da entre la interacción de los compuestos.

2.7.2 Procedimiento

Los datos obtenidos experimentalmente sobre el efecto a estudiar (acumulación lipídica) se analizaron con el método de la SIS. Inicialmente se emplearon los datos de efectos individuales de los fármacos (RIF, MTF) y posteriormente se incluyeron los datos generados por todas las combinaciones (A+B), de tal manera, que se podía detectar la combinación con mayor eficacia para producir el efecto deseado o esperado, y posteriormente detectaba de qué tipo de interacción se trataba para estimar la importancia de la combinación y de los efectos individuales.

2.8 Diseño de ruta metabólica

El diseño propuesto de las posibles rutas metabólicas que siguen RIF y MTF se construyó con la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (KEGG) y diversas consultas bibliográficas. Posteriormente, se utilizaron dos softwares para la construcción del diagrama. Las ilustraciones de los órganos se elaboraron en FireAlpaca V.2.1.5 y Corel Draw X5 V.15.0 (Graphics Suite inc. Otawwa, Canadá).

3. RESULTADOS

3.1 Evaluación del efecto individual y en cotratamiento con rifampicina y metformina sobre la viabilidad celular

Para evaluar el porcentaje de viabilidad de las células HepG2 después de un tiempo de tratamiento de 48 horas se empleó el ensayo MTT. El cual nos indicó que la viabilidad de las células HepG2 se vio afectada de manera estadísticamente significativa con las concentraciones 5, 10 y 20 μM de RIF, de igual manera que los cotratamientos RIF 5 μM -MTF 0.04 mM, RIF 10 μM -MTF 0.04 y 0.5 mM, RIF 20 μM - MTF 0.04, 0.5, 1 y 2 mM. Por otra parte, la exposición a MTF 0.04, 0.5, 1 y 2 mM, RIF 5 μM - MTF 0.5, 1 y 2 mM, RIF 10 μM - MTF 1 y 2 mM no afectaron la viabilidad celular (**Figura 8**), lo que nos indica que estas concentraciones durante el tiempo seleccionado de tratamiento no resultaron ser citotóxicas para las células.

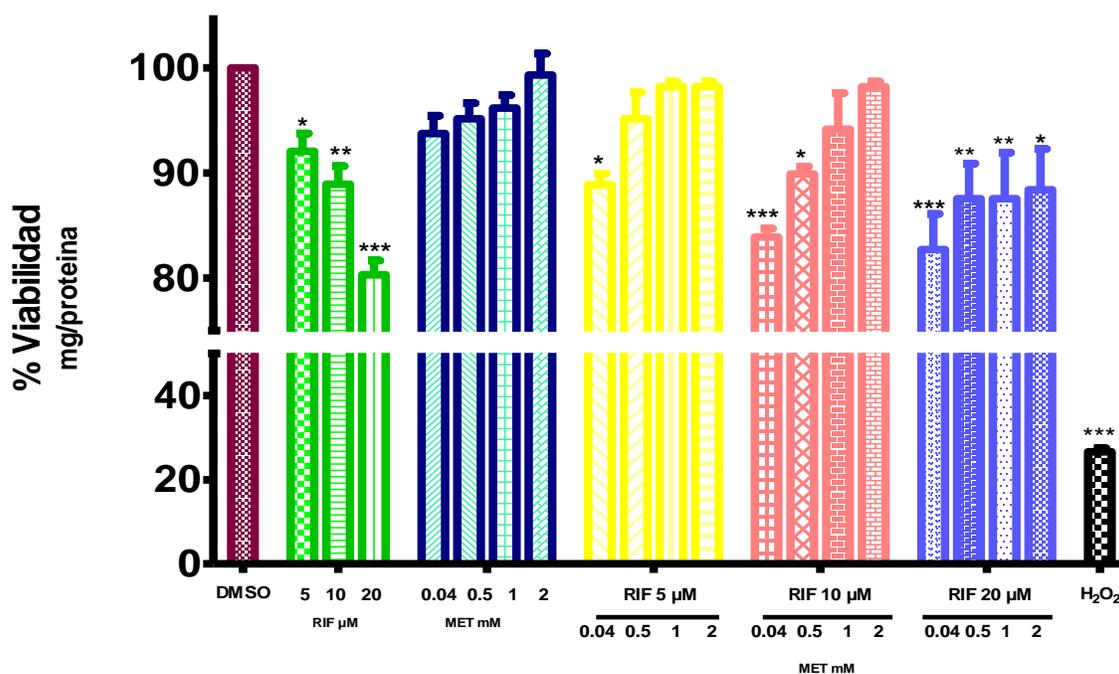


Figura 8. Efecto individual y en cotratamiento de rifampicina y metformina sobre la viabilidad celular. Las células HepG2 fueron sometidas a tratamiento con rifampicina y metformina durante 48 horas de forma individual y en combinación, tomando como control negativo (DMSO) y positivo (H₂O₂). Los valores se encuentran expresados como la media \pm SEM de tres experimentos independientes cada uno realizado por triplicado. ANOVA de una vía con $p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$ prueba post hoc Dunnett's.

3.2 Inducción de esteatosis hepática en células HepG2

Con la finalidad de inducir la acumulación de triglicéridos, las células HepG2 fueron expuestas a tratamientos con ácido palmítico y RIF. En la **Figura 9** se puede observar que las células HepG2 desarrollaron esta condición con ambos compuestos. Particularmente, las células tratadas con ácido palmítico (300 μM) muestra una mayor acumulación de triglicéridos que aquellas tratadas con RIF. La RIF indujo una acumulación de triglicéridos de forma concentración dependiente. Se observa que la condición con DMSO (B) acumula un poco de triglicéridos respecto al control sin estímulo (A). Las concentraciones utilizadas para realizar los tratamientos ya han sido descritas por otros autores (Zhang et al., 2013).

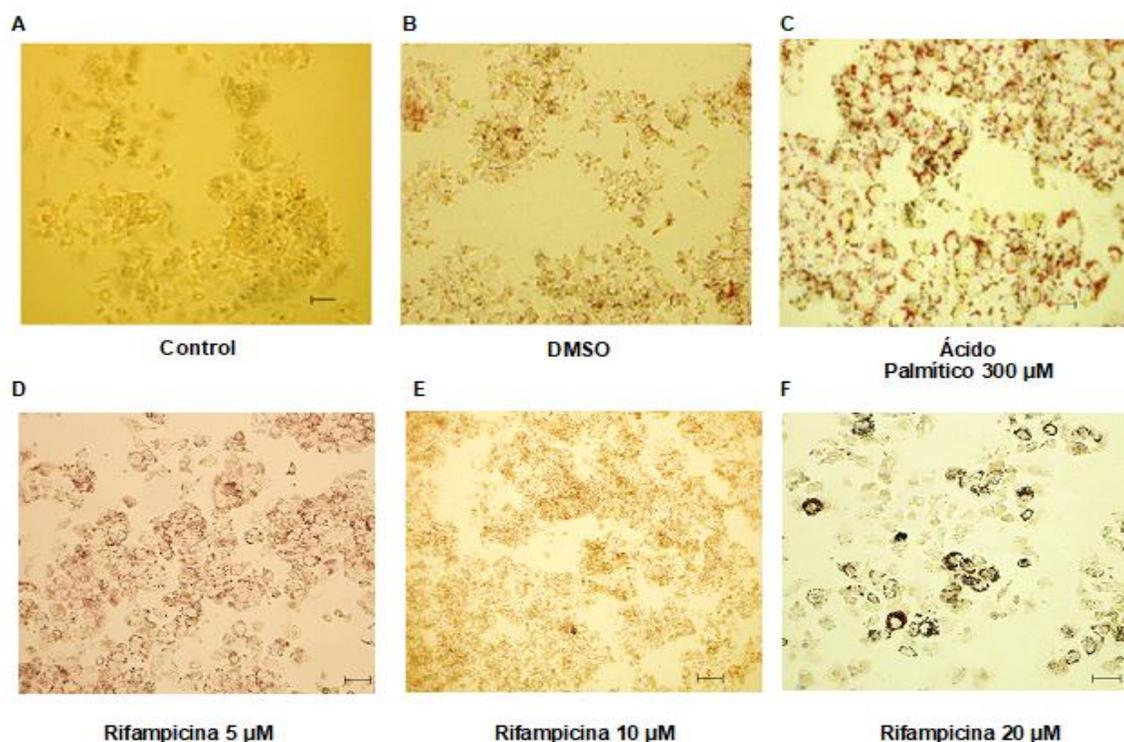


Figura 9. Imágenes de las células HepG2 teñidas con rojo oleoso. Las células HepG2 fueron tratadas con Rifampicina 5 μM (D), 10 μM (E), 20 μM (F). Ácido palmítico se usó como control positivo (C), como control sin tratamiento (A) y DMSO (B) por 48 horas. Fotografías representativas de al menos tres experimentos independientes por triplicado tomadas de un microscopio (Olympus Ix70) de contraste de fases a 10x.

3.2.1 Cuantificación de la inducción de esteatosis hepática

La cuantificación de lípidos se realizó mediante la medición de la absorbancia del rojo oleoso a 510 nm. Esta tinción es útil para evaluar de forma cualitativa como cuantitativamente la acumulación de triglicéridos en las células ya que este colorante tiene afinidad por los lípidos. En la **Figura 10** se puede observar que las células tratadas con RIF 5 y 10 μM tienen una tendencia significativa a acumular lípidos. Por otro lado, la estimulación con RIF 20 μM muestra una disminución en la acumulación de lípidos. Se observa que el vehículo en el que se disolvió la RIF (DMSO) presenta una acumulación lipídica mínima. El control positivo (Ácido Palmítico 300 μM) muestra una acumulación de lípidos que resulta mayor que la observada con el tratamiento de RIF 10 μM .

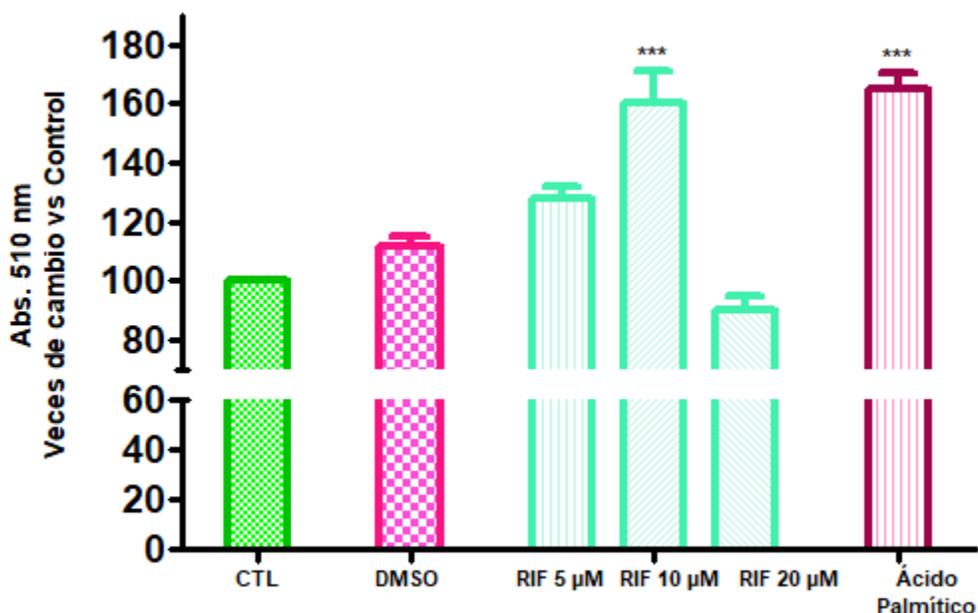


Figura 10. Cuantificación de los triglicéridos por tinción con rojo oleoso en células HepG2. En la gráfica se observa la acumulación de triglicéridos, inducida por los tratamientos descritos previamente. Se usó como control a las células HepG2 sin estímulo alguno. La acumulación de lípidos se cuantificó mediante la absorbancia de rojo oleoso a 510 nm. Los datos representan la media de al menos cuatro experimentos independientes por triplicado (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

3.3 Tinción con rojo oleoso en células HepG2

3.3.1 Evaluación del efecto del tratamiento con metformina

Para identificar si MTF inducía acumulación lipídica en el modelo celular. Las células HepG2 fueron expuestas a diferentes concentraciones de este fármaco (**Figura 11**). El resultado muestra que MTF 0.04, 0.5, 1 y 2 mM no indujeron acumulación de lípidos, lo que se observa de manera similar en el vehículo utilizado para disolver este fármaco.

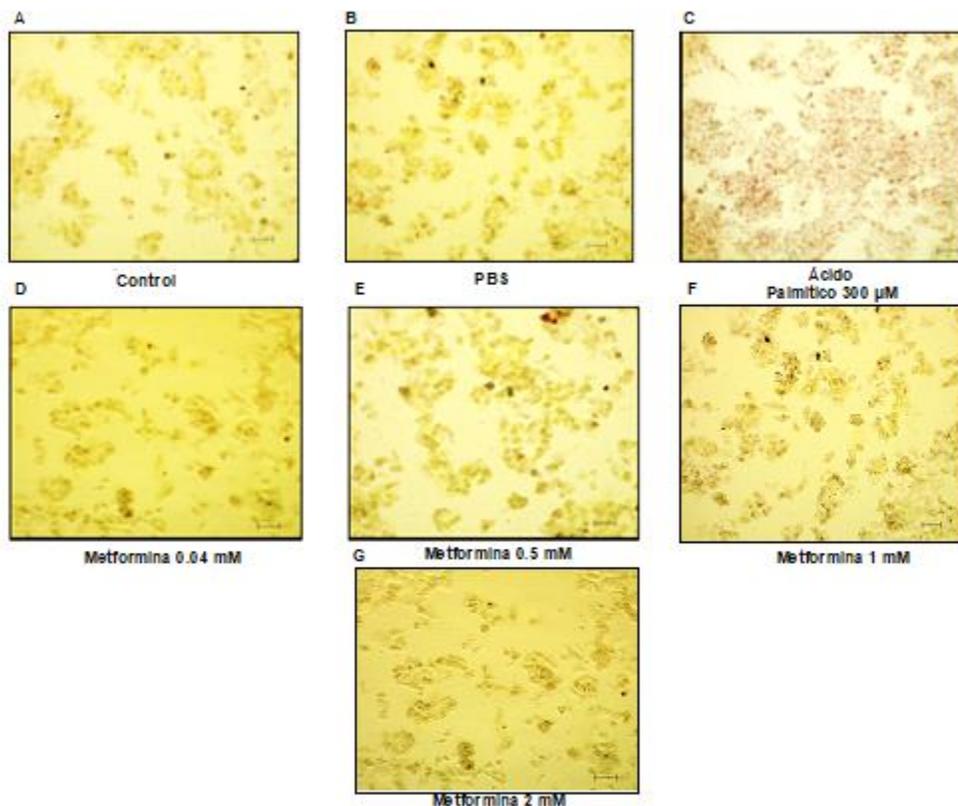


Figura 11. Imágenes de las células HepG2 teñidas con rojo oleoso. Las células HepG₂ fueron tratadas con metformina 0.04, 0.5, 1 y 2 mM. Ácido palmítico se usó como control positivo (C), como control sin tratamiento (A) y PBS (B) por 48 horas. Fotografías representativas de al menos tres experimentos independientes por triplicado tomadas de un microscopio (Olimpus Ix70) de contraste de fases a 10x.

3.3.2 Cuantificación de lípidos con tratamiento de metformina

La extracción con rojo oleoso se une específicamente a triglicéridos, por lo tanto, la acumulación lipídica es proporcional a los niveles de absorbancia obtenidos de la extracción con rojo oleoso. Fisiológicamente, las células presentan homeostasis lipídica. Los tratamientos con diferentes concentraciones de MTF, no indujeron acumulación lipídica en las células HepG2, como se puede observar en la **Figura 12**.

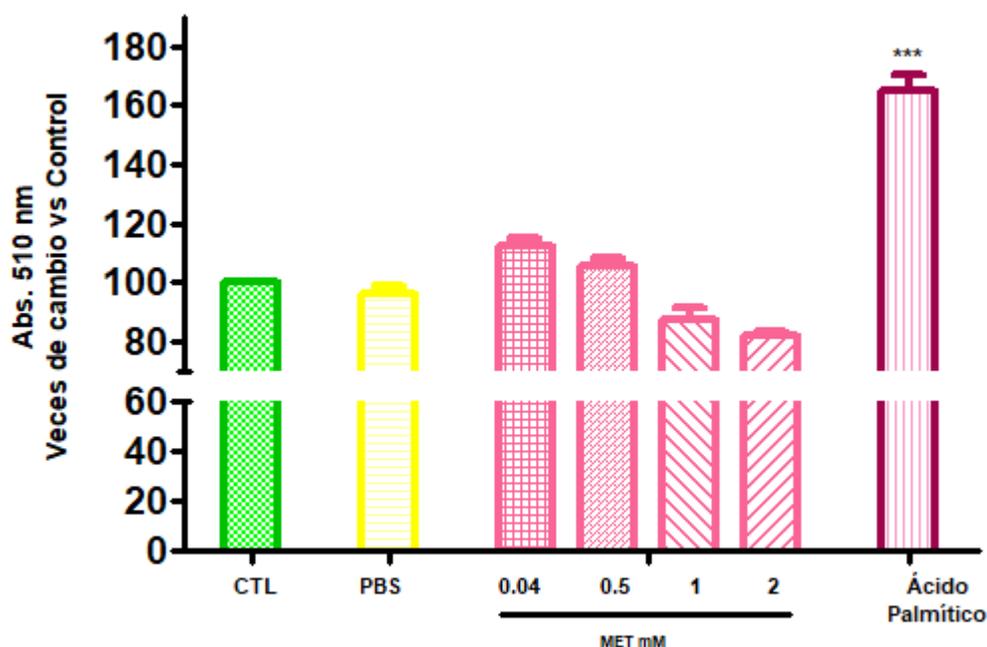


Figura 12. Cuantificación de los triglicéridos por el método de rojo oleoso en células HepG2. En la gráfica se observa la acumulación de triglicéridos, inducida por los tratamientos descritos previamente. Se usó como control a las células HepG2 sin estímulo alguno. La acumulación de lípidos se cuantificó mediante la absorbancia de rojo oleoso a 510 nm. Los datos representan la media de al menos cuatro experimentos independientes por triplicado (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

3.3.3 Evaluación del efecto de los cotratamientos con metformina y rifampicina

Como se ha observado anteriormente, RIF es un fármaco que favorece la acumulación lipídica, por otro lado, MTF disminuye dicha acumulación. Los cotratamientos con ambos fármacos, nos muestran que, a medida que la concentración de MTF aumenta, la coloración disminuye. Esto es apreciable en la **Figura 13**, particularmente en los cotratamientos 5, 10 μM de RIF con 0.04, 0.05, 1 y 2 de MTF. En el caso de RIF 20 μM , el rojo oleoso no se logra unir a los lípidos de las células posiblemente porque dicha concentración se presenta muerte celular.

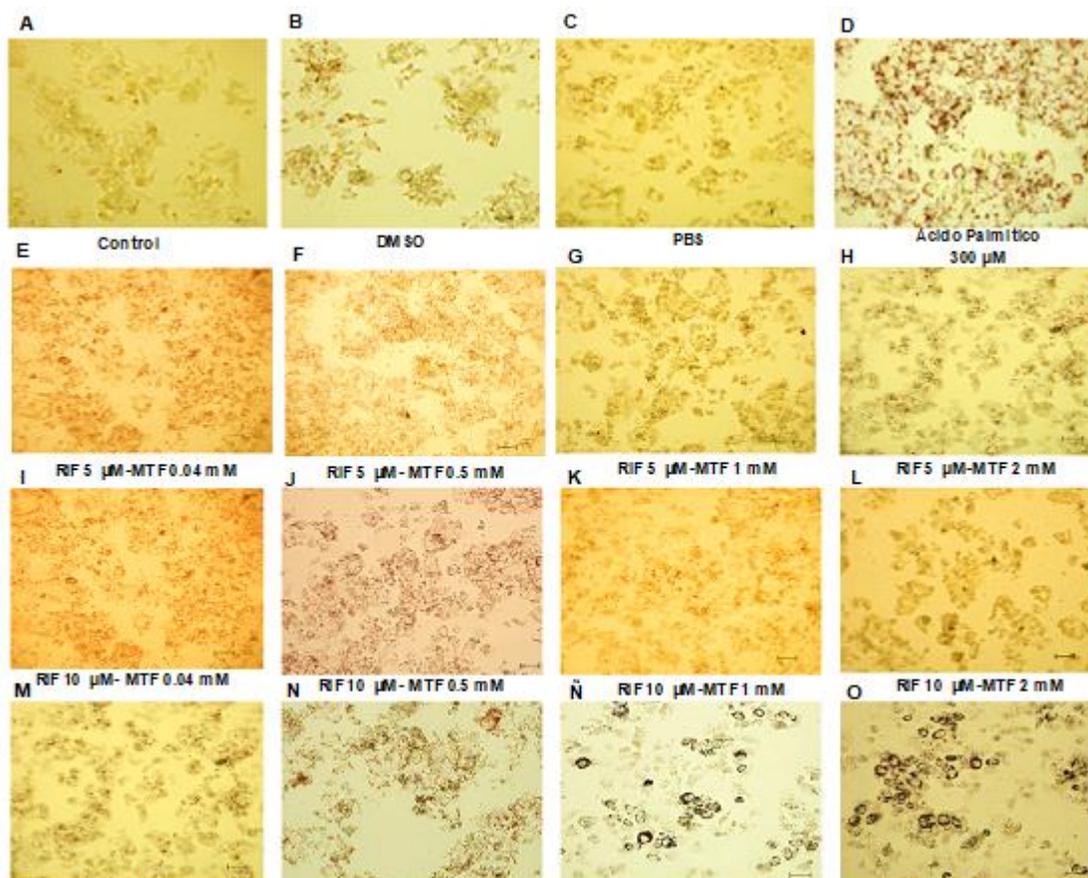


Figura 13. Imágenes de las células HepG2 cotratadas teñidas con rojo oleoso. Las células HepG2 fueron tratadas con metformina 0.04, 0.5, 1 y 2 mM. Ácido palmítico se usó como control positivo (C), como control sin tratamiento (A) y PBS (B) por 48 horas. Fotografías representativas de al menos tres experimentos independientes tomadas de un microscopio (Olimpus Ix70) de contraste de fases a 10x.

3.3.4 Cuantificación de lípidos en los cotratamientos con rifampicina y metformina

Como se ha descrito previamente, los cotratamientos RIF 5 y 10 μM - MTF 0.04, 0.5, 1 y 2 mM disminuyeron la acumulación de lípidos de manera concentración dependiente, de los cuales, las combinaciones RIF 5 μM -MTF 0.04, 0.05 y RIF 10 μM -MTF 0.04 y 0.05 resultaron estadísticamente significativos dado que la capacidad de RIF de acumular lípidos persiste. No obstante, MTF previene la acumulación de triglicéridos, en la mayoría de las condiciones en cotratamiento, exceptuando RIF 20 μM -MTF 0.04, 0.5, 1 y 2 mM (**Figura 14**).

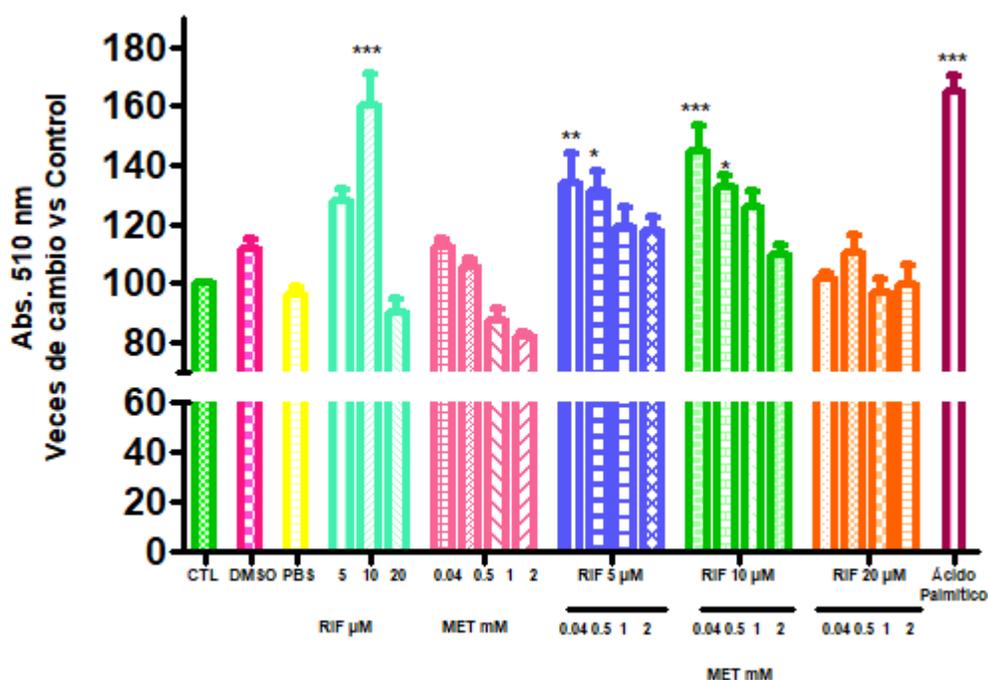


Figura 14. Cuantificación de los triglicéridos mediante la tinción con rojo oleoso en células HepG2. En la gráfica se observa la acumulación de triglicéridos, inducida por los co-tratamientos descritos previamente. Se usó como control negativo a las células HepG2 sin estímulo alguno y como control positivo ácido palmítico 300 μM . La acumulación de lípidos se cuantificó mediante la absorbancia de rojo oleoso a 510 nm. Los datos representan la media de al menos cuatro experimentos independientes por triplicado (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

3.4 Análisis de Superficie de Interacción Sinérgica

Con la finalidad de conocer el tipo de interacción que se presenta entre MTF y RIF al observar el efecto sobre la acumulación lipídica al combinar ambos fármacos. Se utilizó el modelo de SIS, el cual predijo el tipo de sinergismo que presenta el cotratamiento, ya sea de potenciación, infra-aditivo o aditivo, al igual que la mejor combinación de tratamiento para el efecto observado y deseado. Al analizar los resultados, se puede observar que la combinación que generó mayor grado de significancia o disminución en la acumulación de lípidos fue RIF 10 μ M- MTF 0.05 mM (**Tabla 8**).

Tabla 8. Concentraciones utilizadas en cotratamiento para evaluar la acumulación lipídica.

A RIF (μ M)	B MTF (mM)	ABC (A+B) Esperado	ABC (A + B) Experimental	SIS
5	0.04	239.93	134.13635	-105.79
5	0.50	233.49	131.5472	-101.95
5	1.00	215.04	119.147233	-95.89
5	2.00	209.29	117.935817	-91.36
10	0.04	271.26	144.585567	-126.67
10	0.50	264.83	132.36115	-132.46
10	1.00	246.37	125.667767	-120.70
10	2.00	240.63	109.59435	-131.03
20	0.04	202.37	101.205145	-101.16
20	0.50	195.93	110.513258	-85.42
20	1.00	177.48	96.47125	-81.01
20	2.00	171.74	99.7056817	-72.03

El efecto de acumulación lipídica durante las 48 h de tratamiento en las células HepG2 fue obtenido a través del ABC de RIF, MTF y en cotratamiento por la regla de trapezoide. Los valores de ABC obtenidos del efecto de acumulación lipídica se compararon con el valor esperado usando la prueba *t* de Student. Los valores de ABC obtenidos por RIF y MTF (analizado por separado) fueron comparados con el ABC obtenido de la combinación correspondiente a través del análisis de varianza (ANOVA) y la prueba *posthoc* de Dunnet.

La interacción entre MTF y RIF fue evaluada a través de ANOVA de dos vías, (Figura 15) con un límite de confianza de 95% y un valor de $P < 0.05$ considerado estadísticamente significativo (*).

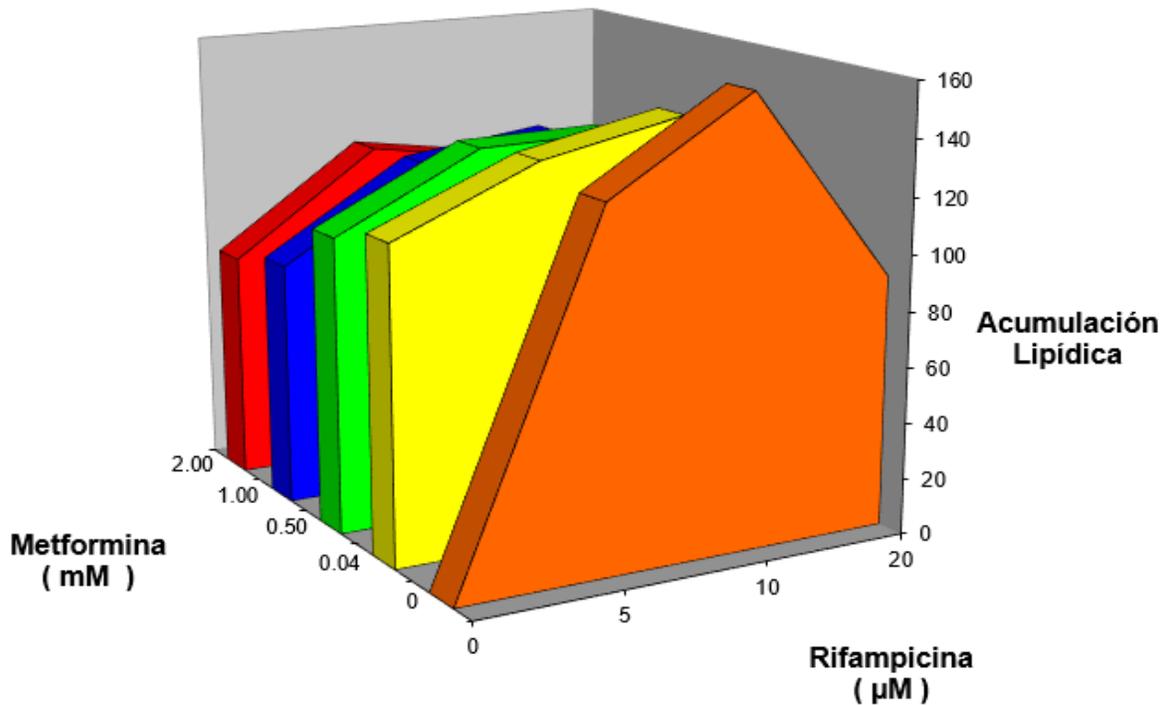


Figura 15. Efecto de la acumulación lipídica obtenida de Rifampicina y Metformina por separado y en combinación. El eje de la ordenada (Y) representa el área bajo la curva durante el tiempo de tratamiento; el eje de las abscisas (X) corresponde a la concentración de Metformina (mM) administrada simultáneamente con Rifampicina; y el eje de las Z corresponde a la concentración de Rifampicina (µM) utilizada para obtener las curvas concentración- respuesta. Cada punto representa la media de 6 experimentos por triplicado ($p \leq 0.0001$).

Además de proporcionarnos una estimación del mejor efecto a estudiar y un enfoque a la administración individual y al coadministrarse, así como la mejor o en su caso la combinación menos deseada para el efecto observado, el modelo de SIS, nos permitió conocer el tipo de sinergismo que ocurre entre los medicamentos. Lo que hace de este análisis, un modelo óptimo para la evaluación farmacológica.

La interacción entre RIF y MTF es positiva en cuanto a la reducción de lípidos en la mayoría de las combinaciones. Sin embargo, es difícil discernir cuales combinaciones producen efectos aditivos, de potenciación o de antagonismo en la **Figura 15**. Por esta razón, el modelo construye otro gráfico con el mismo eje de la **Figura 15**. El nuevo gráfico, **Figura 16**, se calcula a partir del efecto de acumulación de lípidos total producido por los cotratamientos después de haber restado el efecto de acumulación lipídica por cada fármaco de manera individual. La **Figura 16**, fue producida a partir de dichas consideraciones algebraicas. En consecuencia, los resultados sobre el nivel "0" son considerados como efecto de potenciación, mientras que aquellos en el nivel "0" son considerados como efecto de suma y, por último, aquellos resultados debajo del nivel "0" son considerados como efectos de antagonismo.

Con un límite de confianza del 99.9 % ($p < 0.001$), las 12 combinaciones presentaron efectos infra-aditivos, considerados en el modelo como antagonismo. Pese a ello, y la información bibliográfica que respalda a cada fármaco y la definición de lo que es un efecto antagónico, RIF y MTF no comparten o compiten por receptores comunes. El posible mecanismo por el cual MTF disminuye los niveles de lípidos en HepG2, será explicado posteriormente.

Las combinaciones que mostraron alto grado de significancia, es decir, disminución de la acumulación lipídica fueron RIF 10 μ M- MTF 0.05, RIF 10 μ M- MTF 2 mM, RIF 10 μ M- MTF 0.04 mM, RIF 10 μ M- MTF 1 mM respectivamente. La **Figura 16** es útil para obtener la SIS para el cotratamiento RIF-MTF, como se muestra en la **Figura 17**. Para obtener la SIS de las combinaciones RIF-MTF, todos los puntos de la interacción de la **Figura 16** se unieron en un plano. El resultado es la SIS característica y exclusiva de dichos fármacos (**Figura 17**), el gráfico presenta el mismo eje que la figura 16, por lo tanto, las concentraciones que producen los efectos infraaditivos cuando se administran conjuntamente se pueden determinar fácilmente.

Las 12 combinaciones mostraron efectos infraaditivos, de las cuales 4 combinaciones mostraron altos grados del efecto reductor de lípidos (**Figura 17**).

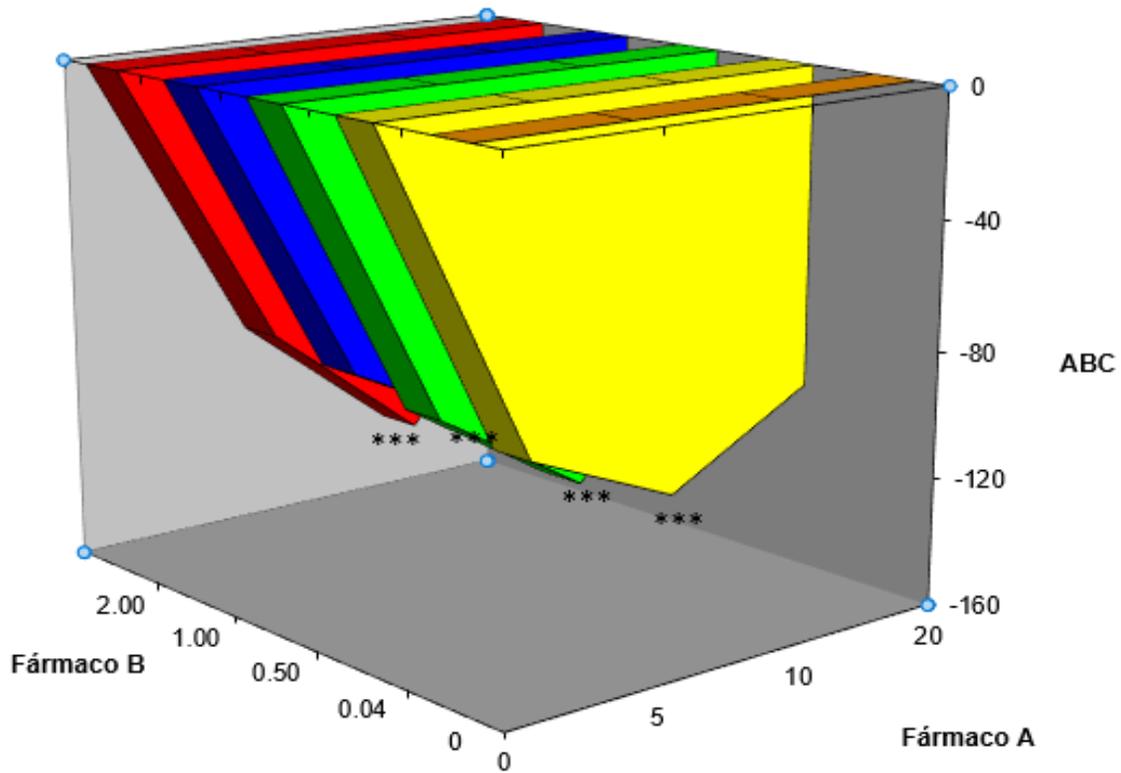


Figura 16. El efecto de acumulación lipídica producido por diferentes concentraciones y combinaciones de Rifampicina y Metformina. En este gráfico los ejes son los mismos que en la figura 14. Las 12 combinaciones corresponden a un efecto infra-aditivo con una $p \leq 0.001$. Las combinaciones que producen alto nivel de infraadición son Rifampicina 10 μM -Metformina 0.05, Rifampicina 10 μM -Metformina 2 mM, Rifampicina 10 μM -Metformina 0.04 mM, Rifampicina 10 μM -Metformina 1 mM. Cada interacción es representada por la media de 3 experimentos realizados por triplicado con un nivel de significancia de $p^{***} \leq 0.001$.

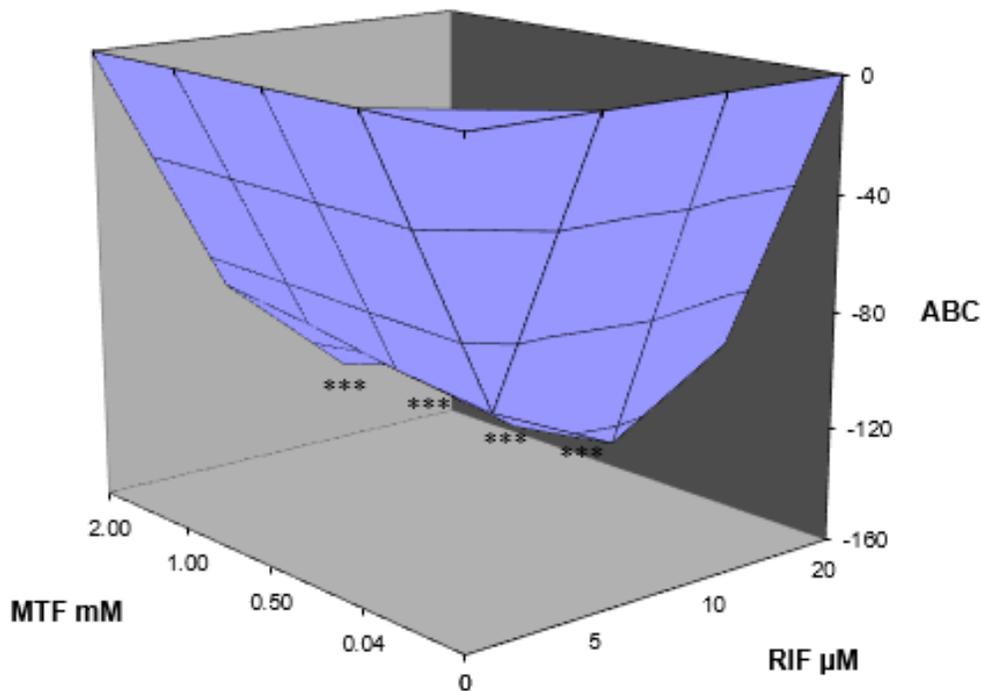


Figura 17. Determinación de la superficie de interacción sinérgica (SIS) del cotratamiento Rifampicina-Metformina. Todos los puntos de la figura 15 fueron unidos en el plano. En este gráfico los ejes de la figura 15 son los mismos. Las 12 combinaciones muestran diferentes grados de efecto

Integrando los resultados obtenidos con anterioridad y los proporcionados por el modelo de SIS. El cotratamiento RIF-MTF disminuye la acumulación de lípidos en la mayoría de las combinaciones. RIF 20 μM con las diferentes concentraciones de MTF; 0.04, 0.5, 1 y 2 mM es evaluado para la construcción de las curvas concentración respuesta y así calcular el ABC. Sin embargo, como lo arroja el modelo y los resultados anteriores, el efecto del cotratamiento RIF 20 μM -MTF 0.04, 0.5, 1 y 2 mM, este no es confiable. Puesto que, a la concentración utilizada, la línea celular HepG2 presenta muerte celular, por lo tanto, el efecto de disminución de lípidos de MTF no se aprecia de forma clara.

Teniendo en cuenta que el efecto esperado en la hipótesis de este proyecto era la acumulación lipídica al cotratarse con estos fármacos, el modelo de SIS (López- Muñoz *et al.*, 2007) nos muestra el efecto esperado, así como un análisis individual de cada

combinación (Apéndice III). Dando como resultado que la combinación que generó la menor acumulación lipídica fue RIF 10 μ M-MTF 0.05 mM (**Figura 18**).

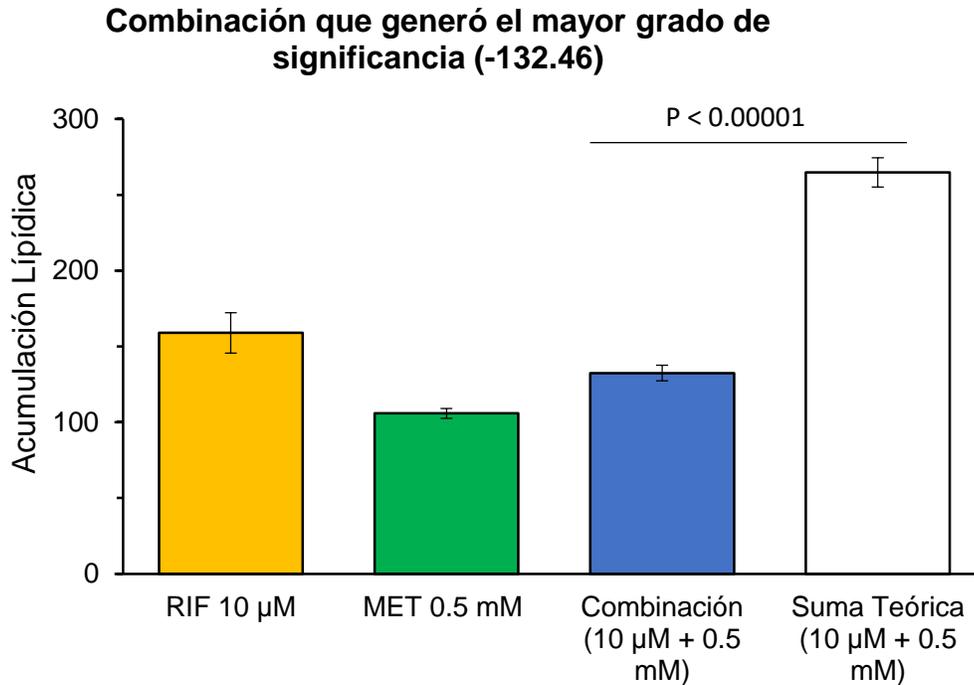


Figura 18. Cotratamiento Rifampicina 10 μ M- Metformina 5 mM. El grafico muestra el efecto en forma individual y en cotratamiento, la combinación experimental y la suma teórica. Los datos representan la media de al menos 3 experimentos independientes por triplicado.

Los efectos por separado de RIF 10 μ M y MTF 0.5 mM son apreciados en la **Figura 18**, donde se muestra que RIF en comparación de MTF aumenta significativamente la acumulación lipídica. La suma teórica (el efecto pronosticado) en comparación a lo obtenido experimentalmente (Combinación) nos refleja que el cotratamiento utilizando estos fármacos resulta en un efecto benéfico en la disminución lipídica en las células HepG2 (reducción del 50%), incluso, comparándolo con la acumulación lipídica que presenta RIF, donde efectivamente MTF previene la acumulación de lípidos en las células HepG2.

3.5 Integración de resultados

Los resultados obtenidos con anterioridad (viabilidad, tinción, cuantificación y SIS) nos muestran que MTF previene la acumulación de lípidos provocada por RIF en la línea celular HepG2. Como se ha reportado recientemente y en los resultados obtenidos RIF induce acumulación de lípidos y MTF disminuye dicho efecto. Los mecanismos por los cuales ambos fármacos presentan este efecto son desconocidos. No obstante, en la **Figura 19**, se propone un posible mecanismo por el cual dicho cotratamiento ejerce su efecto.

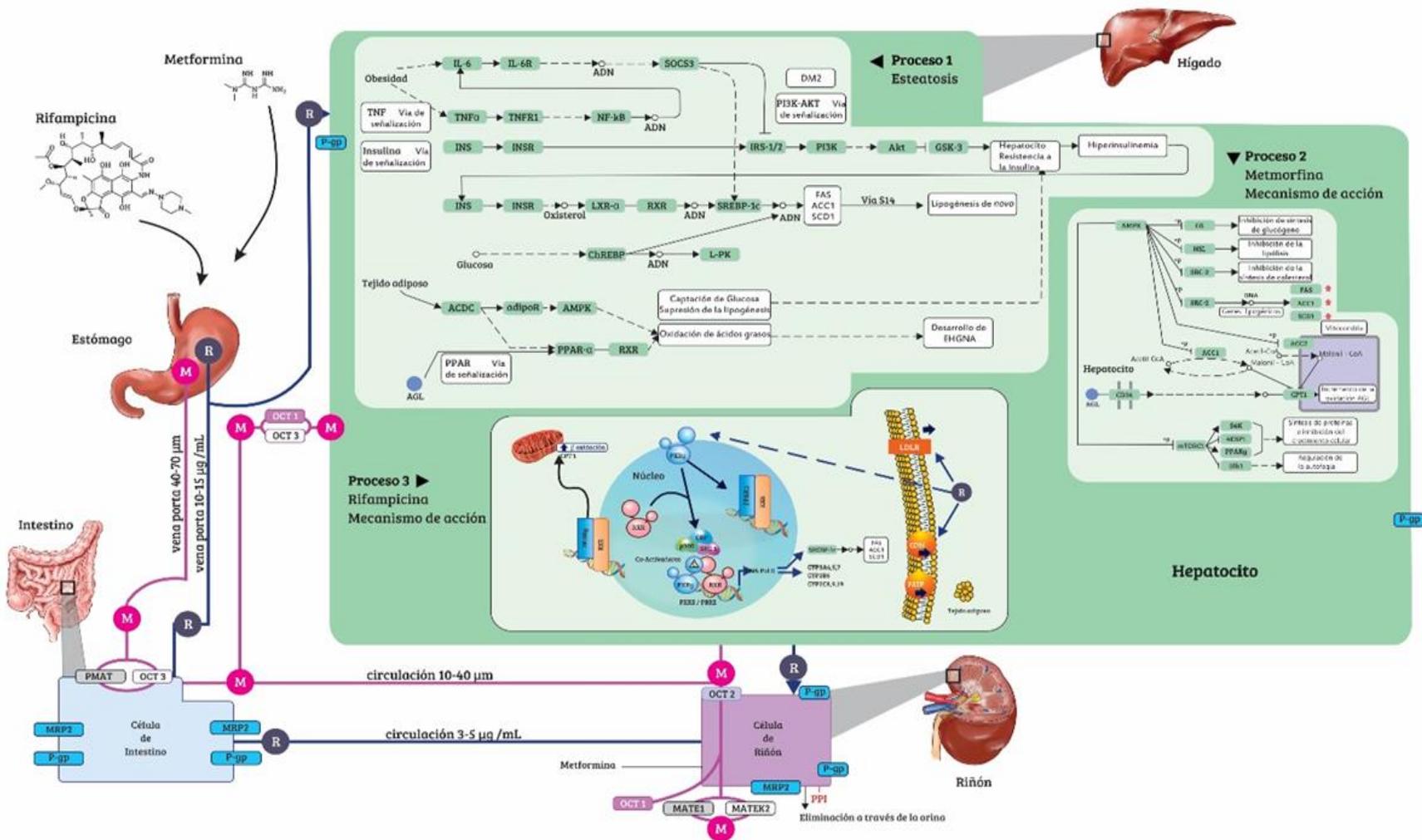


Figura 19. Mecanismo de inducción y disminución de esteatosis hepática de Rifampicina y/o Metformina. El proceso 1 se describe lo que ocurre en una condición de esteatosis hepática humana. El proceso 2 es el posible mecanismo por el cual Metformina ejerce su función y finalmente el proceso 3 es por el cual Rifampicina acumula lípidos en las células HepG2.

4. DISCUSIÓN

En condiciones hacinadas es muy común que se detecten individuos con padecimientos concurrentes como lo es el caso de la DM y TB, siendo este último particular en poblaciones marginadas. Frecuentemente, cada padecimiento es tratado de forma individual, lo que provoca que se realicen administraciones conjuntas de diversos medicamentos, por ejemplo, con MTF (un hipoglucemiante) y RIF (un antibiótico). En el presente proyecto se observó que la coadministración MTF y RIF interactúan en el metabolismo de lípidos, mostrando que la administración de MTF previene la acumulación de lípidos generada por RIF en las células HepG2.

4.1 Evaluación del efecto del cotratamiento rifampicina y metformina sobre la viabilidad celular

Las concentraciones de RIF 5, 10 y 20 μM y en cotratamiento RIF 5 μM - MTF 0.04 mM; RIF 10 μM -MTF 0.04, 0.5 mM; RIF 20 μM -MTF 0.04, 0.5, 1, 2 mM probadas en este estudio afectaron la viabilidad de las células HepG2. El efecto tóxico de la RIF fue evidente a partir de la concentración 5 μM (4.10 $\mu\text{g/mL}$) y aumento en concentración de manera dependiente. Se ha reportado que las concentraciones plasmáticas máximas de RIF encontradas en humanos oscilan entre 7-10 $\mu\text{g/mL}$ (Isefuku et al., 2001), mismas que se asemejan a la concentración de RIF 10 μM (8.23 $\mu\text{g/mL}$) en los experimentos aquí descritos.

Una posible explicación de la toxicidad de este fármaco puede ser debido a su gran capacidad inductora del CYP 450, en particular de CYP2E1, el cual regula la producción de agentes hepatotóxicos (Walubo et al., 2005). La capacidad de CYP2E1 para producir radicales libres independientes de ligando explicaría el daño celular causado, la peroxidación lipídica y el rompimiento de la cadena de DNA (Caro et al., 2004).

Se ha descrito que la RIF 0.1 mM a 5 mM reduce los niveles de ATP en células HepG2 lo que se ve reflejado en una inhibición significativa en las actividades de complejo mitocondrial I y II que son cruciales para la respiración celular y la generación de ATP. De hecho, una alteración o inhibición del complejo mitocondrial I aumenta la producción de ROS, que pueden causar daño celular (lípidos, proteínas, ADN) (Elmorsy et al., 2017)

En cuanto a MTF, las concentraciones 0.04, 0.5, 1 y 2 mM utilizadas en este estudio no afectaron la viabilidad celular. La concentración de MTF 0.04 es similar a la registrada en

la vena porta (40-70 μM) por la cual, la MTF es transportada al hígado (Ling et al., 2015). Después de la captación hepática, la concentración plasmática de MTF se reduce a 10-40 μM en animales y en humanos (Wilcock et al., 1994). Esta concentración es poco utilizada en estudios *in vitro* ya que se necesita al menos 500 μM de MTF para suprimir la gluconeogénesis hepática en un 50%, el cual es el principal mecanismo de acción propuesto para este medicamento (Forentz et al., 2010). No obstante, Cao et al., 2014 realizaron estudios donde han observado que concentraciones bajas de MTF son capaces de suprimir la liberación de glucosa en hepatocitos primarios, sin que la actividad del complejo I mitocondrial se inhibiera.

Como se puede apreciar, las concentraciones 1 y 2 mM de MTF no presenta toxicidad significativa en estas células. Sin embargo, estas concentraciones son supra-farmacológicas, es decir de 10 a 100 veces más altas que las concentraciones terapéuticas alcanzables que se encuentran en pacientes con DM2. Diversos estudios en modelos *in vitro* mencionan el uso de estas concentraciones debido a que el principal mecanismo de acción de la MTF se basa en la supresión de glucosa hepática lo que sugiere una inhibición del complejo I de la cadena mitocondrial (Ling et al., 2015). El uso de concentraciones altas de este fármaco (2 mM) ha sido reportado en múltiples estudios (Forentz et al., 2010; Madiraju et al., 2014; Zhou et al., 2001). Particularmente a esta concentración (2 mM) se observa una inhibición significativa de la actividad del complejo I (Maridaju et al., 2014). Algunos estudios han reportado que a concentraciones ≥ 5 mM de MTF se observan efectos proapoptóticos (Chen et al., 2013). Yi et al., 2013 reporta que a una concentración de 1 mM fue suficiente para alterar la proliferación de las células HepG2 sin aparente inducción de apoptosis.

Dado a que las concentraciones utilizadas en la mayoría de los estudios *in vitro*, son supra-farmacológicas e inalcanzables en la vena porta (> 80 μM) (Ling et al., 2015) pueden ser clínicamente irrelevantes y podrían ser quizás tóxicas.

La combinación RIF 5 μM -MTF 0.04 mM; RIF 10 μM - MTF 0.04 y 0.5 mM; RIF 20 μM -MTF 0.04, 0.5, 1, 2 mM presentan toxicidad significativa debido a la toxicidad observada por la RIF, es decir, MTF, no logra contrarrestar la toxicidad de RIF.

Los cotratamientos con RIF 5 μM -MTF 0.5, 1 y 2 mM; RIF 10 μM -MTF 1 y 2 mM, muestran recuperación en la viabilidad celular de manera concentración dependiente posiblemente MTF actué disminuyendo la toxicidad del otro compuesto.

El principal efecto clínico de la MTF, es decir, la disminución de la glucosa y los lípidos séricos se debe a la gluconeogénesis hepática, la glucogenólisis y la absorción intestinal de la glucosa (Witters et al., 2001). El mecanismo principal de esta acción depende en gran medida de la activación de AMPK, el cual es fundamental para el metabolismo energético encargado del desarrollo de diversos procesos fisiológicos. Estudios recientes señalan que MTF induce la autofagia a través de la activación de PRKA el cual es un sensor celular de estrés y energía y su actividad aumenta con la privación de la glucosa (Song *et al.*, 2014). Al igual que Mashhadian et al., 2013, se observa en nuestros experimentos que DMSO no redujo la cantidad de células y no fue tóxico debido a ello se tomó como control negativo.

4.2 Inducción de la esteatosis hepática en las células HepG2

Retomando uno de los objetivos propuestos en este proyecto, el cual consistió en desarrollar un modelo de acumulación lipídica en la línea celular HepG2, observamos que el modelo propuesto para el desarrollo de esteatosis fue el adecuado, ya que bajo las condiciones de RIF 5, 10 Y 20 μM y ácido palmítico 300 μM , se puede observar una acumulación lipídica exitosa. Posteriormente, para evaluar la acumulación lipídica en el modelo, se realizó la tinción con el colorante rojo oleoso, técnica reportada previamente en otros modelos de esteatosis tanto *in vivo* como *in vitro* (Richi *et al.*, 2009; Janokar *et al.*, 2009; Cui *et al.*, 2010).

Diversos artículos han demostrado que RIF induce acumulación de lípidos a través de la regulación de diversos genes implicados en la absorción de lípidos hepáticos y lipogénesis, como lo son la acetil coenzima A carboxilasa (ACC), la ácido graso sintetasa (FAS), esteroil coenzima A desaturasa 1 (SCD-1), la elongasa de ácido graso libre de cadena larga (FAE). Dichos genes son regulados por el factor de transcripción de proteína de unión al elemento de esteroides-1c (SREBP1c), factor encargado de regular la expresión de enzimas lipogénicas y la síntesis de TG (Jeon *et al.*, 2013). Se creía que RIF regulaba la expresión de SREBP1c a través de la activación de LXR- α , receptor nuclear encargado de regular transcripcionalmente a SREBP1c y también de modular directamente genes para la síntesis de ácidos grasos (Reppa *et al.*, 2000). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que RIF regula los genes claves para la síntesis de ácidos grasos y la lipogénesis de manera independiente de SREBP1c.

De acuerdo con reportes *in vitro*, el receptor nuclear X pregnano (PXR) cuya función es regular el metabolismo y la eliminación de fármacos posee un papel fundamental en la expresión de FAS y la promoción de la lipogénesis de novo a través de la activación de la

vía no clásica S14 en hepatocitos humanos (Moreau *et al.*, 2009). Estudios han demostrado que PXR es rápidamente activada en ratones tratados con RIF (Huang *et al.*, 2016).

Tomando en cuenta lo descrito anteriormente RIF activa a PXR, hecho comprobado en células HepG2 donde se observa que la activación de PXR en el modelo celular induce una acumulación lipídica a través de la regulación positiva de diversos genes implicados en la lipogénesis hepática como lo son SCD-1, FAS, FATP, LDLR, CD36, este último siendo un receptor *scavenger* de membrana encargado de la absorción de ácidos grasos de la circulación al hígado (Zhang *et al.*, 2013). Posiblemente, la activación de PXR por RIF sea un mecanismo probable de la acumulación de lípidos por dicho fármaco.

No obstante, existen estudios relacionados con los factores proliferadores de peroxisomas (PPARs) que cumplen distintos roles en el metabolismo lipídico hepático. PPAR α que estimula la β -oxidación de ácidos grasos y PPAR γ , un regulador clave en la diferenciación de adipocitos y promotor de la absorción lipídica. Siendo este último un factor activado por RIF a través de la regulación positiva de CD36, gen que se encuentra cascada abajo de PPAR γ (Huang *et al.*, 2016). Por lo tanto, de acuerdo a los antecedentes discutidos se sugiere que la capacidad de RIF de inducir acumulación lipídica puede estar dada por la expresión al alza de genes implicados en la lipogénesis a través de la activación del receptor nuclear PXR, o bien, por una mayor absorción de ácidos grasos de la circulación al hígado atribuible en parte a la regulación a la alza por RIF a el factor PPAR γ y sus genes blanco (**Figura 19; proceso 3**).

En cuanto, el tratamiento con ácido palmítico 300 μ M, otros modelos que usan la línea celular HepG2 observan resultados similares con el modelo desarrollado en este proyecto (Richi *et al.*, 2011).

Pese a que tanto los tratamientos con RIF y ácido palmítico resultaron eficientes en la promoción de la acumulación de lípidos en los hepatocitos, el efecto fue más evidente en las células tratadas con ácido palmítico, que cuando se compara con aquellas tratadas con RIF. Lo anterior sugiere que el primero promueve el desarrollo de esteatosis en un intervalo de tiempo menor de exposición y con diferentes mecanismos.

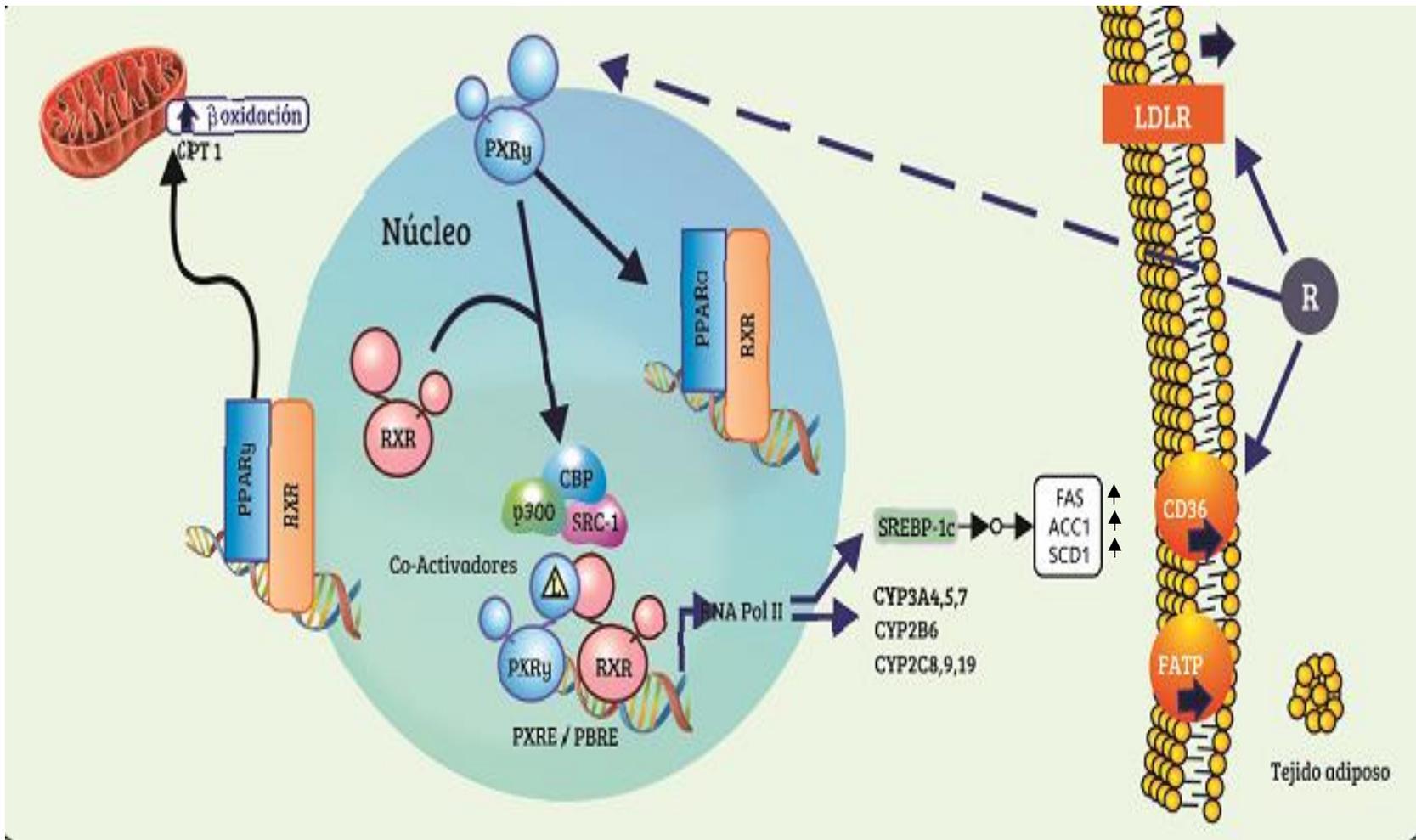


Figura 20; proceso 3. Propuesta de mecanismo de inducción de esteatosis por Rifampicina en las células HepG2

4.3 Evaluación del efecto del tratamiento con metformina

Como se ha descrito anteriormente, MTF posee un efecto de reducción lipídica en las células, que se hace evidente cuando aumenta la concentración de este fármaco. Posiblemente este efecto este dado por la interrupción mediada por MTF en los procesos oxidativos mitocondriales, lo cual reduce la tasa de ATP/AMP que posteriormente activa a AMPK (proteína quinasa activada), una importante proteína sensora de los niveles de energía celulares, que es responsable del metabolismo de lípidos y glucosa (Owen *et al.*, 2000).

La activación de la proteína cinasa (AMPK) en el hígado, estimula vías catabólicas produciendo ATP y estimulando la β -oxidación de los ácidos grasos, así mismo inhibe procesos de consumo de ATP como la lipogénesis fosforilando proteínas reguladoras o indirectamente afectando los genes de expresión en esas vías, como lo es la disminución de la actividad de acetil CoA que disminuye los niveles de transcripción de SREBP1c y sus genes diana incluyendo las enzimas ácido graso sintetasa (FAS), acetil coenzima carboxilasa (ACC) y esteroil coenzima A desaturasa (SCD-1) (Tarn *et al.*, 2015). Otro estudio refiere, la capacidad de la MTF de inhibir el esteroide receptor coactivador 2 (SRC-2) a través de la inhibición de SREBP1c y el camino AMPK pleiotrópico. El receptor SRC-2 es responsable a nivel transcripcional de contribuir al desarrollo de la obesidad, la resistencia a la insulina, la acumulación de grasa, la gluconeogénesis hepática y la biosíntesis de lípidos y colesterol (Madsen *et al.*, 2015). Jeon y colaboradores en el 2006 realizaron un estudio de perfiles de microarreglos con ratones *knock-out* de SRC-2 donde se revelo la expresión reducida de SREBP1c y varias enzimas metabólicas claves involucradas en la gluconeogénesis (G6PC), lipogénesis (FAS, ELOV16) y la síntesis de colesterol (HMGCR, HMGCS1, NSDHL, CYP51). El camino AMPK pleiotrópico regula el balance energético celular modulando el metabolismo a través de la inhibición de la actividad de mTORC1 y sus genes blanco como lo son proteína ribosomal s6 quinasa (S6K), factorE proteína de unión 1 (4EBP1), receptor proliferador de peroxisomas (PPAR γ) responsables de la síntesis de proteínas e inhibición de crecimiento celular (Larsson *et al.*, 2012).

Tomando en cuenta los estudios previos, la capacidad de la MTF de disminuir la acumulación lipídica se debe principalmente a la activación de AMPK (**Figura 21**), el cual es el principal mecanismo de acción propuesto para este fármaco, lo que justifica las concentraciones utilizadas en este proyecto que van desde 0.04 a 2 mM, esta última

empleada en modelos *in vitro* para la inhibición del complejo mitocondrial I (Maridaju et al., 2014).

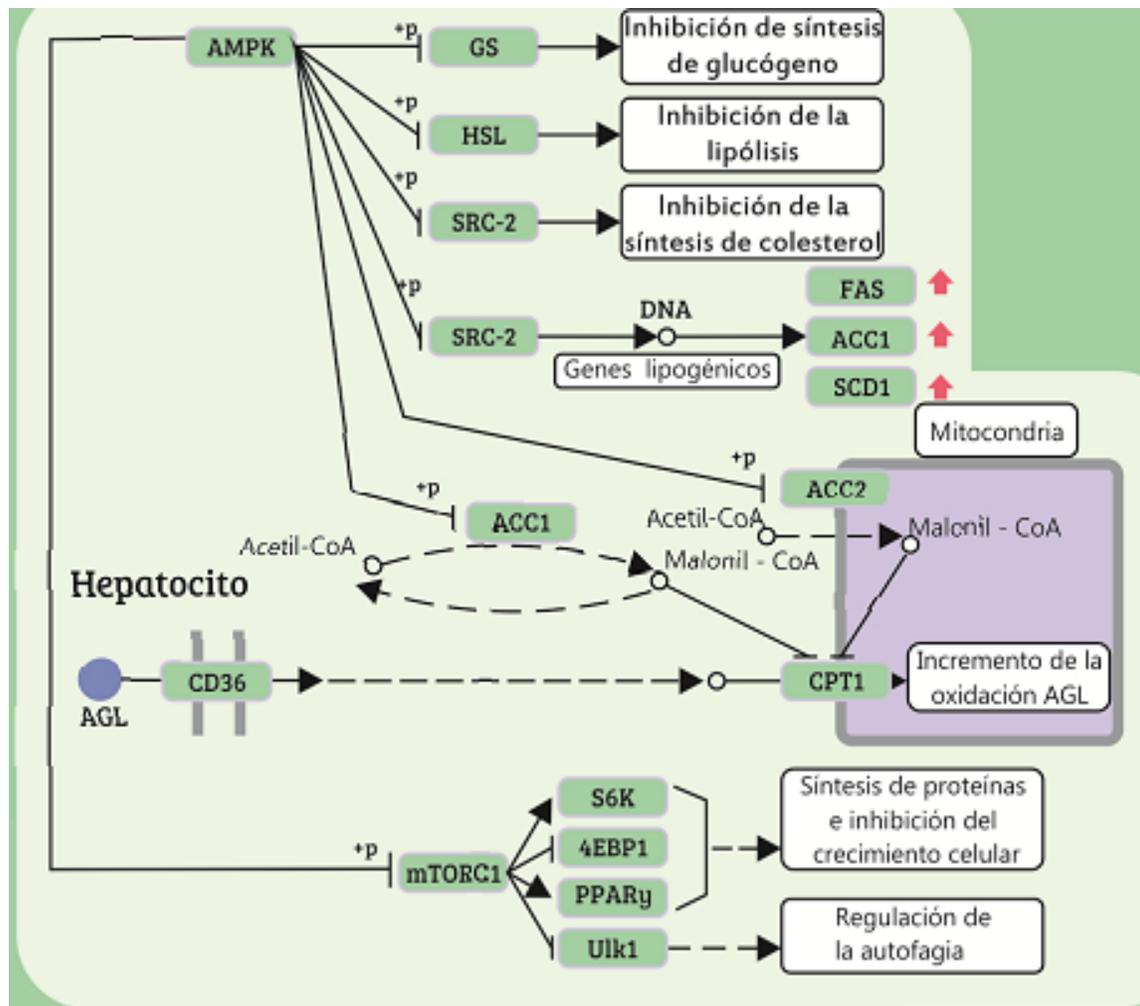


Figura 21; proceso 2. Propuesta de mecanismo de disminución lipídica por metformina en células HepG2

4.4 Evaluación del efecto de los cotratamientos con metformina y rifampicina

Tomando en cuenta lo discutido anteriormente y acorde a el efecto observado en los cotratamientos RIF 5 y 10 μ M; MTF 0.04, 0.5, 1 y 2 mM en la línea celular HepG2, la capacidad de RIF para inducir acumulación lipídica y la de la MTF para prevenirla, se proponen la activación e inactivación de diversos genes implicados en la síntesis de TG, en la síntesis de colesterol, en la lipogénesis, en la lipogénesis *de novo* como se muestra en la siguiente tabla (**Tabla 9**).

Tabla 9. Genes involucrados en la acumulación lipídica

RIF	GEN	MTF
↑	SREBP1c	↓
↑	ACC	↓
↑	FAS	↓
↑	SCD-1	↓
↑	FATP	
↑	CD36	↓
↑	PPAR γ	
↑	CPT-1	
	SRC-2	↓
	HMGCR	↓
	HMGCS1	↓
↑	HMGCS2	
↑	LCAT	↓
	G6Pc	↓
	ChREBP	↓

↑ Regulación transcripcional positiva de los genes

↓ Regulación transcripcional negativa de los genes

La esteatosis hepática es referida como un exceso en la acumulación de lípidos, principalmente de TG, que son el sello distintivo de la EHGNA (Liu *et al.*, 2013). En un estudio realizado por Zhang y colaboradores (2013) se demostró que RIF induce la acumulación de lípidos en las células HepG2 a través de la regulación positiva de varios

genes implicados en la absorción lipídica hepática y la lipogénesis, principalmente SCD1 como blanco transcripcional de PXR. En otro estudio, la sobreexpresión de PXR y la activación en ratones transgénicos VP-hPXR causaron esteatosis hepática, resultando un efecto combinado de activación de PXR con el aumento en la absorción de ácidos grasos libres, la lipogénesis y la β - oxidación (Zhou *et al.*, 2006). Algunos estudios demuestran que la lipogénesis *de novo* contribuye en gran medida al desarrollo de esteatosis (Postic *et al.*, 2008) y teniendo como antecedentes los efectos de la RIF sobre el metabolismo de lípidos en ratones (Huang *et al.*, 2016) y la línea celular HepG2 (Zhang *et al.*, 2013), se puede inferir que RIF es un potencial candidato en el desarrollo de EHGNA o contribuir a la condición preexistente.

Por el contrario, diversos estudios *in vivo* e *in vitro* demuestran que la MTF reduce la acumulación de lípidos en los hepatocitos y mejora la EHGNA (Loomba *et al.*, 2009; Bugianesi *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2016). Este efecto es atribuido principalmente a la activación de AMPK, la cual exhibe un efecto antilipogénico a través de la supresión de la expresión hepática de las enzimas lipogénicas como ACC y FAS, lo que conduce a una disminución en la producción de malonil-CoA, la que a su vez libera el efecto inhibitorio sobre la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT1) para favorecer la oxidación de ácidos grasos. En combinación, estos efectos de la AMPK activada o fosforilada explican, en gran medida el mecanismo de la MTF para reducir la esteatosis hepática (Woo *et al.*, 2014).

Otro estudio indica que MTF disminuye la acumulación de TG en células HepG2 a través de la inhibición transcripcional de SCD1 (Zhu *et al.*, 2018). Estudios previos indican que MTF disminuye la acumulación de TG en hepatocitos a través de la inhibición de la síntesis *de novo* de TG (Rouabhia *et al.*, 2014). Madsen y colaboradores en el 2015 reportan la capacidad de la MTF de inhibir la glucosa hepatocelular, la biosíntesis de lípidos y colesterol a través de la supresión transcripcional del receptor esteroide coactivador-2 (SRC-2), que tiene como genes blancos enzimas relacionadas con la gluconeogénesis (G6P), la biosíntesis de lípidos (FAS) y colesterol (HMGCR y HMGCS1), además que se ha demostrado que SRC-2 es un coactivador de SREBP1c, factor promotor de lipogénesis (Dasgupta *et al.*, 2015). Se tiene conocimiento que MTF y la vía AMPK inhiben la actividad de mTORC1 (Viollet *et al.*, 2012) como la de SREBP1c (Zhou *et al.*, 2001) (**Figura 19**).

Consecuencia de los resultados y apoyándose en anteriores investigaciones podemos inferir que el cotratamiento RIF-MTF, pese a el efecto en la generación de lípidos de RIF

resulta seguro al ser coadministrado dado los diferentes mecanismos por los cuales MTF disminuye dicho efecto.

4.5 Análisis de Superficie de Interacción Sinérgica

Uno de los propósitos de este estudio fue analizar el efecto sobre la acumulación lipídica en las células HepG2 al ser tratadas con RIF y MTF en combinación e individualmente con el fin de determinar por medio de la SIS del cotratamiento las combinaciones más adecuadas y que tipo de interacción generaban. Una característica destacada de esta investigación fue que la SIS de la combinación RIF-MTF permitió la detección de la relación óptima que producen sobre el efecto de acumulación lipídica.

El efecto producido por el cotratamiento confirma que RIF es un fármaco con la capacidad de generar TG de manera concentración dependiente (5-10 μM), exceptuando a RIF 20 μM , dado que la concentración utilizada resultó tóxica para el modelo celular (Mashhadian *et al.*, 2013), y que MTF muestra una disminución de dicho efecto de manera concentración dependiente. Los efectos producidos por las combinaciones no variaron, es decir, las 12 combinaciones utilizadas mostraron un sinergismo de infra-adición. Sin embargo, el grado de infra-adición dependía de la concentración utilizada en la combinación (figura 17).

Las concentraciones utilizadas para analizar las combinaciones en el modelo de SIS (López- Muñoz, 1994) fueron seleccionadas de estudios *in vitro* en células HepG2, RIF 5, 10 y 20 μM (Isefuku *et al.*, 2001), MTF 0.04 (Ling *et al.*, 2015), 0.5, 1 y 2 mM (Forentz *et al.*, 2010).

En el presente proyecto no se intentó deducir el mecanismo implicado en el efecto infra-aditivo producido por la RIF y MTF; claramente se requieren experimentos adicionales para documentar y determinar tales mecanismos. El efecto antilipídico que muestra el cotratamiento RIF-MTF depende de las interacciones farmacodinámicas/farmacocinéticas globales entre los componentes, y, por lo tanto, estas interacciones pueden diferir entre los diferentes fármacos.

Finalmente, la determinación de la SIS (López- Muñoz *et al.*, 2007) representa un método innovador y muy útil que permite discernir claramente los efectos resultantes de interacción, detectando las combinaciones que generan efectos de antagonismo, la adición o la potenciación de los fármacos.

En resumen, en este trabajo se observó que a pesar de que el tratamiento con RIF induce un efecto de acumulación lipídica, la combinación con MTF lo disminuye. Los efectos observados por el tratamiento con RIF están principalmente relacionados con el aumento en la captación de ácidos grasos a la célula y a la regulación positiva de diversos genes implicados en la lipogénesis, mientras que el efecto de las concentraciones utilizadas de MTF está relacionado con mecanismos de activación de vías que desencadenan la inhibición de la síntesis de novo de TG y la biosíntesis de lípidos y colesterol. Los mecanismos por los cuales ocurren dichos procesos aún no han sido dilucidados por completo. No obstante, la construcción de la ruta metabólica a través del KEGG, nos permite visualizar lo que probablemente este ocurriendo en los hepatocitos durante la combinación de los fármacos estudiados. Los resultados obtenidos con el análisis de SIS confirmaron que la interacción entre RIF y MTF produce una disminución lipídica en la línea celular HepG2 que puede ser segura al coadministrarse dependiendo de la relación de fármaco administrada.

5. CONCLUSIONES

-La RIF a las diferentes concentraciones utilizadas en este proyecto afectan la viabilidad celular de manera significativa. Por el contrario, la MTF no lo hace, incluso se observa en los cotratamientos una recuperación de dicho efecto.

-Los tratamientos con RIF 5, 10 y 20 μM y ácido palmítico 300 μM promovieron el desarrollo de acumulación lipídica en las células HepG2. Ambos tratamientos son factores de riesgo para el desarrollo de esteatosis; sin embargo, el efecto es mayor con ácido palmítico.

-El tratamiento únicamente con MTF disminuye la capacidad celular de acumular lípidos en la línea HepG2 durante el periodo de tratamiento.

-Los cotratamientos RIF-MTF durante 48 h en las células HepG2 sugieren que MTF previene los efectos de acumulación lipídica causada por RIF.

-El análisis de "Superficie de Interacción Sinérgica" nos dilucidó que las 12 combinaciones en cotratamiento mostraron una interacción infra-aditiva.

-La combinación que favoreció en mayor grado la disminución lipídica fue RIF 10 μM - MTF 0.5 mM.

Finalmente, se puede concluir que el tratamiento con RIF puede constituir un buen procedimiento para desarrollar esteatosis en un modelo *in vitro* con utilidad para estudiar a la enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA) y que, MTF constituye un fármaco potencial para el tratamiento de esta patología.

6. PERSPECTIVAS

Este trabajo cumplió con los objetivos establecidos, sin embargo, se plantean algunas propuestas para el desarrollo de un trabajo continuo que refuerce los hallazgos de este trabajo. De esta manera se plantea:

- Optimizar la técnica de cuantificación de lípidos.
- Realizar experimentos de inhibición y activación de los mecanismos por el cual MTF y RIF ejercen su efecto.
- Realizar estudios en cotratamiento analizando los principales genes involucrados en los diferentes mecanismos de acción reportados por la bibliografía.
- Confirmar los hallazgos reportados en este estudio en cultivo primario de hepatocitos y posteriormente en modelos animales.

7. REFERENCIAS

1. ADA, 2015. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*, 38 (01),pp.S8–S16.
2. Amacher D. A toxicologist's guide to biomarkers of hepatic response. *Hum Exp Toxicol*. 2002;21(5):253-62.
3. Amacher DE, Chalasani N. Drug-induced hepatic steatosis. *Semin Liver Dis*. 2014; 34: 205–214.
4. Ameer, F., Scanduzzi, L., Hasnain, S., Kalbacher, H. & Zaidi, N. De novo lipogenesis in health and disease. *Metabolism*. 2014;1:495-503.
5. Anstee QM, Targher G, Day CP. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013;10: 330–344.
6. Anstee, Q. M., Targher, G. & Day, C. P. Progression of NAFLD to diabetes mellitus, cardiovascular disease or cirrhosis. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. 2013;10, 330–44.
7. Araya J, Rodrigo R, Videla LA, Thielemann L, Orellana M, Pettinelli P, Poniachik J. Increase in long-chain polyunsaturated fatty acid in relation to hepatic steatosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)* 2004; 106:635–643.
8. Asrih M, Jornayvaz FR. Diets and nonalcoholic fatty liver disease: the good and the bad. *Clin Nutr*. 2014; 33: 186–190.
9. Atkinson, M.A. & Eisenbarth, G.S. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *The Lancet*, 2001;358(9277), pp.221–229.
10. Babich MM, Pike I, Shiffman ML. Metformin-induced acute hepatitis. *Am J Med*. 1998; 104:490–492.
11. Bailey, C.J. Potential new treatments for type 2 diabetes. *Trends in pharmacological sciences*. 2000; 21(7), pp.259–65.
12. Baliunas, D.O. et al. Alcohol as a risk factor for type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*, 2009;32(11), pp.2123–2132.
13. Bays, H., Mandarino, L. & DeFronzo, R.A. Role of the Adipocyte, Free Fatty Acids, and Ectopic Fat in Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus: Peroxisomal Proliferator-Activated Receptor Agonists Provide a Rational Therapeutic Approach. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2004;89(2), pp.463–478.
14. Benedict, M., & Zhang, X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World Journal of Hepatology*, 2017;9(16), 715–732.
15. Berger, J. & Moller, D. E. The mechanisms of action of PPARs. *Annu. Rev. Med*. 2002;53, 409–435.
16. Björnsson, E. S. Hepatotoxicity by Drugs: The Most Common Implicated Agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016: 17(2), 224.

17. Bugge, A. & Mandrup, S. Molecular Mechanisms and Genome-Wide Aspects of PPAR Subtype Specific Transactivation. *PPAR Res.* 2010; 569-578.
18. Bugianesi E, Gentilcore E, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, et al. A randomized controlled trial of metformin versus vitamin E or prescriptive diet in nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Gastroenterol.* 2005;100(5):1082–90.
19. C. Wilcock, C.J. Bailey. Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse. *Xenobiotica*,1994; pp.49-57.
20. Caro AA, Cederbaum AI. Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004; 44:27–42.
21. Cave, M. et al. Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition. *J. Nutr. Biochem.* 2007;18, 184–95.
22. Chen HP, Shieh JJ, Chang CC, Chen TT, Lin JT, et al. Metformin decreases hepatocellular carcinoma risk in a dose-dependent manner: population-based and in vitro studies. *Gut.* 2013: 606–615.
23. Chen, J. & Raymond, K. Roles of rifampicin in drug-drug interactions: underlying molecular mechanisms involving the nuclear pregnane X receptor. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*,2006;5, p.3.
24. Cho, S.K. et al. Rifampin enhances the glucose-lowering effect of metformin and increases OCT1 mRNA levels in healthy participants. *Clinical pharmacology and therapeutics*,2011;89(3), pp.416–421.
25. Cone C, Bachyrycz A, Murata G. Hepatotoxicity associated with metformin therapy in treatment of type 2 diabetes mellitus with nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Pharmacother.* 2010;44(10):1655–1659.
26. Cooper, A.M. Cell mediated immune responses in Tuberculosis. *Annu Rev Immunol*,2009; 27, pp.393–422.
27. Coppack, S.W., Jensen, M.D. & Miles, J.M. In vivo regulation of lipolysis in humans. *Journal of lipid research*, 1994; 35(2), pp.177–193.
28. Daniel, T.M. The history of tuberculosis. *Respiratory Medicine*,2006; 100(11), pp.1862–1870.
29. Dasgupta, S. et al. Coactivator SRC-2-dependent metabolic reprogramming mediates prostate cancer survival and metastasis. *J Clin Invest.* 2015;125, 1174–1188.
30. Dávila, Y., Castellanos, M. & García, M. Advancement of the national strategy for integrated care in Tuberculosis and Diabetes Mellitus in Mexico. *Avance de la estrategia nacional para la atención integrada de la tuberculosis y la diabetes mellitus en México*, 2015., 15, pp.116–119.
31. DeFronzo, R.A, From the triumvirate to the ominous octet: A new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*,2009; 58(4), pp.773–795.

32. Delgado-Sánchez, G. et al. Association of pulmonary tuberculosis and diabetes in Mexico: Analysis of the National Tuberculosis Registry 2000-2012. *PLoS ONE*,2015; 10(6), pp.1–14.
33. Desilets DJ, Shorr AF, Moran KA, Holtzmuller KC. Cholestatic jaundice associated with the use of metformin. *Am J Gastroenterol*. 2001; 96:2257–2258.
34. Deutsch M, Kountouras D, Dourakis SP. Metformin hepatotoxicity. *Ann Intern Med*. 2004;140(5), pp. 598-603.
35. Donald, P.R., Maritz, J.S. & Diacon, A.H. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of rifampicin in adults and children in relation to the dosage recommended for children. *Tuberculosis*,2011;91(3), pp.196–207.
36. Dowman, J. K., Tomlinson, J. W., & Newsome, P. N. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM: An International Journal of Medicine*. 2010; 71–83.
37. Drobniowski, F. Rapid diagnostics of tuberculosis and drug resistance in the industrialized world: clinical and public health benefits and barriers to implementation. *BMC Med*,2013; 11, p.190.
38. Falcon, A., Doege, H. & Fluit, A. FATP2 is a hepatic fatty acid transporter and peroxisomal very long-chain acyl-CoA synthetase. *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab*. 2010; 299, 384–393.
39. Ferré, P. Fofelle, F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes. Obes. Metab*. 2010;12 Suppl 2, 83– 92.
40. Fridlyand, L.E. & Philipson, L.H. Reactive species and early manifestation of insulin resistance in type 2 diabetes. *Diabetes, obesity & metabolism*,2006; 8(2), pp.136–145.
41. Ghabril, M., Chalasani, N., & Björnsson, E. Drug-induced liver injury: a clinical update. *Current Opinion in Gastroenterology*, 2010; 26(3), 222–226.
42. Gómez, L.B.A.R. and M.B . Metformin: an old but still the best treatment for type 2 diabetes. *J Intern Med* 2004,, (256), pp.1–14.
43. Gomez -Lechon, M. J., Donato, M. T., et al. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact* 2007; 165(2): 106-16.
44. González, R.I., Rubio, L.B. & Menéndez, S.A. Resumen de las recomendaciones de la American Diabetes Association (ADA) 2014 para la práctica clínica en el manejo de la Diabetes Mellitus. *American Diabetes Asociacion*, 2014; 05, pp.2–23.
45. Goodwin, B., Hodgson, E. & Liddle, C. The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module. *Molecular pharmacology*, 1999; 56(6), pp.1329–39.
46. Gradmann, C. Robert Koch and the white death: From tuberculosis to tuberculin. *Microbes and Infection*. 2006; 8(1), pp.294–301.
47. Grant, R.W., Moore, A.F. & Florez, J.C. Genetic architecture of type 2 diabetes: Recent progress and clinical implications. *Diabetes Care*, 2009; 32(6), pp.1107–1114.

48. H. Kang, S. Koppula Houltuynia. Attenuates lipid accumulation via activation of AMP-activated protein kinase signaling pathway in HepG2 cells. *Am. J. Chin. Med.*,42 (3) (2014), pp.651-664.
49. http://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Ch2_the_Global_Burden. (Consultado en Febrero de 2017)
50. Hu, F.B. Globalization of diabetes: The role of diet, lifestyle, and genes. *Diabetes Care*, 2011;34(6), pp.1249–1257.
51. International Diabetes Federation. *Diabetes Atlas*. ISBN-13: 978-2-930229-71-3. Four edition 2009. 2 World Health Organization. *Global Tuberculosis Control 2009*. ISBN 978 92 4 156380 2. Switzerland.
52. Isefuku S, Joyner CJ, Simpson AH. Toxic effect of rifampicin on human osteoblast-like cells. *J Orthop Res* 2001; 19: 950-954.
53. Janorkar AV, King KR, Megeed Z, Yarmush ML. Development of an in vitro cell culture model of hepatic steatosis using hepatocyte-derived reporter cells. *Biotechnology and Bioengineering*. 2009;102:1466–1474.
54. Jennen, D.G.J. et al. Comparison of HepG2 and HepaRG by whole-genome gene expression analysis for the purpose of chemical hazard identification. *Toxicological Sciences*, 2010; 115(1), pp.66–79.
55. Jeon TI, Osborne TF. SREBPs: metabolic integrators in physiology and metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2013; 23: 65–72.
56. Jeong, J. W. et al. The genomic analysis of the impact of steroid receptor coactivators ablation on hepatic metabolism. *Molecular endocrinology*. 2006: 20, 1138–1152.
57. Jun Zhang ,Yijuan Wei, Bingfang Hu,Min Huang,Wen Xie,Yonggong Zhai. Activation of Human Stearoyl-Coenzyme A Desaturase 1 Contributes to the Lipogenic Effect of PXR in HepG2 Cells. *Hepatol Res*. 2002; 23:138–144.
58. Kapur, A. & Harries, A.D. The double burden of diabetes and tuberculosis - Public health implications. *Diabetes Research and Clinical Practice*,2013;101(1), pp.10–19.
59. Kass G, Price S. Role of mitochondria in drug-induced cholestatic injury. *Clin Liver Dis*. 2008;12(1):27-51.
60. Kleiner DE, Chalasani NP, Lee WM, Fontana RJ, Bonkovsky HL, Watkins PB, Hayashi PH, Davern TJ, Navarro V, Reddy R, Talwalkar JA, Stolz A, Gu J, Barnhart H, Hoofnagle JH; Drug-Induced Liver Injury Network (DILIN). Hepatic histological findings in suspected drug-induced liver injury: systematic evaluation and clinical associations. *Hepatology* 2014; 59: 661-670.
61. Knechel, N.A. Tuberculosis: Pathophysiology, clinical features, and diagnosis. *Critical Care Nurse*, 2009; 29(2), pp.34–43.
62. Koo, S.-H. Nonalcoholic fatty liver disease: molecular mechanisms for the hepatic steatosis. *Clinical and Molecular Hepatology*, 2013;19(3), 210–215.

63. Koonen, D., Jacobs, R. & Febbraio, M. Increased hepatic CD36 expression contributes to dyslipidemia associated with diet-induced obesity. *Diabetes*. 2007; 56, 2863–2871.
64. Koppes, L.L. et al., 2005. Moderate alcohol consumption lowers the risk of type 2 diabetes: a meta-analysis of prospective observational studies. *Diabetes Care*, 28(3), pp.719–725. Krausova, L. et al., 2011. Metformin suppresses pregnane X receptor (PXR)-regulated transactivation of CYP3A4 gene. *Biochemical Pharmacology*, 82(11), pp.1771–1780. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2011.08.023>.
65. Kutoh E. Possible metformin-induced hepatotoxicity. *Am J Geriatr Pharmacother*. 2005;3(4):270–273.
66. Labbe G, Pessayre D, Fromenty B. Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies. *Fundam Clin Pharmacol*. 2008;22(4):335-53.
67. Larsson, O. et al. Distinct perturbation of the transcriptome by the antidiabetic drug metformin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012; 109: 8977–8982.
68. Lewandowski, C.M., Co-investigator, N. & Lewandowski, C.M. WHO Global tuberculosis report 2015. The effects of brief mindfulness intervention on acute pain experience: An examination of individual difference. 2015, pp.1689–1699.
69. Liane Rabinowich and Oren Shibolet. Drug Induced Steatohepatitis: An Uncommon Culprit of a Common Disease," *BioMed Research International*. 2015, 14 pp.198-205.
70. **Lin CL, Huang HC, Lin JK**. Theaflavins attenuate hepatic lipid accumulation through activating AMPK in human HepG2 cells. *J Lipid Res*. 2007 Nov;48(11):2334-43.
71. Ling He, Wondisford Frederic. Metformin Action: Concentrations Matter. *Physiology and Medicine*. *J.Clin. Invest.*, 120; 2010; pp.2355-2369.
72. Liu, C.L., Lim, Y.P. & Hu, M.L., 2012. Fucoxanthin attenuates rifampin-induced cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) and multiple drug resistance 1 (MDR1) gene expression through pregnane X receptor (PXR)-mediated pathways in human hepatoma HepG2 and colon adenocarcinoma LS174T cells. *Marine Drugs*, 10(1), pp.242–257.
73. Liu, f., Wang, c., Zhang, l., Xu, y., Jang, l., Gu. Metformin prevents hepatic steatosis by regulating the expression of adipose differentiation-related protein. *International Journal of Molecular Medicine*, 2014, 33(1), 51–58.
74. Lönnroth, K. et al. Tuberculosis control and elimination 2010-50: cure, care, and social development. *The Lancet*, 2010; 375(9728), pp.1814–1829.
75. Loomba R, Lutchman G, Kleiner DE, Ricks M, Feld JJ, Borg BB. Clinical trial: pilot study of metformin for the treatment of non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009;29(2):172–82.
76. López Muñoz F. Surface of synergistic interaction between dipyrone and morphine in the PIFIR model. *Drug Development Research*. 1994, 33(1), pp. 26-32.

77. López Muñoz F, Hernández L, Campos M, Guevara U. Co-administration of rofecoxib and tramadol results in additive or sub-additive interaction during arthritic nociception in rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 2007, 87 (1), pp. 331-340.
78. Foretz, S. Hébrard, J. Leclerc, E. Zarrinpashneh, M. Soty, G. Mithieux, K. Sakamoto, F. Andreelli, B. Viollet. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J. Clin. Invest.*, 120(2010), pp. 2355-2369.
79. Madiraju, A.K. et al. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature*, 2014; 510(7506), pp. 542–6.
80. Madiraju, D.M. Erion, Y. Rahimi, X.M. Zhang, D.T. Braddock, R.A. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature*, 510(2014), pp. 542-546.
81. Madsen A., Bozickovic O., Bjune J. Metformin inhibits hepatocellular glucose, lipid and cholesterol biosynthetic pathways by transcriptionally suppressing steroid receptor coactivator 2 (SRC-2). *Scientific Reports*. 2015; 5.
82. Magee, M.J. et al. Clinical characteristics, drug resistance, and treatment outcomes among tuberculosis patients with diabetes in Peru. *International Journal of Infectious Diseases*, 2013; 17(6), pp. e404–e412. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2012.12.029>.
83. Marais, B.J. et al., 2013. Tuberculosis comorbidity with communicable and non-communicable diseases: Integrating health services and control efforts. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(5), pp. 436–448.
84. Massart, J., Begriche, K., Moreau, C., & Fromenty, B. Role of nonalcoholic fatty liver disease as risk factor for drug-induced hepatotoxicity. *Journal of Clinical and Translational Research*; 2017: 212–232.
85. Mehta, K., Van Thiel, D. H., Shah, N. & Mobarhan, S. Nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis and the role of antioxidants. *Nutr. Rev.* 2002;60, 289–93.
86. Moreau A, Téruel C, Beylot M, Albalea V, Tamasi V, Umbdenstock T, et al. A novel pregnane X receptor and S14-mediated lipogenic pathway in human hepatocyte. *Hepatology*. 2009; 49: 2068–2079.
87. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65 (1-2): 55-63.
88. Musso, G., Gambino, R. & Cassader, M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog. Lipid Res.* 2009;48, 1–26.
89. Musso, R. Gambino, F. De Michieli. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 37 (2003), pp. 909-916.

90. Nammour F, Fayad N, Peikin S. Metformin-induced cholestatic hepatitis. *Endocr Pract.* 2003;9(4):307–309.
91. Navarro VJ, Senior JR. Drug-related hepatotoxicity. *N Engl J Med.* 2006; 354:731–739.
92. Niemi, M. et al. Effects of rifampin on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of glyburide and glipizide. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2001; 69(6), pp.400–406.
93. Nijland, H.M. et al., 2006. Exposure to rifampicin is strongly reduced in patients with tuberculosis and type 2 diabetes. *Clin Infect Dis*, 43(7), pp.848–854.
94. Nisbet J.C., Sturtevant J.M., Prins J.B. Metformin and serious adverse effects. *Med J-Aust*, 180 (2004), pp. 53-54.
95. O'Garra, A. et al., 2013. The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2013; 31:475-527.
96. Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J.* 2000; 348:607–614.
97. PA Watkins. Fatty Acids: Metabolism. *Encycl. Hum. Nutr.* 2013, 2, 220–230.
98. Pessayre D, Fromenty B, Berson A, et al. Central role of mitochondria in drug-induced liver injury. *Drug Metab Rev.* 2012;44(1):34-87.
99. Postic C, Girard J. Contribution of de novo fatty acid synthesis to hepatic steatosis and insulin resistance: lessons from genetically engineered mice. *J Clin Invest.* 2008; 118: 829–838. pmid:18317565.
100. Postic, C. & Girard, J. The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes Metab.* 2008;34, 643–8.
101. Ramachandran R, Kakar S. Histological patterns in drug-induced liver disease. *J Clin Pathol* 2009; 62: 481-492.
102. **Ramírez-Zacarías JL, Castro-Muñozledo F, Kuri-Harcuch W.** Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O. 1993:1.
103. Ricchi M, Rosaria O, Carulli L, Anzivino C, Ballestri S. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009; 24(5): 830:40.
104. Rouabhia S, Milic N, Abenavoli L. Metformin in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: safety, efficacy and mechanism. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014;8(4):343–9.
105. Sahu, S. C. *Hepatotoxicity: From Genomics to in vitro and in vivo Models.* (2007). England, UK.
106. Sanyal AJ. Technical review on nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology.* 2002; 123:1705–1725.

107. Scheen, A.J. Treatment of Type 2 Diabetes. *Acta Clinica Belgica*,2003; 58(5), pp.318–324.
108. Shaw, J.E., Sicree, R.A. & Zimmet, P.Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*,2010; 87(1), pp.4–14.
109. Shen C, Cheng X, Li D, & Meng Q. Investigation of rifampicin-induced hepatotoxicity in rat hepatocytes maintained in gel entrapment culture. *Cell Biol Toxicol.* 2009 Jun;25(3):265-74.
110. Sia, I.G. & Wieland, M.L. Current concepts in the management of tuberculosis. *Mayo Clinic proceedings*.2011; 86(4), pp.348–361.
111. Singla, R. et al., 2006. Influence of diabetes on manifestations and treatment outcome of pulmonary TB patients. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 10(1), pp.74–79.
112. Smith, B. W. & Adams, L. a. Nonalcoholic fatty liver disease and diabetes mellitus: pathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2011;7: 456–65.
113. Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical microbiology reviews*,2003; 16(3), pp.463–496.
114. Sodhi CP, Rana SV, Mehta SK, Vaiphie K, Attari S, Mehta S. Study of oxidative-stress in isoniazid-rifampicin induced hepatic injury in young rats. *Drug Chem. Toxicol.*1997; 20:255–69.
115. Song, Y. M., Lee, Y., Kim, J.-W., Ham, D.-S., Kang, E.-S., Cha, B. S., ... Lee, B.-W. Metformin alleviates hepatosteatosis by restoring SIRT1-mediated autophagy induction via an AMP-activated protein kinase-independent pathway. *Autophagy*, 2015: 11(1), 46–59.
116. Stevenson, C.R. et al., 2007. Diabetes and tuberculosis: the impact of the diabetes epidemic on tuberculosis incidence. *BMC public health*, 7, p.234.
117. Tailleux, A., Wouters, K. & Staels, B. Roles of PPARs in NAFLD: potential therapeutic targets. *Biochim. Biophys. Acta.*2012; 1821, 809.
118. Talip, B.A. et al., 2013. An Update on Global Tuberculosis (TB). *Infectious diseases*, 6, pp.39–50.
119. Tiniakos, D. G., Vos, M. B. & Brunt, E. M. Nonalcoholic fatty liver disease: pathology and pathogenesis. *Annu. Rev. Pathol.*2010; 5, 145–71.
120. Torres Delgado A. Kershenobich D. *Hepatología tópicos innovadores*. primera edición. México 2012.
121. Tostmann A, Boeree MJ, Aarnoutse RE, de Lange WC, van der Ven AJ, Dekhuijzen R. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity: concise up-to-date review. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008; 23: 192–202.

122. Tran L. Pharmacologic Treatment of type 2 Diabetes: Oral Medications. *Ann Pharmacother.* 2015 49, 540-556.
123. Vahdati-Mashhadian N, Jaafari MR, Nosrati A. Differential toxicity of rifampin on HepG2 and Hep2 cells using MTT test and electron microscope. *Pharmacologyonline.* 2007; 3:405–13.
124. Vahdati-Mashhadian, N., Jafari, M. R., Sharghi, N., & Sanati, T. Protective Effects of Vitamin C and NAC on the Toxicity of Rifampin on Hepg2Cells. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR.* (2013);12(1), 141–146.
125. Vahdati-Mashhadian, N., Jafari, M. R., Sharghi, N., & Sanati, T. (2013). Protective Effects of Vitamin C and NAC on the Toxicity of Rifampin on Hepg2Cells. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research. IJPR*,12(1), 141–146.
126. Verma S, Kaplowitz N. Hepatotoxicity of antituberculosis drugs. In, Kaplowitz N, DeLeve LD. *Drug-induced liver disease.* 3rd ed. Amsterdam: Elsevier, 2013, pp. 483-504.
127. Viollet, B. et al. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond).* 2012;122, 253–270.
128. Viollet, B., Guigas, B., Sanz Garcia, N., Leclerc, J., Foretz, M., & Andreelli, F. (2012). Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clinical Science (London, England : 1979),* 122(6), 253–270.
129. Wagner, M., Zollner, G. & Trauner, M. Nuclear receptors in liver disease. *Hepatology.* 2011; 53, 1023–34.
130. Walubo A, Coetsee C, Arti D, Du Plessis JB. The effect of isoniazid containing regimen on CYP2E1 during antituberculosis therapy. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 2005;117–118:137–15.
131. Wang, C.S. et al., 2009. Impact of type 2 diabetes on manifestations and treatment outcome of pulmonary tuberculosis. *Epidemiol Infect,* 137(2), pp.203–210.
132. Westwater JO, F. D. Liver impairment in the obese. *Gastroenterology.* 1958; 34, 686–93.
133. Willi, C. et al. Clinician ' s corner Active Smoking and the Risk of Type 2 Diabetes. , 2016; 298(22).
134. Woo, S.-L., Xu, H., Li, H., Zhao, Y., Hu, X., Zhao, J., ... Wu, C. Metformin Ameliorates Hepatic Steatosis and Inflammation without Altering Adipose Phenotype in Diet-Induced Obesity. *PLoS ONE.* 2014; 9(3),91-111.
135. World Health Organization. Informe mundial sobre la tuberculosis. 2014, http://www.who.int/tb/publications/global_report/g.
136. Xu H, Zhou Y, Liu Y, Ping J, Shou Q, Chen F, et al. Metformin improves hepatic IRS2/PI3K/Akt signaling in insulin-resistant rats of NASH and cirrhosis. *J Endocrinol.* 2016;229(2):133–44.

137. Yang, H. et al. Metformin represses drug-induced expression of CYP2B6 by modulating the constitutive androstane receptor signaling. *Molecular pharmacology*, 2014; 85(2), pp.249–60.
138. Zafrani ES. Non-alcoholic fatty liver disease: an emerging pathological spectrum. *Virchows Arch.* (2004), pp. 3-12.
139. Zhang Y, Takemori H, Wang C, Fu J. Role of salt inducible kinase 1 in high glucose-induced lipid accumulation in HepG2 cells and metformin intervention. *Life Sci.* 2017; 173:107-115.
140. Zhou J, Zhai Y, Mu Y, Gong H, Uppal H, et al. A novel pregnane X receptor-mediated and sterol regulatory element-binding protein-independent lipogenic pathway. *Biol Chem*, 2016; 281: 15013–15020.
141. Zhou, G. et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *The Journal of clinical investigation*, 2006;108, 1167–1174.
142. Zhou, R.Myers,Y.Li, Y.Chen, X. Shen,J. Fenyk Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J.Clin. Invest.*,108(2001), pp.1167-1174.
143. Zhu, X., Yan, H., Xia, M. Metformin attenuates triglyceride accumulation in HepG2 cells through decreasing stearyl-coenzyme A desaturase 1 expression. *Lipids Health.* 2018; 17: 114.

8. APÉNDICES

Apéndice I. Protocolo para fijación celular en paraformaldehido

1. Antes de la fijación, preparar una solución de paraformaldehido al 4 %
2. Enjuagar el multipozo con PBS (2X)
3. Dejar secar, pero no en su totalidad
4. Agregar paraformaldehido 4% y esperar 60 min
5. Enjuagar el multipozo (2x)

Preparación de soluciones

- 4% de formaldehido (100 ml) en 0.1 M de NaPi pH 7.4
- Realizar la preparación en campana de extracción
- Disolver 1.15 g (agua libre: MW 142) Na_2HPO_4 en 80 ml de agua en un matraz Erlenmeyer. Añadir 4 g de paraformaldehido y calentar a 60°C mientras se disuelve. Esto tomará aproximadamente 30 min, la solución no debe estar completamente clara. Añadir 0.228g de NaH_2PO_4 en agua hasta aforar a 100 ml. Dejar enfriar la solución a temperatura ambiente, filtrar y preservar en frasco de cristal.

Tinción con Rojo Oleoso en células HepG2

Fundamento

La tinción con colorantes solubles en aceites está basada en que estos poseen mayor solubilidad sobre las estructuras lipofílicas de las células. El rojo oleoso es un colorante liposoluble que se une específicamente a triglicéridos y oleatos de colesterol, dándoles una coloración rojiza (Ramírez- Zacarias *et al.*, 1992).

Reactivos

- PBS
- Paraformaldehído al 4%
- Rojo Oleoso
- Isopropanol
- Filtro de 0.45 μM
- Agua destilada

Preparación de Colorante

3 mg de Rojo Oleoso (Matheson Coleman & Bell) se disolverán en 1mL de Isopropanol, de este stock se hizo una dilución con agua en relación 60:40. A cada pozo de células se le agregó 1 mL de esta dilución y se incubó por 60 min a temperatura ambiente en agitación. Pasado este tiempo, se lavaron las células para remover el exceso de colorante con PBS. Para recuperar el contenido de TGs teñidos con el colorante, las células se incubaron con isopropanol por 30 min en agitación a temperatura ambiente; se recuperó entonces el sobrenadante y se midió la absorbancia a 500nm o 510nm de longitud de onda por espectrofotómetro. El contenido de TG se reporta como veces de cambio respecto de las células control. (Escalona, 2014)

Apéndice III. Análisis de las combinaciones MTF-RIF para SIS

Combinación #1: RIF 5 μ M – MTF 0.04 mM

	A-Rif 5	B-Metf 0.04	Trat A+B	Suma Teórica
	122.3412	101.8914	140.05	
	119.9377	122.6504	116.13	
	116.935	110.4449	114.14	
	138.5463	112.594	127.8779	
	118.9826	106.27792	119.0956	
	149.0239	119.9377	187.52	
n=	6	6	6	12
Media=	127.63	112.30	134.14	239.93
EE=	5.33	3.23	11.36	4.41
Var=	170.63	62.72	774.91	233.35
F=	3.321	P=	0.04518	
T var iguales=	-10.545	P=	0.00000	
T var dif=	-8.678	P=	0.00003	
gl=	7.000			

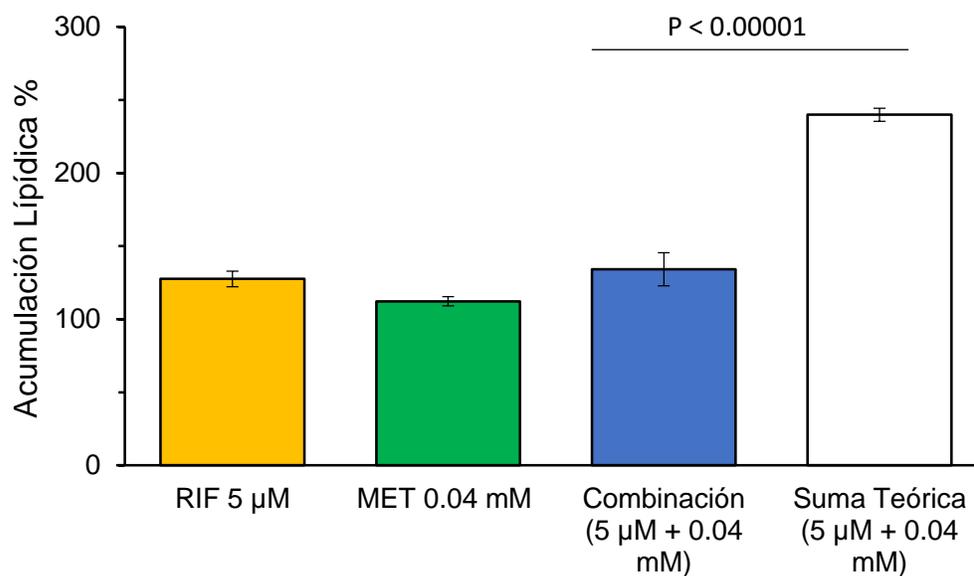
Resultado de la prueba de t

Valor de t= -8.6784

Valor de P= 0.00003

Conclusión: Antagonismo

Combinación que generó el grado de significancia (-105.79)



Combinación #2: RIF 5 μ M – MTF 0.5 mM

	A-Rif 5	B-Metf 0.5	Trat A+B	Suma Teórica
	122.3412	102.9805	142.50	
	119.9377	107.3888	128.68	
	116.935	112.7723	127.0581	
	138.5463	116.7763	102.044	
	118.9826	98.58606	133.9533	
	149.0239	96.6867	155.0495	
n=	6	6	6	12
Media=	127.63	105.87	131.55	233.49
EE=	5.33	3.24	7.25	4.41
Var=	170.63	62.93	315.40	233.56
F=	1.350	P=	0.31404	
T var iguales=	-12.666	P=	0.00000	
T var dif=	-12.012	P=	0.00000	
gl=	9.000			

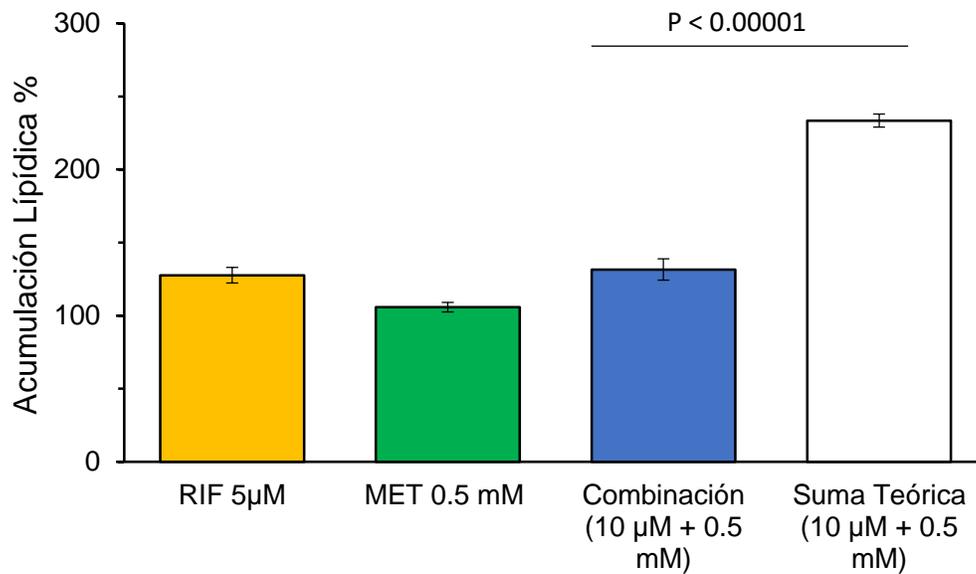
Resultado de la prueba de t

Valor de t= -12.6659

Valor de P= 0.00000

Conclusión: Antagonismo

Combinación que generó el grado de significancia (-101.95)



Combinación #3: RIF 5 μ M – MTF 1 mM

	A-Rif 5	B-Metf 1	Trat A+B	Suma Teórica
	122.3412	85.64982	134.812	
	119.9377	73.93562	105.9693	
	116.935	108.4057	111.3027	
	138.5463	79.02389	116.9319	
	118.9826	93.30882	149.6278	
	149.0239	84.13928	96.2397	
n=	6	6	6	12
Media=	127.63	87.41	119.15	215.04
EE=	5.33	4.97	8.04	5.16
Var=	170.63	148.26	387.86	318.89
F=	1.216	P=	0.36389	
T var iguales=	-10.394	P=	0.00000	
T var dif=	-10.040	P=	0.00000	
gl=	9.000			

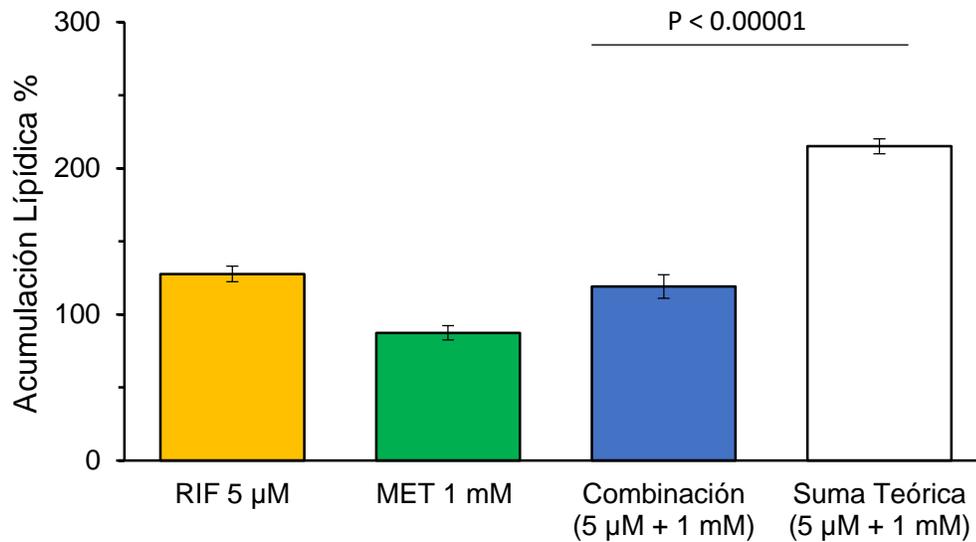
Resultado de la prueba de t

Valor de t= -10.3940

Valor de P= 0.00000

Conclusión: Antagonismo

Combinación que generó el mayor grado de significancia (-95.89)



Combinación #4: RIF 5 μ M – MTF 2 mM

	A-Rif 5	B-Metf 2	Trat A+B	Suma Teórica
	122.3412	76.35379	115.5235	
	119.9377	81.10902	107.647	
	116.935	89.67972	116.1827	
	138.5463	76.35379	102.5271	
	118.9826	86.61764	128.6765	
	149.0239	79.88718	137.0581	
n=	6	6	6	12
Media=	127.63	81.67	117.94	209.29
EE=	5.33	2.23	5.27	4.09
Var=	170.63	29.73	166.64	200.36
F=	1.202	P=	0.44668	
T var iguales=	-13.262	P=	0.00000	
T var dif=	-13.700	P=	0.00000	
gl=	11.000			

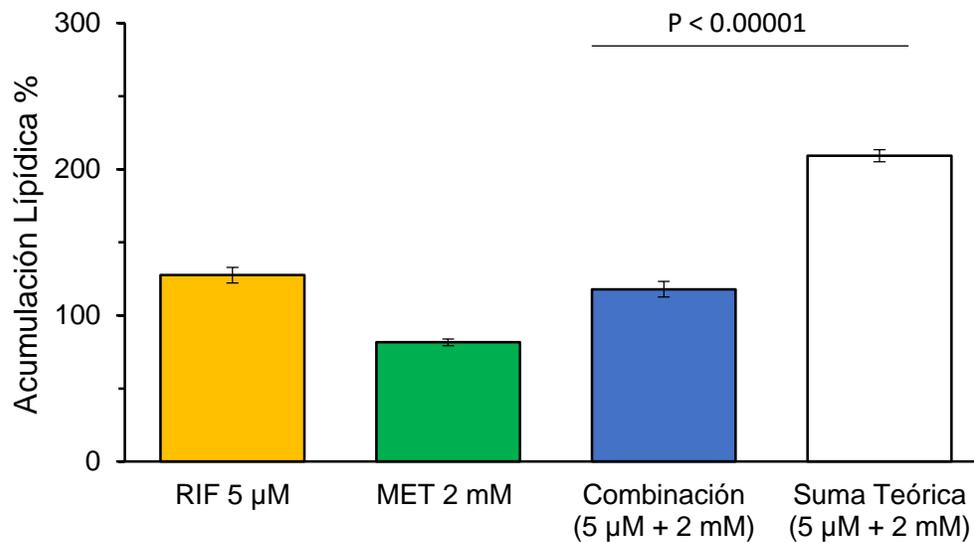
Resultado de la prueba de t

Valor de t= -13.2618

Valor de P= 0.00000

Conclusión: Antagonismo

Combinación que generó el mayor grado de significancia (-91.36)



Combinación #5: RIF 10 μ M – MTF 0.04 mM

	A-Rif 10	B-Metf 0.04	Trat A+B	Suma Teórica
	196.9319	101.8914	117.1596	
	149.6278	122.6504	154.0525	
	202.0768	110.4449	185.5446	
	123.9296	112.594	117.1596	
	137.5347	106.27792	148.0525	
	143.6634	119.9377	145.5446	
n=	6	6	6	12
Media=	158.96	112.30	144.59	271.26
EE=	13.30	3.23	10.46	9.68
Var=	1061.63	62.72	656.91	1124.35
F=	1.712	P=	0.28777	
T var iguales=	-8.100	P=	0.00000	
T var dif=	-8.887	P=	0.00000	
gl=	13.000			

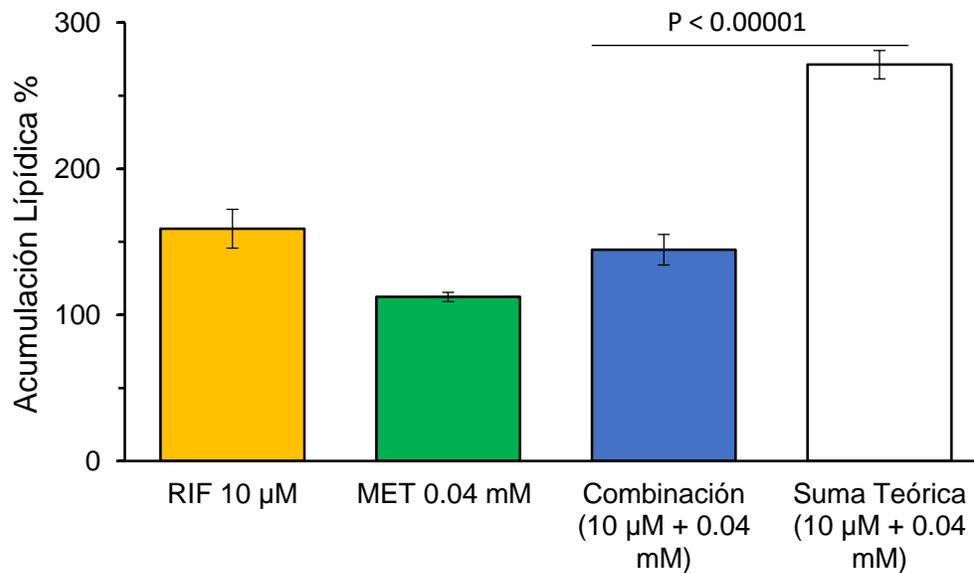
Resultado de la prueba de t

Valor de $t = -8.1001$

Valor de $P = 0.00000$

Conclusión: Antagonismo

Combinación que generó el mayor grado de significancia (-126.67)



Combinación #6: RIF 10 μ M – MTF 0.5 mM

	A-Rif 10	B-Metf 0.5	Trat A+B	Suma Teórica
	196.9319	102.9805	122.1126	
	149.6278	107.3888	148.4563	
	202.0768	112.7723	145.9241	
	123.9296	116.7763	132.2987	
	137.5347	98.58606	128.0203	
	143.6634	96.6867	117.3549	
n=	6	6	6	12
Media=	158.96	105.87	132.36	264.83
EE=	13.30	3.24	5.14	9.68
Var=	1061.63	62.93	158.41	1124.56
F=	7.099	P=	0.02115	
T var iguales=	-9.237	P=	0.00000	
T var dif=	-12.086	P=	0.00000	
gl=	17.000			

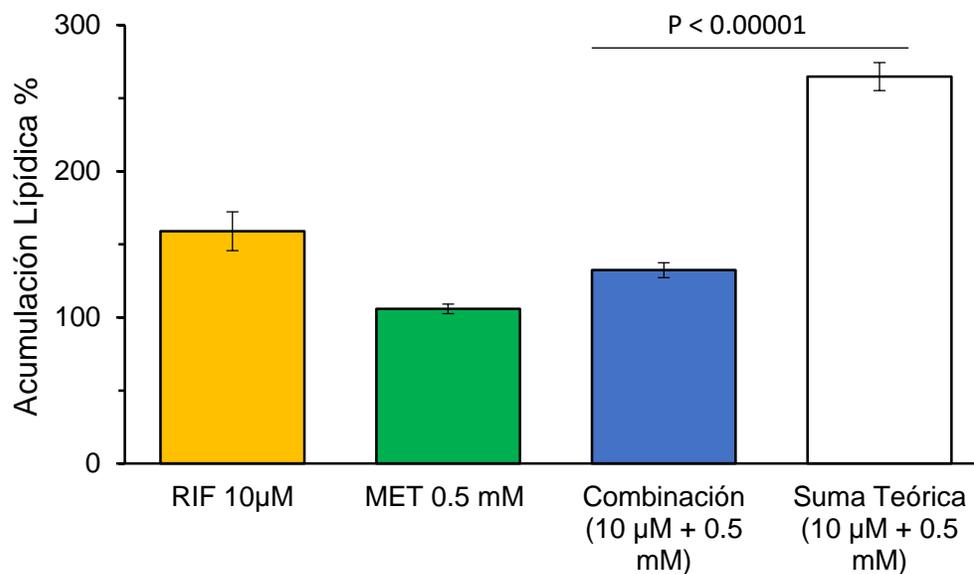
Resultado de la prueba de t

Valor de t= -12.0865

Valor de P= 0.00000

Conclusión: Antagonismo

Combinación que generó el grado de significancia (-132.46)



Combinación #7: RIF 10 μ M – MTF 1 mM

	A-Rif 10	B-Metf 1	Trat A+B	Suma Teórica
	196.9319	85.64982	104.6029	
	149.6278	73.93562	132.3529	
	202.0768	108.4057	140.0475	
	123.9296	79.02389	104.6029	
	137.5347	93.30882	132.3529	
	143.6634	84.13928	140.0475	
n=	6	6	6	12
Media=	158.96	87.41	125.67	246.37
EE=	13.30	4.97	6.81	10.04
Var=	1061.63	148.26	278.08	1209.89
F=	4.351	P=	0.05841	
T var iguales=	-7.965	P=	0.00000	
T var dif=	-9.950	P=	0.00000	
gl=	17.000			

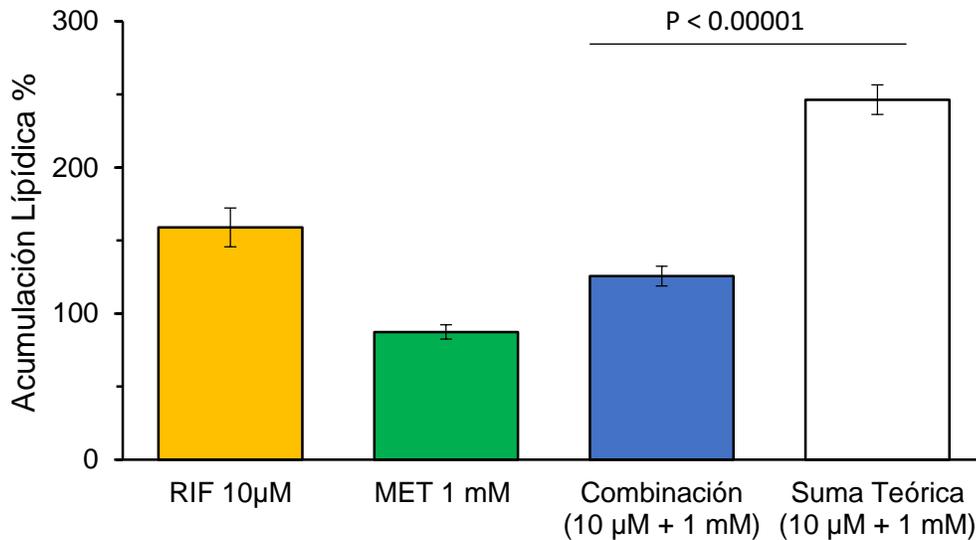
Resultado de la prueba de t

Valor de t= -7.9646

Valor de P= 0.00000

Conclusión: Antagonismo

Combinación que generó el grado de significancia (-120.70)



Combinación #8: RIF 10 μ M – MTF 2 mM

	A-Rif 10	B-Metf 2	Trat A+B	Suma Teórica
	196.9319	76.35379	93.8622	
	149.6278	81.10902	118.6039	
	202.0768	89.67972	116.1329	
	123.9296	76.35379	99.0457	
	137.5347	86.61764	113.2569	
	143.6634	79.88718	116.6645	
n=	6	6	6	12
Media=	158.96	81.67	109.59	240.63
EE=	13.30	2.23	4.27	9.54
Var=	1061.63	29.73	109.22	1091.36
F=	9.992	P=	0.00993	
T var iguales=	-9.357	P=	0.00000	
T var dif=	-12.542	P=	0.00000	
gl=	16.000			

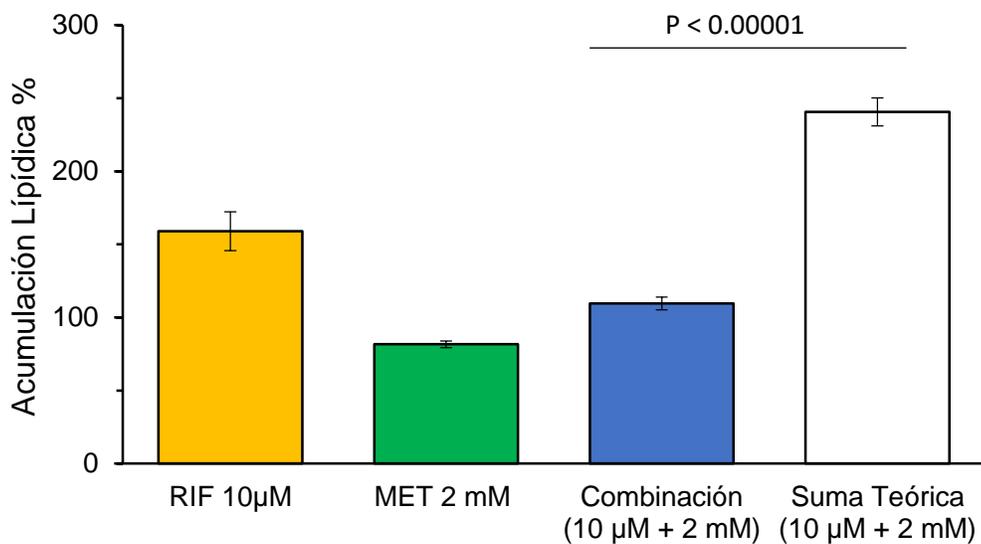
Resultado de la prueba de t

Valor de $t = -12.5421$

Valor de $P = 0.00000$

Conclusión: Antagonismo

Combinación que generó el grado de significancia (-131.03)



Combinación #9: RIF 20 µM – MTF 0.04 mM

	A-Rif 20	B-Metf 0.04	Trat A+B	Suma Teórica
	108.3029	101.8914	108.3029	
	90.74398	122.6504	93.28957	
	102.6733	110.4449	99.50495	
	70.98052	106.27792	111.3029	
	81.9315	119.9377	95.3256	
	85.77988	112.594	99.50495	
n=	6	6	6	12
Media=	90.07	112.30	101.21	202.37
EE=	5.60	3.23	2.92	4.57
Var=	188.16	62.72	51.07	250.88
F=	4.912	P=	0.04581	
T var iguales=	-14.739	P=	0.00000	
T var dif=	-18.652	P=	0.00000	
gl=	17.000			

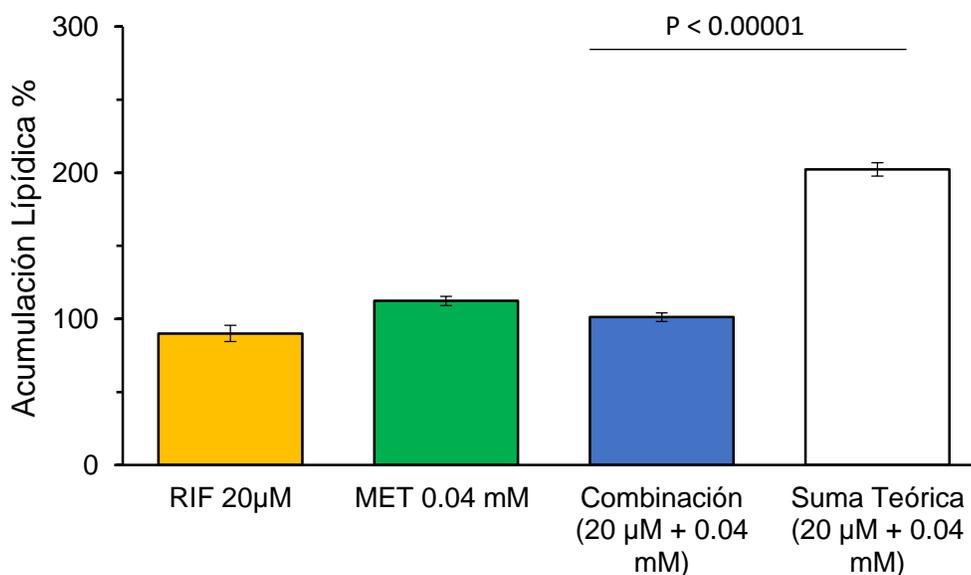
Resultado de la prueba de t

Valor de $t = -18.6515$

Valor de $P = 0.00000$

Conclusión: Antagonismo

Combinación que generó el grado de significancia (-101.16)



Combinación #10: RIF 20 µM – MTF 0.5 mM

	A-Rif 20	B-Metf 0.5	Trat A+B	Suma Teórica
	108.3029	102.9805	88.2587	
	90.74398	107.3888	113.25645	
	102.6733	112.7723	109.50495	
	70.98052	116.7763	103.3029	
	81.9315	98.58606	111.2516	
	85.77988	96.6867	137.50495	
n=	6	6	6	12
Media=	90.07	105.87	110.51	195.93
EE=	5.60	3.24	6.54	4.57
Var=	188.16	62.93	256.98	251.08
F=	1.023	P=	0.44971	
T var iguales=	-10.742	P=	0.00000	
T var dif=	-10.698	P=	0.00000	
gl=	10.000			

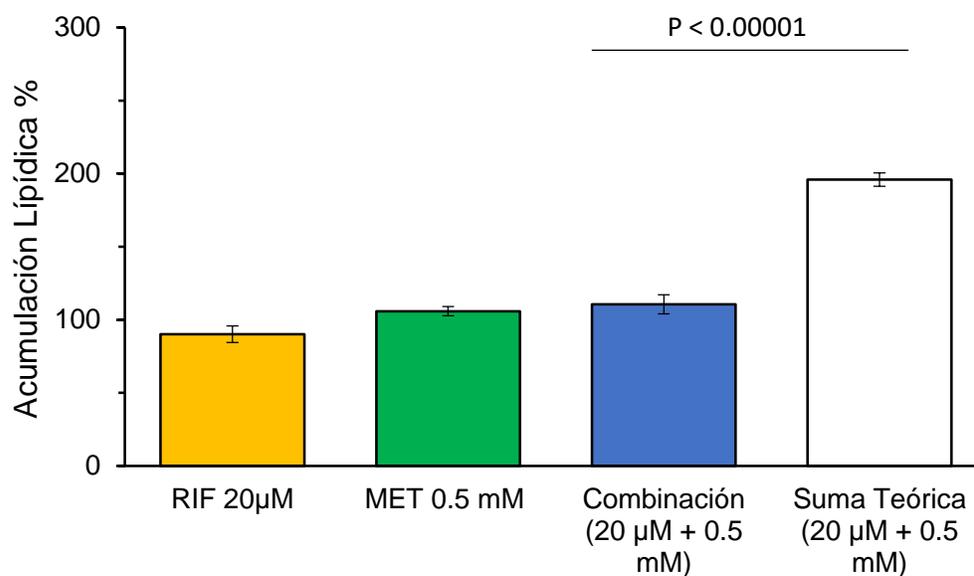
Resultado de la prueba de t

Valor de $t = -10.7423$

Valor de $P = 0.00000$

Conclusión: Antagonismo

Combinación que generó el grado de significancia (-85.42)



Combinación #11: RIF 20 µM – MTF 1 mM

	A-Rif 20	B-Metf 1	Trat A+B	Suma Teórica
	108.3029	85.64982	105.4567	
	90.74398	73.93562	72.5649	
	102.6733	108.4057	89.50495	
	70.98052	79.02389	118.3029	
	81.9315	93.30882	93.57245	
	85.77988	84.13928	99.4256	
n=	6	6	6	12
Media=	90.07	87.41	96.47	177.48
EE=	5.60	4.97	6.31	5.29
Var=	188.16	148.26	238.91	336.42
F=	1.408	P=	0.37168	
T var iguales=	-9.263	P=	0.00000	
T var dif=	-9.834	P=	0.00000	
gl=	12.000			

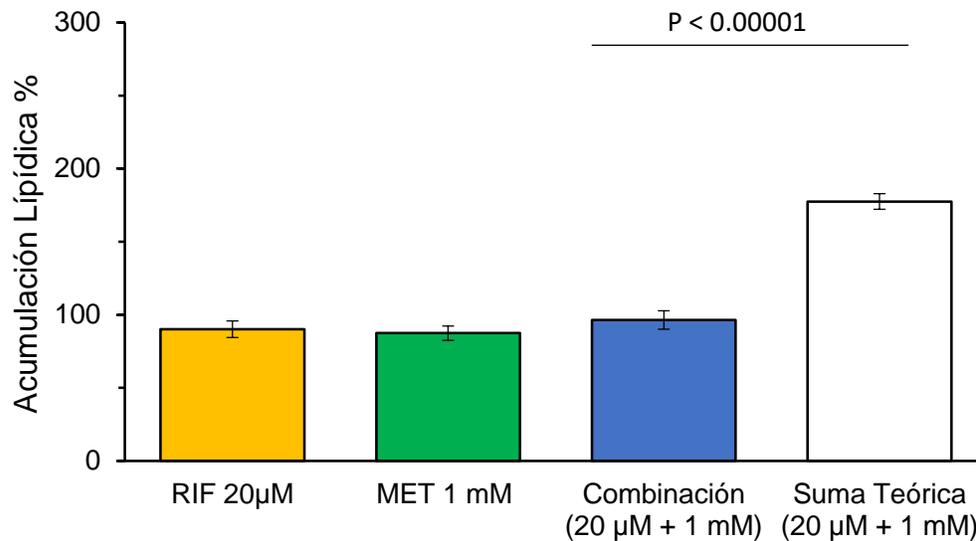
Resultado de la prueba de t

Valor de t= -9.2627

Valor de P= 0.00000

Conclusión: Antagonismo

Combinación que generó el grado de significancia (-81.01)



Combinación #12: RIF 20 µM – MTF 2 mM

	A-Rifan 20.0	B-Metf 2	Trat A+B	Suma Teórica
	108.3029	76.35379	89.1924	
	90.74398	81.10902	97.28957	
	102.6733	89.67972	119.50495	
	70.98052	76.35379	68.3029	
	81.9315	86.61764	112.28957	
	85.77988	79.88718	111.6547	
n=	6	6	6	12
Media=	90.07	81.67	99.71	171.74
EE=	5.60	2.23	7.74	4.26
Var=	188.16	29.73	359.13	217.89
F=	1.648	P=	0.22732	
T var iguales=	-8.900	P=	0.00000	
T var dif=	-8.155	P=	0.00002	
gl=	8.000			

Resultado de la prueba de t

Valor de $t = -8.8996$

Valor de $P = 0.00000$

Conclusión: Antagonismo

Combinación que generó el mayor grado de significancia (-72.03)

