



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

**“Evaluación del efecto farmacológico de la diosmina y la metformina en un  
modelo de esteatohepatitis no alcohólica que conduce a cáncer  
hepatocelular”**

TESIS

Que presenta:

**Q.F.B. Luis Enrique López Ovando**

Para obtener el grado de  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

EN LA ESPECIALIDAD DE  
**FARMACOLOGÍA**

Directores de tesis  
**Dr. Pablo Muriel de la Torre**  
**Dra. Erika Ramos Tovar**

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 15 “Hepatología Experimental” del Departamento de Farmacología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Pablo Muriel de la Torre y la Dra. Erika Ramos Tovar.

Se contó con una beca del CONAHCYT para estudios de posgrado con clave de registro: 848530.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Pablo Muriel de la Torre y a la Dra. Erika Ramos Tovar, quienes con mucha paciencia y dedicación dirigieron este proyecto y me transmitieron sus conocimientos.

A mi comité tutorial conformado por el Dr. Gilberto Castañeda Hernández y el Dr. Francisco Javier Camacho Arroyo, quienes, con sus comentarios y orientación, fueron de mucha ayuda para el desarrollo de este proyecto.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional y al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías por la beca otorgada a Luis Enrique López Ovando.

Al Dr. en C. Eduardo Enrique Vargas Pozada quien me orientó y me apoyó en diversas ocasiones para la realización de este proyecto.

A los técnicos en investigación la Lic. en Enf. Laura Dayana Buendía Montaña y la Lic. en Enf. Rosa Elena Flores Beltrán, quienes me apoyaron durante mi estancia en el laboratorio para llevar a cabo el proyecto.

A mis compañeros del laboratorio la Dra. en C. Irina Cardozo Lezama, la M. en C. Linda Vanessa Márquez Quiroga, al M. en C. Alejandro Mejía Villa y a la Dra. Karla Jocelyn Ortega Carballo por el apoyo que me brindaron durante la estancia en el laboratorio.

A Ashland Chemical de México y a Emmanuel Ríos Medina, por la donación del compuesto metformina, que se ocupó para llevar a cabo este proyecto.

A los técnicos en investigación Alejandro Cruz Hernández y Víctor Manuel Ortiz Santiago y a la Q.F.B. Silvia Galindo Gómez por el apoyo brindado durante el proyecto.

A la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL)-CINVESTAV a cargo del Dr. Jorge Fernández Hernández, a Rafael Leyva, a Benjamín E. Chávez, por la excelente asistencia técnica en el cuidado de los animales de experimentación.

## DEDICATORIAS

*A mis padres **Ramiro López Morales** y **Rosa Ovando Hernández**.*

*Quienes han sido mi motor de vida, y han estado presente en cada logro que he alcanzado, ellos me han enseñado que debo de luchar por lo que quiero y mantenerme firme ante mis decisiones.*

*A mis hermanos y hermanas **Pascuala, Carmelino, Carlos, Reyna, Trinidad, Ramiro, Miguel Angel y Erika del Rosario**.*

*Quienes siempre me han apoyado y han estado presentes en las metas que me propongo.*

*A **Tania Verónica Raya Bahena**.*

*Por ser la persona quien me apoyó durante mi estancia en la ciudad y en la maestría, es una persona maravillosa me siento encantado por haberla encontrado y haberme compartido parte de su vida.*

## Índice DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO .....	5
ÍNDICE DE FIGURAS .....	8
ÍNDICE DE TABLAS .....	8
ÍNDICE DE GRÁFICAS .....	8
LISTA DE ABREVIATURAS .....	9
RESUMEN .....	11
ABSTRACT .....	12
I. INTRODUCCIÓN .....	13
1.1. El hígado a través del tiempo .....	13
1.2. El hígado .....	14
1.2.1. Los tipos celulares del hígado .....	14
1.2.2. La irrigación sanguínea del hígado .....	19
1.3. Las enfermedades crónicas del hígado .....	20
1.4. La enfermedad de hígado graso no alcohólico .....	20
1.5. La esteatohepatitis no alcohólica .....	21
1.5.2. La fisiopatología de la esteatohepatitis no alcohólica .....	21
1.6. El cáncer de hígado .....	22
1.6.1. La fisiopatología del cáncer hepatocelular .....	23
1.6.2. La epidemiología del cáncer hepatocelular .....	24
1.6.3. El tratamiento del cáncer hepatocelular .....	25
1.7. La metformina .....	26
1.7.1. El mecanismo de acción de la metformina .....	27
1.7.2. La farmacocinética de la metformina .....	28
1.7.3. Los efectos adversos de la metformina .....	30

1.7.4. El efecto de la metformina sobre el cáncer .....	30
<b>1.8. La diosmina .....</b>	<b>31</b>
1.8.1. El mecanismo de acción de la diosmina .....	32
1.8.2. La farmacocinética de la diosmina .....	34
1.8.3. Los efectos adversos de la diosmina .....	34
1.8.4. El efecto de la diosmina sobre el cáncer .....	35
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>35</b>
<b>III. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>36</b>
<b>IV. HIPÓTESIS .....</b>	<b>36</b>
<b>V. OBJETIVOS .....</b>	<b>36</b>
5.1. Objetivo general .....	36
5.2. Objetivos específicos .....	36
<b>VI. METODOLOGÍA .....</b>	<b>36</b>
6.1. Animales de experimentación .....	36
6.2. Reactivos .....	37
6.3. Diseño experimental .....	37
6.4. Análisis bioquímicos .....	40
6.5. Análisis histológicos .....	40
6.6. Análisis estadístico .....	42
<b>VII. RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
7.1. La administración de los hepatotóxicos, la metformina y la diosmina no modificó el peso corporal de las ratas .....	43
7.2. La administración de los hepatotóxicos y la diosmina no modificó la concentración de la glucosa sérica en las ratas .....	43
7.3. La metformina previno parcialmente el aumento de peso del hígado .....	44

<b>7.4. La administración de los hepatotóxicos alteró la coloración del hígado</b>	<b>45</b>
.....	
<b>7.5. La administración de la metformina previno parcial y totalmente el aumento de la actividad enzimática de la ALT y la <math>\alpha</math>-GTP, respectivamente</b>	<b>46</b>
.....	
<b>7.6. La administración de la metformina evitó la interrupción parcial de la arquitectura microscópica del parénquima hepático</b>	<b>48</b>
.....	
<b>7.7. La administración de la diosmina y la metformina en combinación previno la acumulación de lípidos en los hepatocitos</b>	<b>50</b>
.....	
<b>7.8. La administración de la diosmina y la metformina no previno la fibrosis</b>	<b>52</b>
.....	
<b>VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>56</b>
.....	
<b>8.1. El modelo de esteatohepatitis no alcohólica conducente a cáncer hepatocelular</b>	<b>56</b>
.....	
<b>8.2. Los efectos de la administración de la metformina en el hígado</b>	<b>57</b>
.....	
<b>8.3. Los efectos de la administración de la diosmina sobre el daño hepático</b>	<b>59</b>
.....	
<b>8.4. La administración conjunta de la metformina y la diosmina mostró un efecto antiesteatósico importante en el hígado</b>	<b>61</b>
.....	
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	<b>63</b>
.....	
<b>X. PERSPECTIVAS</b>	<b>64</b>
.....	
<b>XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>65</b>
.....	

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Los modelos mesopotámicos del hígado en arcilla .....	13
Fig. 2 El castigo de Prometeo .....	14
Fig. 3 El lobulillo hepático y la zonación metabólica.....	15
Fig. 4 Los tipos celulares del hígado .....	16
Fig. 5 La estructura química de la metformina .....	26
Fig. 6 La estructura química de la diosmina .....	32
Fig. 7 El mecanismo de acción de la diosmina sobre la vía del NF-κB .....	33
Fig. 8 Esquema de tratamiento durante el periodo de desarrollo del estudio.....	39
Fig. 9 La anatomía macroscópica de los hígados de los grupos de estudio .....	46
Fig. 10 Los efectos de los hepatotóxicos, la diosmina y la metformina sobre el parénquima hepático.....	49
Fig. 11 El efecto de los hepatotóxicos, la metformina y la diosmina sobre la acumulación de los lípidos dentro de los hepatocitos .....	51
Fig. 12 El efecto de los hepatotóxicos, la diosmina y la metformina en la síntesis de las fibras de colágena .....	54
Fig. 13 Mecanismo de acción de la metformina y la diosmina .....	62

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Los porcentajes de los ingredientes en la preparación de la dieta con alto contenido de grasas, colesterol y carbohidratos simples. ....	38
Tabla 2. Los grupos de estudio y tratamientos correspondientes. ....	38

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. El efecto de los hepatotóxicos, la metformina y la diosmina sobre el peso corporal de las ratas.....	43
Gráfica 2. El efecto de los hepatotóxicos, la metformina y la diosmina sobre la concentración de la glucosa sérica .....	44

Gráfica 3. El efecto de la administración de los hepatotóxicos, la metformina y la diosmina sobre el peso del hígado y la relación con el peso corporal..... 45

Gráfica 4. El efecto de los hepatotóxicos, la metformina y la diosmina sobre la actividad enzimática de la ALT y la  $\gamma$ -GTP ..... 47

Gráfica 5. La cuantificación del porcentaje de área teñida de color rojo en el tejido ..... 52

Gráfica 6. El efecto de los hepatotóxicos, la diosmina y la metformina en la síntesis de la matriz extracelular y la colágena ..... 55

### LISTA DE ABREVIATURAS

A.C.	Antes de Cristo	DNA	Ácido desoxirribonucleico
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta	IL	Interleucina
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa	VHC	Virus de la hepatitis C
VHB	Virus de la hepatitis B	EHGNA	Enfermedad de hígado graso no alcohólico
EHNA	Esteatohepatitis no alcohólica	ROS	Especies reactivas de oxígeno
TLR	Receptor tipo Toll	NF- $\kappa$ B	Factor nuclear kappa B
OMS	Organización Mundial de la Salud	CHC	Cáncer hepatocelular
FDA	Administración de alimentos y medicamentos	AMPK	Proteína cinasa activada por el AMP
LKB1	Cinasa 1 del hígado	ATP	Trifosfato de adenosina
AMP	Monofosfato de adenosina	ADP	Difosfato de adenosina
mTOR	Diana de rapamicina en células de mamífero	SREBP-1	Proteína de unión a elementos reguladores de esteroides
Tmax	Tiempo máximo	$t_{1/2}$	Tiempo de vida media
OCT	Transportador de cationes orgánicos	MATE	Transportador de extrusión de toxinas y múltiples fármacos

PMAT	Transportador de monoaminas en la membrana plasmática	VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
LDL	Lipoproteína de baja densidad	HDL	Lipoproteína de alta densidad
IKK	Cinasa inhibitoria del NF- $\kappa$ B	I $\kappa$ B	Inhibidor del NF- $\kappa$ B
mg	Miligramo	Kg	Kilogramo
$\mu$ M	Micromolar	PI3K	Cinasa del 3 fosfatidilinositol
Akt	Proteína cinasa B	UPEAL	Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio
CICUAL	Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio	CINVESTAV-IPN	Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional
CCl <sub>4</sub>	Tetracloruro de carbono	DEN	Dietilnitrosamina
CMC	Carboximetilcelulosa	rpm	Revoluciones por minuto
ALT	Alanina aminotransferasa	$\gamma$ -GTP	Gamma glutamil transpeptidasa
H&E	Hematoxilina y eosina	ORO	Rojo oleoso "O"
ANOVA	Análisis de varianza	<sup>14</sup> C	Carbono 14
nm	Nanómetro	cm	Centímetro
g/mol	Gramos por mol	mg/Kg	Miligramos por kilogramo
Leu	Leucina	Val	Valina
Ile	Isoleucina	EGF	Factor de crecimiento epidérmico
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas	Ub	Ubiquitina
P	Grupo fosfato	SEM	Error estándar de la media
mg/dL	Miligramos por decilitro	$\mu$ m	Micrómetro
TKI	Inhibidor de tirosinas cinasas	Thr	Treonina
LD50	Dosis letal 50	ADRP	Proteína relacionada con la diferenciación adiposa

## RESUMEN

La esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) es una enfermedad crónica del hígado originada a partir de un hígado graso simple, consecuencia de un mal hábito alimenticio y un estilo de vida sedentario. La EHNA se caracteriza por la presencia de esteatosis, inflamación y puede o no existir fibrosis. En los años recientes, esta es una de las enfermedades que ha tomado mucho interés, debido a la alta relación con el cáncer de hígado. El cáncer de hígado es una enfermedad terminal con un bajo pronóstico, debido a que en la mayoría de los casos es detectada en la etapa avanzada. El cáncer hepatocelular (CHC) representa aproximadamente el 90% de los tipos de cáncer de hígado. En la actualidad, los compuestos utilizados en el tratamiento contra este tipo de cáncer pueden producir resistencia celular y toxicidad. Por lo que es necesario investigar nuevos compuestos que pudieran ser eficaces, seguros y económicos para combatir esta patología. La metformina y la diosmina son fármacos que han llamado la atención de investigadores, debido a sus propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas. Los estudios llevados a cabo con el uso de estos fármacos demuestran su potencial sobre diversos tipos de cáncer. Por lo que en este trabajo exploramos los efectos de estos compuestos individualmente y en combinación en un modelo de EHNA que conduce a CHC. El modelo de EHNA que conduce a CHC, fue llevado a cabo en ratas Fischer 344 machos, a las cuales se les administraron el tetracloruro de carbono ( $\text{CCl}_4$ ), la dietilnitrosamina (DEN) y la dieta alta en grasas, colesterol y carbohidratos simples (dieta). El grupo de ratas que recibió los hepatotóxicos mostró alteraciones a nivel macroscópico y microscópico del hígado y un aumento en las actividades enzimáticas de los marcadores de daño hepático, la cantidad de la colágena y los lípidos. La administración de la metformina y la diosmina previno la acumulación excesiva de los lípidos en el hígado, Por otro lado, cuando los compuestos fueron administrados individualmente a las ratas sanas, la diosmina aumentó el nivel de la actividad de la enzima alanina aminotransferasa (ALT), y la metformina aumentó el nivel de glucosa sérica. Los tumores en el hígado no fueron observados. Se concluye que, la combinación de estos compuestos son candidatos para el tratamiento del CHC, sin embargo, se necesitan realizar más estudios.

## **ABSTRACT**

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is a chronic liver disease that results from a simple fatty liver caused by bad eating habits and a sedentary lifestyle. NASH is characterized by steatosis, and inflammation, with or without fibrosis. Recently, NASH has gained much attention because of its high prevalence and the risk of liver cancer development. Liver cancer is a terminal disease with low prognostic because it is frequently detected at advanced stages and the lack of effective therapies. Hepatocellular carcinoma (HCC) represents 90% of all types of liver cancer. At present, drugs used to treat HCC are not 100% effective and produce cell resistance and toxicity. Hence, it is necessary to search for effective, safe and economical compounds to treat this disease. Metformin and diosmin have attracted the attention of researchers because of their anti-inflammatory and anticancer properties. Both metformin and diosmin have demonstrated significant beneficial effects on other types of malignancies. Therefore, we aimed to explore the effects of these compounds, administered individually and in combination in a model of NASH leading to HCC. We used Fischer-344 male rats, who were administered carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>), diethylnitrosamine (DEN), and a high fat, cholesterol and carbohydrate diet (diet). The group of rats that received the diet and hepatotoxins showed macroscopic and microscopic alterations in the liver, elevation of enzymatic activity of liver injury markers, hepatosteatosis, and exacerbated collagen deposition within the hepatic parenchyma. Treatment with metformin and diosmin improved some parameters altered by NASH-HCC protocol, but not all of them. The best result was observed against fatty liver, where the simultaneous administration of both drugs produced a better effect than any drug administered individually. Some undesired effects were also found, such as treatment with diosmin in healthy rats, which increased alanine aminotransferase (ALT) activity, and metformin significantly increased blood glucose levels when administered to control rats. No evidence of tumors was detected. It is concluded that both drugs have the potential to treat NASH- driven HCC; however, more research is needed before concluding.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. El hígado a través del tiempo

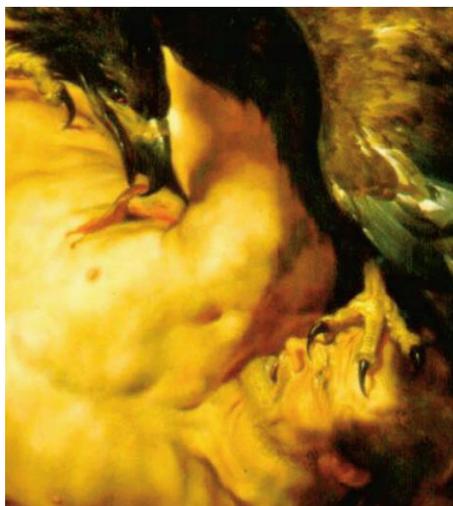
El hígado a principios de los tiempos fue considerado el órgano más importante del cuerpo humano. Los griegos creían que este órgano albergaba el alma con funciones emocionales y mentales, esto debido a su localización y alta irrigación de la sangre (1,2). Los babilonios, los etruscos, los griegos y los romanos consideraban al hígado como el órgano que predecía el futuro, basados en la morfología y la superficie del hígado de los animales sacrificados (1,2).

Los rituales babilónicos se originaron hace aproximadamente 3,000 A.C. por lo que a partir de ese tiempo se comenzó a estudiar la anatomía del hígado por el interés de localizar el alma. Los sacerdotes de Babilonia elaboraron la forma del hígado con arcilla (Fig. 1), para instruir a los aspirantes a sacerdocio (1).



**Fig. 1 Los modelos mesopotámicos del hígado en arcilla.** La superficie diafragmática y visceral del hígado en arcilla para instruir a aprendices de sacerdocio. Imagen tomada de (1).

Los griegos en la antigüedad eran conscientes de la capacidad regenerativa del hígado. Prometeo es un personaje legendario, quien aparentemente intentó burlarse del dios Zeus, robándole el fuego para dárselo a la humanidad. Zeus castigó a Prometeo encadenándolo a una piedra en la cima de la montaña del Cáucaso, donde de día un águila consumía una parte de su hígado, y por las noches éste se regeneraba recibiendo así una tortura eterna (Fig. 2) (3). Otro mito menos conocido fue el del gigante Ticio quien sufrió el mismo castigo que recibió Prometeo (2).



**Fig. 2 El castigo de Prometeo.** El águila descendía a consumir parte del hígado de Prometeo en el día y por las noches el hígado se regeneraba, y así continuamente todos los días para continuar la tortura de Prometeo. Imagen tomada de (3).

## **1.2. El hígado**

El hígado es un órgano importante en el cuerpo humano, se ubica por debajo del lado derecho del diafragma y se extiende hacia el lado izquierdo. Es un órgano con una forma triangular y un tejido suave de color marrón. El hígado se encuentra dividido en cuatro lóbulos: el derecho, el izquierdo, el caudado y el cuadrado (4). El ligamento falciforme divide al hígado en dos lóbulos: el derecho y el izquierdo, y lo une a la parte posterior de la pared abdominal (4,5). El hígado tiene un peso aproximado de 1.3-1.7 Kg en personas adultas dependiendo del sexo, y representa el 2% del peso corporal (6).

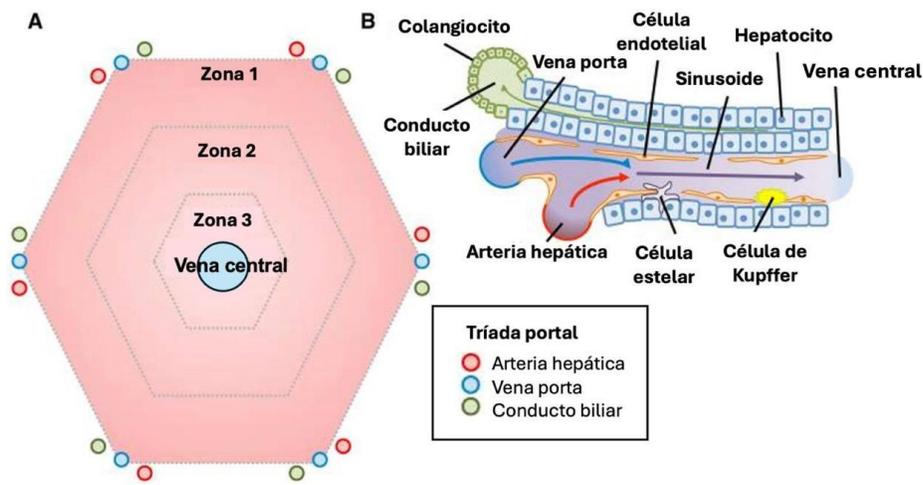
El hígado es un órgano esencial para mantener la homeostasis del cuerpo mediante las funciones de detoxificación, el uso y el almacenamiento de la glucosa, el metabolismo de nutrientes, la síntesis de proteínas séricas y hormonas, la regulación de lípidos y la formación de la bilis, entre muchas otras (4,7).

### **1.2.1. Los tipos celulares del hígado**

El lobulillo hepático es la unidad estructural del hígado, tiene una forma hexagonal y contiene a las células hepáticas (Fig. 3). En los vértices del lobulillo hepático se encuentra la tríada portal conformada por la vena porta, la arteria hepática y el conducto biliar. El sinusoides se encuentra conformado por cordones de hepatocitos

que se extienden desde la tríada portal hacia la vena central. La sangre de la arteria hepática y la vena porta pasan a través del sinusoides y desembocan en la vena central (4,8).

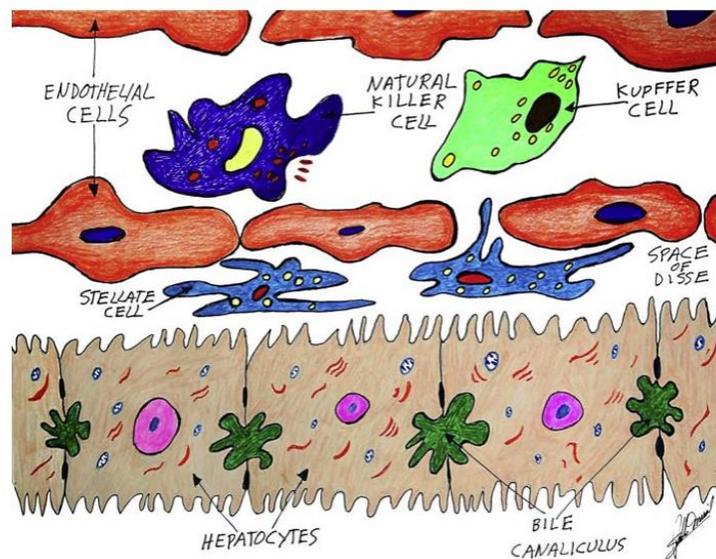
El acino hepático de Rappaport es la unidad funcional del hígado formada de dos o más venas centrales y las tríadas portales, formando dos o más triángulos (9). El sinusoides recibe la sangre que proviene de la arteria hepática y la vena porta, y forma un gradiente de concentración de oxígeno y nutrientes. El oxígeno y los nutrientes son metabolizados por zonas específicas del acino hepático “zonación metabólica”, donde cada zona tendrá una función diferente (4,8). La zona 1 se encuentra cerca de la tríada portal y recibe la mayor parte de oxígeno y nutrientes. Además, se encarga de la gluconeogénesis, la ureogénesis, la  $\beta$ -oxidación y la síntesis de colesterol. La zona 2 proporciona hepatocitos a las zonas 1 y 3 cuando estas reciben daños. Mientras que la zona 3 se encuentra cerca de la vena central, por lo que recibe menos oxígeno y nutrientes, además, es la encargada de la glucólisis, la lipogénesis, el metabolismo de fármacos, la síntesis de la glutamina y de los ácidos biliares (4,7,10,11).



**Fig. 3 El lobulillo hepático y la zonación metabólica.** A) Es la unidad estructural del hígado y tiene una forma hexagonal, en los vértices se encuentra la tríada portal que se conforma por la arteria hepática, la vena porta y el conducto biliar. Además, cuenta con una vena central, la cual ayuda a transportar la sangre hacia la vena cava. La zonación metabólica cuenta con 3 zonas distribuidas por el sinusoides (zona 1, zona 2 y zona 3),

donde cada zona realiza funciones diferentes. **B)** Los diversos tipos celulares del hígado se encuentran presentes en el sinusoides y son los encargados de llevar a cabo las funciones del hígado. El flujo de la sangre de la vena porta y la arteria hepática son combinados cerca de la zona 1 y transportados hasta la vena central. Por el contrario, la bilis tiene un flujo de dirección invertido a la sangre. Imagen modificada de (8).

Las células del hígado se dividen en dos diferentes tipos, las células parenquimatosas conformadas por los hepatocitos y las células no parenquimatosas que incluyen a los colangiocitos, las células estelares, las células endoteliales, las células de Kupffer y las células natural killer (Fig. 4) (12).



**Fig. 4 Los tipos celulares del hígado.** Las células presentes en el hígado como los hepatocitos, las células endoteliales, las células estelares y las células del sistema inmunológico como las células de Kupffer y las células natural killer mantienen las funciones de este órgano. Imagen tomada de (4).

- **Los hepatocitos**

Los hepatocitos son las principales células del hígado y la mayoría de las funciones que se le conocen al órgano se llevan a cabo en estas células (8). Estas células representan aproximadamente el 80% de la relación masa/volumen del hígado (13).

Los hepatocitos realizan diversas funciones como el metabolismo de xenobióticos y nutrientes, la síntesis de proteínas y la neutralización de antígenos. En condiciones

normales pueden actuar como células presentadoras de antígeno, ya que exhiben receptores inmunológicos en su membrana (14). También cuentan con un gran potencial de regeneración y reparación, esto mantiene las funciones normales del hígado (7,15).

Los hepatocitos en los humanos tienen una esperanza de vida de aproximadamente 3 años. Sin embargo, cuando los hepatocitos sufren algún daño deben ser reemplazados de inmediato para mantener el funcionamiento del hígado (15).

- **Los colangiocitos**

Los colangiocitos son células que se encuentran en el epitelio de los conductos biliares, muestran su mayor función en ese mismo sitio (8). Estas células representan entre el 3-5% de las células totales del hígado y son las responsables de producir el 40% de la bilis (16).

Los colangiocitos conforman la red biliar, la cual se encarga de transportar la bilis. La bilis inicia el viaje a partir del canalículo biliar localizado entre las membranas de los hepatocitos. La bilis viaja a la periferia del lobulillo hepático, y entra a los conductos biliares terminales o también llamados canales de Hering. Los canales de Hering depositan la bilis en los conductos biliares interlobulares. Estos últimos conductos forman una red, donde el tamaño aumenta conforme se acercan al tracto portal (13).

- **Las células estelares**

Las células estelares son células residentes del hígado que se encuentran en el espacio de Disse, ubicado entre los hepatocitos y las células endoteliales (6,16). Las células estelares pueden existir en estado quiescente o activo. Las células estelares quiescentes tienen la función de almacenar a la vitamina A en forma de retinol en gotas de lípidos (4). También sintetizan, degradan y secretan moléculas de la matriz sinusoidal (13). Las células quiescentes son activadas cuando existe un daño en el hígado, pierden la capacidad de almacenar a la vitamina A (8), y expresan marcadores de procesos fibrogénicos (4).

Las células estelares activas viajan al sitio donde se sufrió el daño y liberan diversos factores como el factor de crecimiento de hepatocitos, el factor de crecimiento endotelial vascular y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) que estimulan la secreción de colágena tipo I, para producir la cicatrización del daño (17,18).

- **Las células endoteliales**

Las células endoteliales comprenden el 3% del volumen total del hígado y es una población de células planas epiteliales que forman el lumen sinusoidal (4,13).

Las células endoteliales forman poros de 50-180 nm, los cuales permiten el intercambio de moléculas entre la sangre y los hepatocitos, además presentan función de barrera protectora (4,8). Los poros formados por las células endoteliales se mantienen por señales paracrinas y autocrinas de los hepatocitos y las células estelares (6). Las células endoteliales son conocidas por participar en la endocitosis, lo que permite el aclaramiento de moléculas de la sangre menores a 200 nm (4).

- **Las células de Kupffer**

Las células de Kupffer son las principales células del sistema inmunológico del hígado, están ubicadas en el lumen sinusoidal y representan entre el 80-90% de todos los tipos de macrófagos del cuerpo (4,14). Este tipo de células presentan una proliferación lenta (13).

Las células de Kupffer contienen lisosomas, microvellosidades, filopodios, pseudópodos y vesículas de pinocitosis en su estructura (13). Estas células reconocen los estímulos de patógenos que provienen de la vena porta, y pueden desencadenar una respuesta anti o proinflamatoria, la cual depende de la estimulación (8).

Las células de Kupffer presentan dos morfologías: las células pequeñas que se encuentran en la zona 3 y las células grandes que se encuentran en la zona 1, las cuales presentan mayor actividad fagocítica (4). Las células de Kupffer una vez activadas liberan factores inflamatorios como las interleucinas (IL)-1 $\beta$ , IL-6 y el

factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Los factores inflamatorios promueven el reclutamiento de células como los linfocitos, los neutrófilos, y otros macrófagos de la sangre (4).

- **Las células natural killer**

Las células natural killer son un tipo de linfocitos del sistema inmunológico encontrados en el cuerpo, particularmente en el sinusoides del hígado. Este tipo de células representan entre el 30-50% de los linfocitos del cuerpo (12,14,19). Estas células son importantes en los procesos infecciosos, la autoinmunidad y los trasplantes (20).

Las citocinas como la IL-12 y la IL-18 promueven la activación de las células natural killer, lo que resulta en la liberación del interferón gamma, la perforina y la granzima que causan la muerte celular (12,14). Las células natural killer generan memoria, la cual ayuda a que futuros ataques de patógenos y virus recurrentes sean neutralizados con mayor efectividad y rapidez (14).

### **1.2.2. La irrigación sanguínea del hígado**

El hígado recibe aproximadamente el 25% del gasto cardiaco, la sangre proviene tanto de la vena porta como de la arteria hepática (10,21). Aproximadamente el 25% de la sangre que recibe el hígado proviene de la arteria hepática, mientras que el 75% restante proviene de la vena porta (6).

La vena mesentérica y la vena esplénica recolectan la sangre de órganos como el páncreas, el bazo, el tracto gastrointestinal y la vesícula biliar. Después, estas venas convergen en la vena porta, la cual transporta nutrientes, toxinas y otras sustancias hacia el hígado (4,5,15). La arteria hepática es una rama del tronco celiaco que transporta sangre rica en oxígeno hacia el hígado (5,11).

La sangre de la arteria hepática y la vena porta son combinadas antes de fluir sobre las células del lobulillo, proporciona oxígeno y nutrientes a las células del sinusoides. Por otro lado, la sangre recolecta los productos metabolizados que son liberados al lumen sinusoidal, llevados a la vena central y posteriormente a la vena cava (6,8).

### **1.3. Las enfermedades crónicas del hígado**

Los diversos daños ocasionados a las células del hígado llevan al desarrollo de enfermedades del órgano y conducen a la desregulación de la homeostasis en el cuerpo (22). Las diversas enfermedades del hígado causan alrededor de 2 millones de muertes al año y representan el 4% de todas las muertes a nivel mundial (23). Las enfermedades crónicas del hígado causan la mayor parte de las muertes. Entre las principales enfermedades crónicas son las infecciones por virus como el de la hepatitis B (VHB) y la hepatitis C (VHC), la enfermedad por consumo excesivo de alcohol, la enfermedad de hígado graso no alcohólico (EHGNA), la cirrosis, la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) y el cáncer (13,23).

### **1.4. La enfermedad de hígado graso no alcohólico**

La EHGNA afecta aproximadamente a una cuarta parte de la población mundial. La prevalencia de esta enfermedad en las diferentes regiones dependerá de la variación genética generada por los diversos factores como el estilo de vida, la etnia y la región geográfica, entre otros (23). Esta enfermedad presenta dos categorías histológicas, la primera conocida como hígado graso simple que se caracteriza por la acumulación anormal de lípidos en los hepatocitos. La segunda presenta esteatosis y procesos inflamatorios, esta categoría es conocida como EHNA (17,24).

La EHGNA es la enfermedad más común del hígado, la prevalencia es del 30% en la población adulta y entre el 70-90% en la población con obesidad y diabetes (17,25). La EHGNA presenta una mayor prevalencia en hombres que en mujeres, con un 39.7% y un 25.6%, respectivamente (26).

En México y Brasil se han reportado mayores prevalencias de esta enfermedad, mientras que en Canadá y Argentina se reportaron las menores prevalencias. La EHGNA puede estar presente, aunque no exista obesidad o algún síndrome metabólico. Sin embargo, en la mayor parte de los casos se encuentra acompañada de la diabetes y la obesidad (23,24).

La EHGNA es una enfermedad que en la actualidad no tiene un tratamiento eficaz, pero un cambio en el estilo de vida, realizar ejercicio físico y mantener una

alimentación balanceada tendrá un efecto positivo en la vida de las personas que la padezcan (27).

### **1.5. La esteatohepatitis no alcohólica**

La EHNA es una enfermedad crónica que se origina a partir de un hígado graso simple. Esta enfermedad es causada por un alto consumo de colesterol, carbohidratos simples, grasas saturadas y trans, acompañada de un estilo de vida sedentario. En esta condición el hígado presenta una acumulación lipídica o esteatosis en el 5% o más de los hepatocitos, desarrolla procesos inflamatorios y, además, puede o no existir fibrosis (24,28). Los factores genéticos, los ambientales, los metabólicos, y la microbiota intestinal juegan un papel muy importante en el desarrollo de esta enfermedad (24).

Aproximadamente el 30% de las personas con hígado graso simple desarrolla EHNA y aproximadamente el 20% de los pacientes con EHNA presentan cirrosis (25,29). La EHNA es considerada la segunda causa más común para realizar el trasplante de hígado y posiblemente en años futuros sea la causa principal (30). La EHNA es una enfermedad que puede desencadenar el desarrollo de la cirrosis, y posiblemente cáncer hepatocelular, y por consecuencia la muerte del paciente (25,31).

#### **1.5.2. La fisiopatología de la esteatohepatitis no alcohólica**

El inicio y el desarrollo de la EHNA no se conocen exactamente, pero se han propuesto diversas teorías. La teoría inicial es la de los “dos golpes” que se originó hace mucho tiempo, aunque ya no es aceptada. El primer golpe es producido a partir de la acumulación anormal de los triglicéridos, los ácidos grasos y el colesterol derivado de los hábitos alimentarios y el estilo de vida sedentaria (18). El segundo golpe se encuentra aparentemente relacionado con la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS), la activación de factores inflamatorios (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-17) y el factor profibrogénico TGF- $\beta$ , que conducen a la activación de las células estelares y con ello a la fibrosis (18). Por el contrario, ahora se habla de la teoría de “múltiples golpes”, la cual es la más aceptada y comprende a los factores genéticos y ambientales, el estilo de vida, la obesidad y la alteración de la microbiota

intestinal (32-34). Los múltiples golpes producen estrés oxidativo en el hígado lo que conduce al daño a las proteínas y al ácido desoxirribonucleico (DNA) (34).

Los lípidos se dividen de acuerdo con la longitud de la cadena de átomos de carbono en ácidos grasos de cadena corta y ácidos grasos de cadena larga. Los ácidos grasos de cadena larga se esterifican con el glicerol 3-fosfato dando origen a monoacilgliceroles, diacilgliceroles, y triacilgliceroles (35). La lipotoxicidad de ácidos grasos libres como las ceramidas, las lisofosfatidilcolinas y los ácidos grasos libres de cadena corta inducirán a la muerte celular, promoverán el aumento de la resistencia a la insulina y el aumento en la producción de las ROS (25,34,35).

El aumento de la resistencia a la insulina en el tejido adiposo produce un aumento en la liberación de ácidos grasos libres, los cuales activan la vía del factor nuclear kappa B (NF-κB) en el hígado (36). La vía del NF-κB se encuentra involucrada en diversos procesos biológicos, entre ellos la inflamación, la proliferación y la muerte celular (37). La fibrosis y la inflamación del hígado son también provocadas por el transporte de productos bacterianos. Estos productos viajan a través de la vena porta y activan al receptor tipo Toll en el hígado, y desencadenan la activación de la vía del NF-κB (38).

En pacientes con EHNA se ha encontrado que existe una desregulación o disbiosis en la microbiota intestinal, por lo que se sugiere que existe una relación muy estrecha entre la EHNA y la disbiosis en los pacientes (18).

### **1.6. El cáncer de hígado**

El cáncer de hígado es una enfermedad maligna y de muy pobre pronóstico, es la causa principal de 900,000 muertes al año a nivel mundial (23,39,40). Además, ocupa el séptimo lugar en incidencia y el cuarto lugar en mortalidad en la clasificación de los tipos de cáncer (41). Este tipo de cáncer representa en hombres el segundo lugar en mortalidad (23). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) la relación mortalidad-incidencia alcanza el 91.6% (42).

Existen dos tipos de cáncer primario de hígado, el cáncer hepatocelular (CHC) y el colangiocarcinoma hepático (32). El CHC representa aproximadamente el 90% de

los tipos de cáncer de hígado, con un pobre pronóstico debido a que la mayoría de los casos son diagnosticados en etapas avanzadas de la enfermedad (39).

En el 10% de los pacientes con CHC pueden presentar metástasis en los huesos, los pulmones, y las glándulas adrenales (43). Diversos tipos de cáncer como el de mama, esófago, estómago, páncreas, riñón y pulmón pueden producir metástasis hacia el hígado y provocar un cáncer secundario. Sin embargo, el más común es el cáncer colorrectal, donde aproximadamente el 70% de los pacientes con este tipo de cáncer desarrolla metástasis en el hígado (32).

### **1.6.1. La fisiopatología del cáncer hepatocelular**

Los principales factores de riesgo para el desarrollo del CHC incluyen a la infección por el VHB y el VHC, la EHGNA, la EHNA, la obesidad, la diabetes, el tabaquismo, la predisposición genética y el consumo excesivo y crónico del alcohol, carbohidratos simples y grasas (32,40). La prevalencia de la EHNA está tomando mayor relevancia en el origen del cáncer (23). La inflamación juega un papel muy importante en el inicio, la progresión y la invasión del cáncer, donde el factor maestro de la inflamación es el NF- $\kappa$ B (44).

El aumento en los niveles de la insulina en las enfermedades del hígado como la EHGNA y la EHNA puede activar vías moleculares que promueven el CHC. La insulina promueve la activación del receptor de la insulina tipo A, el cual es un receptor tirosina cinasa que se encuentra expresado en diferentes tipos de cáncer. Este receptor activa la vía de señalización de la cinasa del 3 fosfatidilinositol (PI3K) / proteína cinasa B (Akt). Dicha vía se ha encontrado sobreactivada en diferentes tipos de cáncer y mantiene a las células cancerígenas en un estado anti-apoptótico y proliferativo (34).

Algunas enfermedades genéticas hereditarias aumentan el riesgo a desarrollar CHC. Por ejemplo, la deficiencia de la alfa 1 antitripsina se relaciona con la disfunción mitocondrial de los hepatocitos y la alteración en la regulación de la ciclina D (32). La hepatitis autoinmune es una enfermedad crónica del hígado, donde el propio sistema inmunológico ataca a las células hepáticas. La hemocromatosis es una enfermedad en la que existe un aumento en la absorción

del hierro, esto incrementa el almacenamiento de este metal en el hígado y como consecuencia favorece el inicio de la inflamación y la producción de las ROS (32).

El CHC se divide en 5 etapas de acuerdo con la cantidad de nódulos y la funcionalidad del hígado. La etapa muy temprana se caracteriza por la presencia de un único nódulo <2 cm. La etapa temprana presenta entre 2-3 nódulos <3 cm. La etapa intermedia presenta múltiples nódulos. La etapa avanzada se caracteriza por múltiples nódulos e invasión portal y en la etapa terminal el trasplante de hígado no es posible, además la función del hígado se encuentra deteriorada (42).

La etapa temprana del CHC no presenta síntomas, sin embargo, en la etapa intermedia y avanzada se presentan algunos síntomas como dolor abdominal, pérdida de peso corporal, coagulopatía, ascitis, ictericia y encefalopatía (43).

### **1.6.2. La epidemiología del cáncer hepatocelular**

El CHC tiene una diferencia muy pequeña entre el número de muertes y el número de casos reportados, por tanto, el grado de fatalidad de esta enfermedad es muy grave. En el año 2020 se reportó un total de 905,677 casos y 830,180 muertes relacionadas al CHC (23). A nivel mundial, la relación de los casos entre los hombres y las mujeres es de 2.8:1, respectivamente (32). El 72% de los casos de CHC reportados son en la población que habita en Asia (39).

El 2.6% de los pacientes con EHNA desarrollan CHC y aproximadamente entre el 80-90% de los pacientes con CHC son pacientes que presentan cirrosis (32). Del total de los casos con CHC se le atribuye un 40% a la infección del VHB, otro 40% a la infección del VHC, el 11% a problemas con el alto y crónico consumo del alcohol y el 9% debido a otros factores. Sin embargo, los porcentajes del VHB y el VHC han disminuido, debido a la vacunación contra el VHB y al tratamiento eficaz contra el VHC (23). El aumento de la prevalencia de la EHNA, la EHNA y la obesidad muestran una mayor relevancia en los nuevos casos de CHC (23).

En Estados Unidos de América aproximadamente el 65% de los pacientes con CHC son diagnosticados entre los 55-74 años. En África el diagnóstico oscila entre los 45 años, y en Oceanía a una edad menor, a los 40 años (23). Cuando el diagnóstico

se lleva a cabo en etapa temprana, solo entre 5-15% de los pacientes son candidatos a la resección del hígado (40).

### **1.6.3. El tratamiento del cáncer hepatocelular**

El principal tratamiento para disminuir el riesgo a desarrollar CHC es el cambio en la alimentación, evitar el consumo de alcohol y fructosa y el aumento en el consumo de las frutas y los vegetales. Algunos componentes de las frutas y los vegetales pueden tener efectos benéficos y disminuir el riesgo a desarrollar este tipo de cáncer (40).

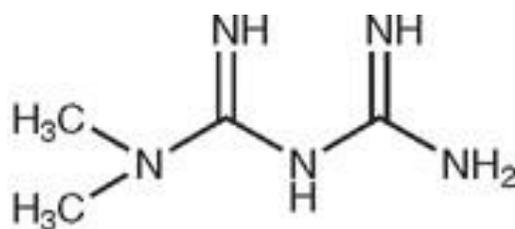
Los tratamientos actuales del CHC son la resección parcial y el trasplante del órgano, la ablación por radiofrecuencia, la quimioembolización transarterial y la quimioterapia (40,42). El tratamiento que se le proporciona a los pacientes depende del estado de la enfermedad (42).

El tratamiento en etapas tardías de la enfermedad es la quimioterapia. El sorafenib y lenvatinib son los fármacos de primera línea en la etapa tardía (42). El sorafenib es un inhibidor de tirosinas cinasas (TKI), aprobado en el 2007 en Estados Unidos por la administración de alimentos y medicamentos (FDA) para combatir el cáncer de hígado primario. La combinación del uso de la quimioembolización transarterial y el sorafenib tiene un mayor efecto contra este tipo de cáncer, a comparación del sorafenib solo. La toxicidad y la resistencia a estos fármacos quimioterapéuticos es común en este tipo de cáncer, lo que resulta en la recurrencia y la metástasis (40). Además, el paciente tratado con estos fármacos puede llegar a presentar eventos indeseados como hemorragias, neuropatía, leucopenia, diarreas, náuseas, vómitos, e hipertensión (40,42).

El 5-fluorouracilo es un fármaco usado en diversos tipos celulares de cáncer. Diversos estudios clínicos en diferentes fases se han realizado para encontrar alternativas de este fármaco en el tratamiento para el CHC (40). La combinación de fármacos es una estrategia para encontrar nuevas alternativas para combatir el CHC (45). Por lo que una combinación con los dos fármacos siguientes podría ser interesante para conocer sus efectos contra esta enfermedad.

## 1.7. La metformina

La metformina es el fármaco más utilizado desde hace varios años en el tratamiento de primera línea contra la diabetes mellitus tipo 2 (46). Este fármaco es una molécula con un peso molecular de 129.16 g/mol, formada por dos guanidinas y con una alta solubilidad en agua (Fig.5). La guanidina deriva de la galegina, la cual es extraída de la planta French lilac (*Galega officinalis*) (46-48). La metformina fue sintetizada en el año 1922. En el año 1957 el médico Jean Sterne publicó acerca del efecto hipoglucemiante de la metformina y comenzó a utilizarla en el tratamiento de la diabetes tipo 2 (48,49). La FDA aprobó la metformina en el año 1994 y en el año 2011 la OMS la añadió a la lista de medicinas esenciales (46,50).



**Fig. 5 La estructura química de la metformina.** Imagen tomada de (51).

La metformina, la fenformina y la buformina son hipoglucemiantes derivados de la planta French lilac (46). La metformina demostró tener un efecto bajo, por lo que se necesitan altas dosis de este fármaco. En Europa y Estados Unidos comenzaron las pruebas clínicas con fenformina y buformina. Sin embargo, en las pruebas clínicas los pacientes presentaron acidosis láctica severa, por lo que las pruebas fueron canceladas. El médico Jean Sterne afirmó que la metformina es menos potente pero más segura, por lo que es menos probable que la acidosis láctica se presente con el uso de este fármaco (50).

La metformina puede ser administrada por sí sola o en combinación con otros fármacos antidiabéticos, inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa, insulina, agonistas del péptido similar al glucagón o las tiazolidinedionas (52). La metformina es un fármaco prometedor en el tratamiento de los diferentes tipos de cáncer, el envejecimiento, las enfermedades neurodegenerativas, las enfermedades cardiovasculares, y así también en la disminución de lípidos y la pérdida del peso corporal (50).

### **1.7.1. El mecanismo de acción de la metformina**

Se reportó en la literatura científica que uno de los mecanismos de acción de la metformina es por medio de la gluconeogénesis, dando como resultado la inhibición de la producción de la glucosa endógena. Además, la metformina disminuye la síntesis de ácidos grasos y triglicéridos y la captura de la glucosa en el intestino y aumenta la sensibilidad a la insulina y la  $\beta$ -oxidación (46,52,53).

El mecanismo de acción de la metformina no ha sido descubierto en su totalidad, pero se conoce que tiene efecto sobre la proteína cinasa activada por el AMP (AMPK) (54). La AMPK es una proteína sensora de la homeostasis energética que regula el metabolismo de la glucosa y los lípidos (52). Sin embargo, es muy poco probable que la metformina se una directamente a la AMPK. Se ha descubierto que la metformina actúa sobre la cinasa 1 del hígado (LKB1) (50). Esta cinasa es la responsable de fosforilar a la Thr172 de la AMPK y activarla. La LKB1 es una diana importante en la acción de la metformina (50). Sin embargo, se ha demostrado que el efecto de la metformina en la disminución de la glucosa sérica puede ser independiente y dependiente de la acción sobre la LKB1 (52).

El mecanismo más reconocido de la metformina es el bloqueo del complejo 1 de la cadena respiratoria, reduce la producción de trifosfato de adenosina (ATP) y aumenta los niveles del monofosfato de adenosina (AMP) y el difosfato de adenosina (ADP) (55). El aumento de la relación AMP/ATP conduce a la inhibición del glucagón y a la activación de la AMPK en el músculo esquelético, el hígado, el tejido adiposo, los islotes de células beta del páncreas, el corazón, y el sistema nervioso (53,55). La metformina disminuye la producción de las ROS en la mitocondria por medio de la inhibición del complejo 1 de la cadena respiratoria, contrario al aumento de las ROS provocado con el uso experimental de la rotenona (inhibidor del complejo 1 de la cadena respiratoria) (46).

Se ha reportado que la activación de la AMPK no es necesaria para disminuir la glucosa en sangre (54). Por lo que la acción de la metformina para disminuir la glucosa en la sangre puede ser independiente y dependiente de la activación de la

AMPK. Se ha descrito también que la metformina a bajas dosis activa a la AMPK y por lo tanto aumenta la relación de AMP/ATP (46).

La activación de la AMPK inhibe a la HMG-CoA reductasa, la diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR), la glicerol-3-fosfato aciltransferasa. También, inhibe a la proteína 1 de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP-1) que es un factor de transcripción relacionado a la activación de la lipogénesis (52).

Los efectos propuestos derivados de la activación de la AMPK es la inhibición de los genes que influyen en la gluconeogénesis y la fosforilación de las enzimas acetil-CoA carboxilasa tipo 1 y 2. Estas últimas enzimas se encuentran relacionadas con la lipogénesis, lo que resultaría en la disminución de diacilglicérols en el hígado y el aumento en la sensibilidad a la insulina (50). Además, se sugiere que la metformina disminuye la actividad de las enzimas gluconeogénicas (54).

Asimismo, la metformina tiene efectos en el intestino, altera la composición de la microbiota intestinal y la secreción de hormonas necesarias para la captura de la glucosa. El efecto sobre la captura de la glucosa se produce por el aumento de la secreción del factor de diferenciación de crecimiento 15, el cual induce la disminución del apetito y la regulación de la glucosa. Se ha propuesto que, la metformina altera la composición de la microbiota intestinal al actuar sobre la captura de la glucosa en el intestino (50).

### **1.7.2. La farmacocinética de la metformina**

La metformina tiene un límite de dosis de 2 g/día, después de una dosis de 0.5-1 g, el tiempo máximo (T<sub>max</sub>) es de aproximadamente 3 horas y un tiempo de vida media (t<sub>1/2</sub>) de 6-7 horas (46,49). La absorción de la metformina después de la administración oral es llevada a cabo en el intestino, especialmente en el duodeno y yeyuno (47).

La metformina es una molécula hidrofílica con carga positiva en condiciones fisiológicas, lo que la convierte en una molécula incapaz de atravesar la membrana celular (46). El transportador de cationes orgánicos (OCT) tipo 1, el OCT3, y el transportador de monoaminas en la membrana plasmática (PMAT) son los

responsables de la captura de la metformina en diferentes órganos. El OCT1 es expresado en el intestino, el riñón y el hígado (50). El OCT3 se encuentra expresado en el riñón, el hígado, el músculo esquelético y el corazón. El PMAT se encuentra expresado en el riñón y el intestino (53).

La metformina después de ser absorbida es transportada por la vena porta hacia el hígado donde es capturada por el OCT1 y posiblemente por el OCT3. En el hígado, la metformina no sufre el efecto de la metabolización (46,50). Esta molécula presenta una biodisponibilidad del 50-60%, pero podría ser disminuida por la ingesta de comidas altas en grasas (50,51).

El estudio farmacocinético sobre la distribución de la metformina, en la cual la metformina fue marcada con  $^{14}\text{C}$  y fue realizada en ratones, mostró una acumulación en el riñón, en el tracto gastrointestinal y mayormente en el hígado (46). En menor cantidad se puede encontrar en el bazo, el músculo y los pulmones. Los eritrocitos también funcionan como compartimentos de almacenamiento donde la metformina es capturada (51).

La metformina llega al riñón donde es capturada por el OCT2 de las células renales y después excretada a la orina por el transportador de extrusión de toxinas y múltiples fármacos (MATE) tipo 1 y el MATE2-K, expresados en las células del túbulo proximal (46,52). El 20% de la metformina administrada es recapturada en el riñón y el 80% es eliminada (49). El 95% de la metformina es eliminada al pasar 8 horas después de la administración (51). Por lo tanto, se debe de ajustar la dosis de este fármaco de acuerdo con la función renal y la edad de las personas que reciben el tratamiento (47,51).

La acción de la metformina puede ser alterada por el polimorfismo de un solo nucleótido (rs622342) del OCT1, al modificar la farmacocinética y por tanto disminuir su acción (50,51). Además, una variación en el gen (G>A, rs2289669) que codifica para el MATE1 puede aumentar el efecto de la metformina al disminuir su eliminación (46,51). El polimorfismo del nucleótido único de las subunidades de la AMPK modifica la actividad de la metformina (46).

La cimetidina, los antihistamínicos, los antidepresivos y los analgésicos opiáceos podrían producir interacción farmacológica con la metformina. La cimetidina bloquea al OCT2 y provoca una disminución en la eliminación de la metformina. La metformina disminuye la eliminación de las anfetaminas (51). Los fármacos antidiabéticos como la repaglinida y la rosiglitazona y los fármacos inhibidores de la bomba de protones bloquean al OCT1 en estudios in vitro, lo que afecta la captura de la metformina (52).

### **1.7.3. Los efectos adversos de la metformina**

El 60% de los pacientes tratados con la metformina presentan efectos adversos gastrointestinales, y un 5% presentan intolerancia a la metformina (50). Entre los efectos gastrointestinales se encuentran la irritación gastrointestinal, las náuseas, los vómitos y las diarreas (47). La acidosis láctica es un efecto adverso severo de la metformina, pero presenta una incidencia muy baja de 1.5/100,000 personas al año (47,56). El tratamiento a altas dosis y prolongado provoca una deficiencia de vitamina B12 (47). Es recomendable que la administración oral de la metformina sea acompañada por el consumo de alimentos para disminuir los efectos adversos (51).

### **1.7.4. El efecto de la metformina sobre el cáncer**

El efecto de la metformina es la disminución en la producción de la glucosa, lo que desencadena cambios biológicos en el cáncer. Sin embargo, la acción anticancerígena de la metformina no se basa en el efecto sobre la glucosa sérica, debido a que otros hipoglucemiantes no tienen el mismo efecto anticancerígeno (34,46). El uso de la metformina en el cáncer ha sido controversial, debido a que las conclusiones se basan en los resultados del tratamiento de pacientes diabéticos (46).

La metformina produce apoptosis y el bloqueo de la angiogénesis y del ciclo celular de células tumorales en diferentes tipos de cáncer (47). Además, promueve el arresto del ciclo celular e inhibe el crecimiento celular del cáncer mediante la activación de la AMPK y la disminución de la ciclina D. La acción de la AMPK sobre la mTOR inhibe a las oncoproteínas en las células de cáncer de mama (52).

Algunos estudios retrospectivos y metaanálisis han reportado que el uso de la metformina muestra efectos benéficos en pacientes con algún tipo de cáncer, como el de páncreas, el de mama, el de hígado y el de pulmón. Sin embargo, es necesario realizar más estudios con la metformina para conocer sus mecanismos anticancerígenos (47).

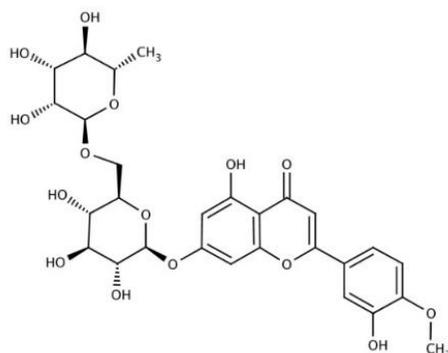
En un estudio de ensayo clínico en fase 2 (NCT03071705), la metformina ha demostrado tener efecto en el aumento del tiempo de supervivencia en los pacientes con cáncer de pulmón. El estudio fue llevado a cabo en pacientes con cáncer de pulmón con mutación en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF). Estos pacientes fueron divididos aleatoriamente en pacientes que recibirían la administración de TKI más la metformina y pacientes que solo recibirían el TKI. Los pacientes que recibieron el TKI más la metformina mostraron un aumento en el tiempo de supervivencia libre de progresión de la enfermedad. Por el contrario, los pacientes que solamente recibieron la administración del TKI mostraron un menor tiempo (57).

La acción de la metformina se exploró en un modelo de ratas resistentes a la insulina que presentaron EHNA y cirrosis. Las ratas recibieron la administración del tetracloruro de carbono ( $CCl_4$ ) y una dieta con un alto contenido de sacarosa y grasas. La administración de la metformina a una dosis de 200 mg/Kg de peso corporal mostró tener efectos positivos al aumentar la sensibilidad a la insulina y disminuir la concentración de la glucosa en la sangre. Además, este compuesto reguló a la alza el glucógeno, disminuyó los marcadores de estrés oxidativo en el hígado e interrumpió la vía de señalización PI3K/Akt (58).

### **1.8. La diosmina**

La diosmina, también llamada venosmina, es un glucósido de flavona con un peso molecular de 608.549 g/mol (Fig. 6) (59). Esta es una molécula que se encuentra presente en el pericarpio de diversas frutas cítricas como las naranjas, las mandarinas y los limones (59,60). También se puede obtener de la hesperidina mediante una reacción de oxidación. La hesperidina es una molécula muy similar

tanto estructural como químicamente a la diosmina y a menudo ambos compuestos son utilizados en combinación (60,61).



**Fig. 6 La estructura química de la diosmina.**

La diosmina fue aislada por primera vez en el año 1925 de la planta herbácea *Scrophularia nodosa*. Además, en el año 1969 fue utilizada por primera vez en el tratamiento de desórdenes inflamatorios. Actualmente la diosmina es utilizada en el tratamiento de desórdenes circulatorios como la insuficiencia venosa crónica, las hemorroides y las venas varicosas (60,62).

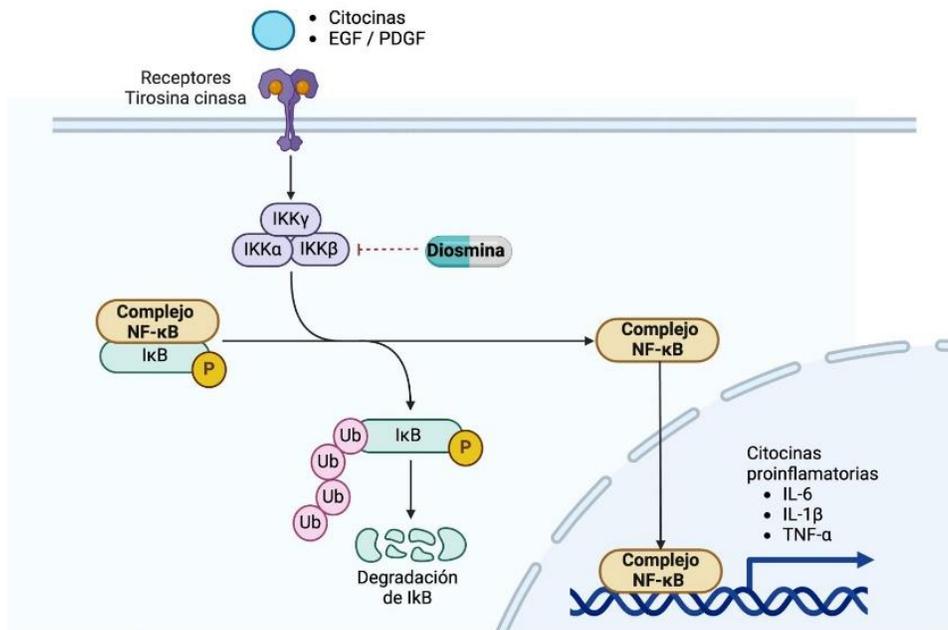
La diosmina ha demostrado regular los parámetros del perfil de lípidos al disminuir la concentración en la sangre de los triglicéridos, la lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), la lipoproteína de baja densidad (LDL) y aumentar la lipoproteína de alta densidad (HDL) (60). Además, ha demostrado tener efecto antioxidante, antidiabético, anticancerígeno, antifibrótico, y en la protección cardiovascular (62,63).

### **1.8.1. El mecanismo de acción de la diosmina**

Los efectos de la diosmina reportados en la literatura científica son disminuir el diámetro y la presión de vasos linfáticos, aumentar la peristalsis, inhibir la adhesión de leucocitos y actuar sobre el tono de las venas inhibiendo a la norepinefrina. Los efectos de la diosmina dependerán de la dosis administrada (64).

Las citocinas, el EGF y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) pueden activar al receptor de tirosina cinasa. La activación de este tipo de receptor actuará sobre la cinasa inhibitoria del NF- $\kappa$ B (IKK), dando origen a la activación de

la vía del factor proinflamatorio NF- $\kappa$ B (65). Se ha reportado que la diosmina bloquea a la IKK y así inhibe la activación del NF- $\kappa$ B (Fig. 7) (63). Mediante la técnica de docking molecular se sugiere que la diosmina inhibe al complejo IKK por interactuar con los aminoácidos Leu21, Val29, Val152, Ile165 a una concentración inhibitoria 50 de 3.89  $\mu$ M (63). La administración de la diosmina presenta efectos positivos sobre la pancreatitis inducida en ratones al disminuir la actividad de la vía del NF- $\kappa$ B y al disminuir los niveles de citocinas proinflamatorias, tales como la IL-6, la IL-1 $\beta$ , y el TNF- $\alpha$  (63).



**Fig. 7 El mecanismo de acción de la diosmina sobre la vía del NF- $\kappa$ B.** La vía del NF- $\kappa$ B puede ser activada por diversas citocinas y factores de crecimiento, los cuales activan a los receptores tirosinas cinasas. Una vez activado este tipo de receptor actuará sobre la IKK, y se liberará a la subunidad  $\beta$ . Esta cinasa cuenta con tres subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), la subunidad  $\beta$  liberada será capaz de fosforilar al I $\kappa$ B. El I $\kappa$ B al sufrir una fosforilación en su residuo de serina, pierde afinidad hacia el NF- $\kappa$ B, se ubiquitina y se degrada por el proteasoma. Una vez liberado el NF- $\kappa$ B, se transloca al núcleo e inicia la transcripción de interleucinas y el TNF- $\alpha$ . La diosmina inhibe la separación de la subunidad  $\beta$  de la IKK lo que resulta en un bloqueo en la vía proinflamatoria del NF- $\kappa$ B. (EGF) factor de crecimiento epidérmico, (PDGF) factor de crecimiento derivado de plaquetas, (NF- $\kappa$ B) factor nuclear kappa B, (IKK) cinasa del inhibidor del NF- $\kappa$ B, (I $\kappa$ B) inhibidor del NF- $\kappa$ B, (Ub) ubiquitina,

(P) grupo fosfato, (IL-6) interleucina 6, (IL-1 $\beta$ ) interleucina 1-beta, (TNF- $\alpha$ ) factor de necrosis tumoral alfa.

### **1.8.2. La farmacocinética de la diosmina**

Cuando la diosmina es administrada por vía oral, la baja solubilidad de la molécula en agua disminuye la capacidad de absorción. Las enzimas de la microbiota intestinal hidrolizan a la molécula de la diosmina y la convierten en diosmetina. La diosmetina es capaz de atravesar la membrana rápidamente por difusión pasiva y entrar a la circulación sanguínea. La diosmina tiene un  $t_{1/2}$  de 26-42 horas, debido a la alta afinidad por la albumina sérica (59,62).

La diosmina es metabolizada por el citocromo CYP1A1, el CYP1A2, el CYP1B1, pero mayormente por el CYP3A4 y el CYP2C9. La diosmina sufre reacciones de metilación, hidroxilación y desmetilación, entre otras (62). La desmetilación de la diosmina resulta en la luteolina, la cual presenta actividades biológicas sobre las enfermedades inflamatorias, las cardiovasculares y el cáncer. Otro metabolito es la diosmetina-7-O-glucurónido la cual tiene efecto hepatoprotector (62,63,66).

La excreción de la diosmina es llevada a cabo mayormente por la vía renal (65%) y biliar (35%) (64). La diosmina es convertida a ácidos fenólicos o derivados conjugados de la glicina para su eliminación (59). Se han encontrado 64 metabolitos de la diosmina y 46 de la diosmetina en la orina, la sangre y las heces (62). La diosmetina 3-O-glucurónido es el metabolito encontrado en mayor concentración en la sangre y la orina, seguido de la diosmetina 7-O-glucurónido, y por último a muy baja concentración (2%) la diosmetina 3,7-O-glucurónido (67).

El diclofenaco sódico, el metronidazol, la warfarina, la fenitoína y la carbamazepina son algunos de los fármacos que presentan interacciones con la diosmina por compartir a los citocromos CYP2C9 y el CYP3A4 (62,63).

### **1.8.3. Los efectos adversos de la diosmina**

El uso continuo y extenso de la diosmina no presenta ningún peligro para la salud, debido a que es un fármaco muy seguro con una dosis de letalidad en humanos mayor a 3000 mg/Kg de peso corporal (62). Sin embargo, se pueden presentar

efectos adversos gastrointestinales como malestar del estómago, acidez del estómago, náuseas y vómitos (68).

#### **1.8.4. El efecto de la diosmina sobre el cáncer**

Se reporta que la diosmina mejora la calidad de vida de los pacientes que reciben quimioterapia (62). Además, presenta otros efectos dependientes de las dosis en diferentes tipos de cáncer como el de mama, colon, próstata, entre otros (59). La diosmina promueve la senescencia en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama (62). También, induce apoptosis en la línea celular A431 de cáncer de piel, y en las líneas celulares MDA-MB-231 y SK-BR-3 de cáncer de mama (69). La diosmina a una concentración de 250  $\mu$ M disminuyó un 60% en la viabilidad de la línea celular DU145 de cáncer de próstata (62). Además, promueve la apoptosis en la línea celular HA22T de cáncer de hígado y suprime el crecimiento tumoral en los ratones (43,62).

La diosmina causa la apoptosis, el arresto del ciclo celular y aumenta los niveles de proteínas inhibidoras del ciclo celular como p53, p21 y p27 en las líneas celulares MCF-7, MDA-MB-231 y SK-BR-3 de cáncer de mama (70). Este compuesto presenta efecto antiproliferativo en las células de cáncer de colon y actividad antimetastásica en melanoma pulmonar (59). También se ha reportado que la diosmina inhibe la proliferación celular al bloquear la vía de señalización de la PI3K/Akt en células hepáticas HA22T, lo que conduce a un arresto del ciclo celular debido también al aumento en la activación de p53 (59,69).

## **II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El CHC es una enfermedad a nivel mundial con muy poca esperanza de vida, se ha reportado que el número de muertes por CHC es similar al número de casos reportados. Los tratamientos existentes contra el CHC no son muy efectivos, conducen a la resistencia de la enfermedad y a la toxicidad por los mismos fármacos. Por este motivo es importante investigar la acción de otros fármacos en esta enfermedad, con el fin de ampliar las posibilidades de tratamiento del CHC.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

El CHC es uno de los tipos de cáncer con mayor mortalidad a nivel mundial, por lo tanto, es necesario encontrar alternativas terapéuticas que sean eficaces y económicas. Por esta razón, en el presente estudio evaluamos el posible efecto benéfico de la metformina y la diosmina, administrados tanto individualmente como en combinación, en un modelo de EHNA conducente a CHC.

### **IV. HIPÓTESIS**

El tratamiento con la diosmina y la metformina prevendrá el establecimiento del CHC, con un mayor efecto cuando los compuestos sean administrados juntos.

### **V. OBJETIVOS**

#### **5.1. Objetivo general**

Evaluar el efecto farmacológico de la metformina y la diosmina en un modelo de EHNA conducente a CHC.

#### **5.2. Objetivos específicos**

- Reproducir el modelo de EHNA conducente a CHC.
- Determinar el efecto farmacológico de la metformina en el modelo de EHNA conducente a CHC.
- Determinar el efecto farmacológico de la diosmina en el modelo de EHNA conducente a CHC.
- Evaluar el posible efecto terapéutico producido al administrar la metformina y la diosmina juntos en el modelo de EHNA conducente a CHC.

### **VI. METODOLOGÍA**

#### **6.1. Animales de experimentación**

El presente estudio fue realizado con ratas de laboratorio Fischer 344 machos, las cuales fueron proporcionadas por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL), del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN). El protocolo de

investigación (310-20) fue revisado y aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del CINVESTAV. Los procedimientos realizados a los animales de experimentación fueron bajo los lineamientos de la NOM-062-ZOO-1999 “Consideraciones Técnicas para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio”.

Las ratas de experimentación fueron colocadas en cajas de polietileno One cage 1200 (2 ratas por caja), bajo una temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , en una humedad relativa del 50-60% y ciclos de luz-obscuridad de 12 horas. El acondicionamiento de las ratas fue llevado a cabo durante dos semanas antes de iniciar la experimentación.

## **6.2. Reactivos**

El alimento Labdiet® número 5053, fue proporcionado por la UPEAL del CINVESTAV. La caseína utilizada fue de la marca Rennet®. El colesterol y el colato de sodio utilizados fueron adquiridos de Sigma® Aldrich con números de catálogo C8503 y C1254, respectivamente. La sacarosa utilizada fue de la marca Zulka® Glass y la mantequilla sin sal fue de la marca Gloria®. El  $\text{CCl}_4$  y la dietilnitrosamina (DEN) fueron adquiridos de Sigma® Aldrich con números de catálogo 319961 y N0756, respectivamente. El petrolato líquido utilizado como vehículo fue adquirido de reactivos química MEYER con número de catálogo 7110. La diosmina fue adquirida de Santa Cruz Biotechnology® con número de catálogo sc-204728A y la metformina fue donada por Ashland Chemical de México.

## **6.3. Diseño experimental**

El modelo de EHNA conducente a CHC fue llevado a cabo con la administración de un alimento con alto contenido de grasas, colesterol y carbohidratos simples (dieta). También, con la administración de los compuestos químicos hepatotóxicos como el  $\text{CCl}_4$  y la DEN.

La dieta fue preparada en el laboratorio 15 del Departamento de Farmacología del CINVESTAV, con los ingredientes que se muestran en la tabla 1. El alimento Labdiet® fue triturado y posteriormente todos los ingredientes fueron mezclados, en el orden que se indica en la tabla 1. Una vez que todos los ingredientes fueron mezclados, se le añadió carboximetilcelulosa (CMC) al 3% como espesante para

obtener una masa homogénea con una consistencia viscosa. Al obtener la masa homogénea y pastosa se le dio la forma de pellets, los cuales fueron mantenidos durante 2 días en un horno marca Riossa® a una temperatura de 50°C para su secado. A los 2 días, los pellets se sacaron del horno y se dejaron secar por 2 días más a temperatura ambiente.

Preparación de la dieta con alto contenido de grasas, colesterol y carbohidratos simples	
Ingrediente	Cantidad (%)
Labdiet ®	53.5
Caseína	10
Colesterol	1
Colato	0.5
Sacarosa	30
Mantequilla	5

**Tabla 1. Los porcentajes de los ingredientes en la preparación de la dieta con alto contenido de grasas, colesterol y carbohidratos simples.**

Las ratas en experimentación se dividieron aleatoriamente en 7 grupos (n=7) de acuerdo con la tabla 2. El estudio tuvo un tiempo de experimentación de 16 semanas.

Grupo	Tratamiento
Control	Alimento Labdiet®.
Daño	Dieta + DEN + CCl <sub>4</sub> .
Daño + metformina	Dieta + DEN + CCl <sub>4</sub> + metformina.
Daño + diosmina	Dieta + DEN + CCl <sub>4</sub> + diosmina.
Daño + metformina + diosmina	Dieta + DEN + CCl <sub>4</sub> + metformina + diosmina.
Control metformina	Metformina + alimento Labdiet®.
Control diosmina	Diosmina + alimento Labdiet®.

**Tabla 2. Los grupos de estudio y tratamientos correspondientes.**

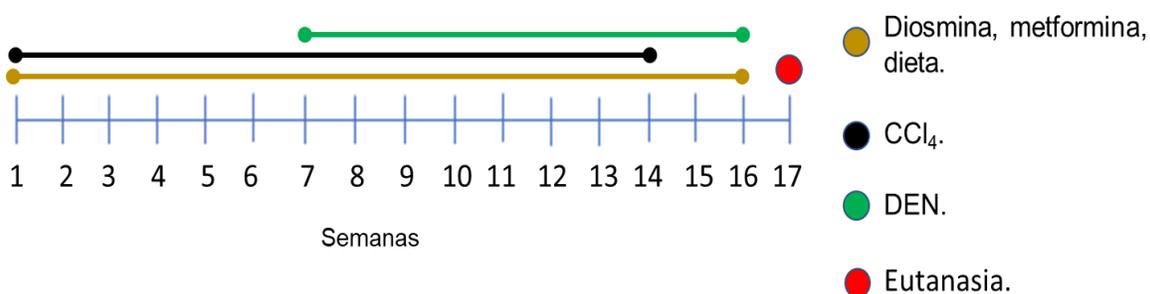
La experimentación se inició cuando las ratas alcanzaron una edad de 6 semanas y un peso corporal aproximado de 120-150 gramos. Las ratas fueron pesadas

semanalmente para obtener un historial de los pesos corporales durante el tiempo de experimentación.

Para desarrollar el modelo de EHNA que conduce a CHC, las ratas recibieron la dieta *ad libitum* durante las 16 semanas del experimento. Adicionalmente, se les administraron la DEN y el CCl<sub>4</sub> por vía intraperitoneal una vez por semana a una dosis de 40 y 400 mg/Kg de peso corporal, respectivamente. El periodo de administración del CCl<sub>4</sub> fue a partir de la semana 1 hasta la semana 14 y el de la DEN fue a partir de la semana 7 hasta la semana 16. El vehículo fue petrolato líquido para el CCl<sub>4</sub> y agua para la DEN.

Para evaluar los efectos de la metformina y la diosmina en el modelo de EHNA que conduce a CHC, los compuestos fueron administrados a las ratas como tratamiento, una vez al día a una dosis de 200 mg/Kg de peso corporal. Los compuestos fueron administrados por vía intragástrica durante las 16 semanas de experimentación. El vehículo de la diosmina fue CMC al 0.7% y el de la metformina fue agua. El protocolo de administración de los hepatotóxicos y el tratamiento fue de acuerdo con el esquema de la figura 8.

Los grupos de ratas que funcionaron como controles recibieron alimento Labdiet® *ad libitum* durante las 16 semanas de tratamiento. Además, se les administraron los vehículos utilizados para la DEN y el CCl<sub>4</sub>. Todos los animales recibieron agua *ad libitum* durante el tiempo de experimentación.



**Fig. 8 Esquema de tratamiento durante el periodo de desarrollo del estudio.**

Al finalizar la semana 16, la administración de los hepatotóxicos y los fármacos a las ratas fue suspendida, se proporcionó solamente agua y alimento Labdiet *ad*

*libitum* por una semana más. Las ratas fueron privadas de alimento por 12 horas antes de la hora programada de la eutanasia, proporcionándoles solamente agua *ad libitum*.

Al pasar las 12 horas, las ratas fueron anestesiadas con la administración de ketamina y xilacina por vía intraperitoneal, a una dosis de 100 y 8 mg/Kg de peso corporal, respectivamente. Una vez anestesiadas, se tomó una pequeña muestra de sangre por punción en la vena caudal, para determinar la concentración de la glucosa en la sangre. La determinación de la concentración de la glucosa fue realizada por medio del glucómetro One Touch Ultra® con tiras reactivas vigentes. Después de medir la concentración de la glucosa en la sangre, se prosiguió a inducir la eutanasia por exanguinación intracardiaca.

La sangre fue recolectada por punción cardiaca y posteriormente se obtuvo el suero por centrifugación a 3000 rpm para medir las actividades enzimáticas. El hígado fue extraído rápidamente, se pesó y se dividió en fracciones para realizar futuras pruebas. Algunas fracciones del hígado fueron almacenadas a -75 °C, y otras fracciones se sometieron a fijación en paraformaldehído al 4% y almacenadas a 4°C.

#### **6.4. Análisis bioquímicos**

La actividad de las enzimas alanina aminotransferasa (ALT) y la gamma glutamil transpeptidasa ( $\gamma$ -GTP) fueron determinadas de acuerdo con los métodos descritos en (71, 72), respectivamente. El contenido de la colágena se determinó mediante la concentración de hidroxiprolina en muestras de hígado fresco, con base al método descrito en (73). Las mediciones colorimétricas fueron realizadas en un espectrofotómetro Shimadzu UV® 1201.

#### **6.5. Análisis histológicos**

Para el análisis histológico, algunas fracciones de tejido hepático se fijaron en paraformaldehído al 4% y otras fueron embebidas en Tissue-tek®. Los cortes de los tejidos se prepararon para realizar las siguientes tinciones. La tinción de hematoxilina y eosina (H&E) se realizó para visualizar los cambios en el parénquima hepático. La tinción tricrómica de Masson se utilizó para analizar la presencia de

fibras de colágena y la tinción con rojo oleoso “O” (ORO) se utilizó para detectar los depósitos de lípidos en los hepatocitos.

### **La tinción de Hematoxilina y Eosina**

Los tejidos almacenados en paraformaldehído fueron utilizados para la tinción de H&E. Los tejidos fueron incluidos en parafina para posteriormente realizar los cortes. La tinción se llevó a cabo mediante un tren de tinción.

1.- Primeramente, las muestras fueron desparafinadas y rehidratadas con xileno, alcohol absoluto y alcohol al 95%.

2.- Posteriormente se añadió hematoxilina de Harris a las muestras durante 15 minutos, luego se lavaron con agua durante 2 minutos.

3.- Después, las muestras fueron diferenciadas con alcohol acético con 3-10 inmersiones y se verificó en el microscopio, inmediatamente fueron enjuagadas con agua. Los núcleos deben observarse con claridad y el citoplasma con una coloración muy tenue.

4.- En el siguiente paso, las muestras fueron sumergidas en agua amoniacal o saturada de carbonato de litio, hasta que las muestras tomaron una coloración azul brillante, después fueron lavadas entre 10-20 minutos.

5.- A continuación, las muestras fueron teñidas con eosina entre 15-20 minutos, y posteriormente se lavaron con alcohol al 95%, con alcohol absoluto y por último con xileno.

6.- Finalmente, se aplicó el polímero Permout o bálsamo.

### **La tinción tricrómica de Masson**

Las fracciones de tejido almacenadas en paraformaldehído, fueron utilizadas para la tinción tricrómica de Masson. Previo a la tinción se realizaron los cortes de tejidos incluidos en parafina. La tinción tricrómica de Masson fue realizada de acuerdo con las instrucciones del kit de Hycel® con número de catálogo 64297.

## **La tinción de rojo oleoso “O”**

Los tejidos embebidos en Tissue-tek® almacenados a -75°C fueron utilizados para ser teñidos con la tinción de ORO. Se realizaron cortes de 8 µm con un micrótopo y posteriormente adheridos a portaobjetos cubiertos con poli L-lisina. Una vez preparados los portaobjetos con las muestras se prosiguió a la tinción.

- 1.- Los portaobjetos fueron sumergidos en alcohol al 96% durante 1 minuto y posteriormente se secaron a temperatura ambiente.
- 2.- Después, las muestras fueron sumergidas en la solución de rojo oleoso “O” durante 20 minutos y posteriormente fueron enjuagadas en agua destilada.
- 3.- Luego, las muestras se dejaron secar durante 5 minutos en el horno, después de los 5 minutos se enjuagaron con agua destilada.
- 4.- A continuación, las muestras fueron teñidas con hematoxilina durante 1 minuto. Al pasar el minuto se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente.
- 5.- Por último, las muestras fueron cubiertas con un medio gelatinoso y enseguida por un cubreobjetos.

Después de realizar las tinciones con la H&E, la tricrómica de Masson y el ORO, se prosiguió a tomar las imágenes digitales en el microscopio Olympus IX70. Las imágenes digitales de las tinciones tricrómica de Masson y ORO fueron utilizadas para determinar el porcentaje de área teñida. El color rojo para la tinción de ORO y el color azul grisáceo para la tinción tricrómica de Masson fueron cuantificados con el software ImageJ® versión 1.54.

## **6.6. Análisis estadístico**

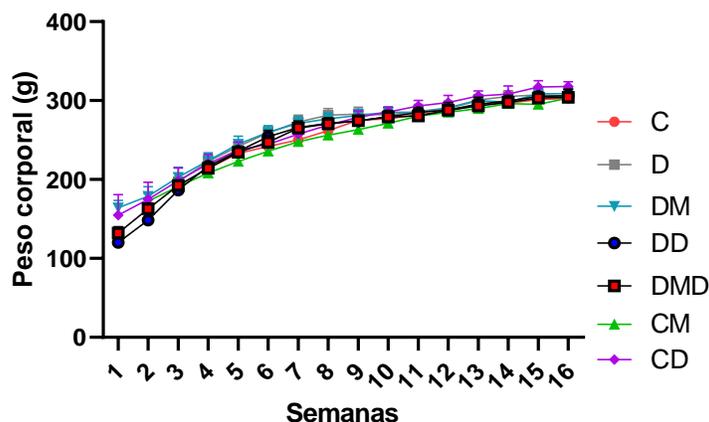
Los resultados fueron analizados estadísticamente con el programa GraphPad Prism® versión 8.0. Las evaluaciones estadísticas realizadas fueron un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, junto con la prueba de comparación de Tukey con una  $n=7$ , en donde una  $p<0.05$  fue considerada significativa. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM).

## VII. RESULTADOS

Para cumplir con los objetivos del estudio, se evaluaron los cambios producidos por la administración de los hepatotóxicos, la metformina y la diosmina en un modelo de EHNA que conduce a CHC.

### 7.1. La administración de los hepatotóxicos, la metformina y la diosmina no modificó el peso corporal de las ratas

Los pesos corporales de las ratas fueron obtenidos semanalmente durante el tiempo de experimentación (Gráfica 1). No se encontró diferencia significativa en los pesos corporales de las ratas en los diferentes grupos experimentales.

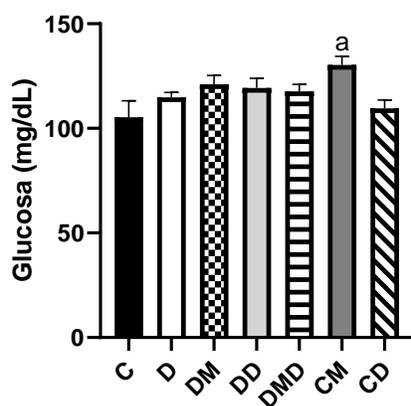


**Gráfica 1. El efecto de los hepatotóxicos, la metformina y la diosmina sobre el peso corporal de las ratas.** Los pesos corporales de las ratas no presentaron diferencia significativa entre los grupos de estudio. Cada símbolo y color representa un grupo de ratas, las medias fueron calculadas de los valores obtenidos cada semana de cada grupo de ratas (n=7). (g) gramos, (C) Control, (D) Daño, (DM) Daño + metformina, (DD) Daño + diosmina, (DMD) Daño + metformina + diosmina, (CM) Control de metformina, (CD) Control de diosmina.

### 7.2. La administración de los hepatotóxicos y la diosmina no modificó la concentración de la glucosa sérica en las ratas

La concentración de la glucosa en la sangre fue determinada después de 12 horas de privación del alimento a las ratas. El grupo de ratas control de metformina es el único grupo de ratas que mostró un aumento en la concentración de la glucosa

sérica, ya que presentó diferencia significativa respecto al grupo control. Por el contrario, los demás grupos de ratas no mostraron diferencias significativas respecto al grupo control y el grupo de daño (Gráfica 2).

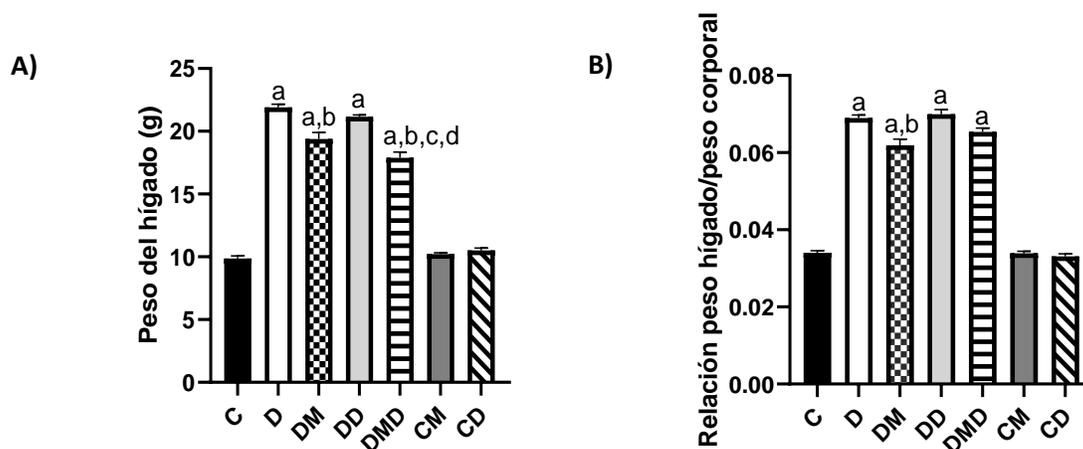


**Gráfica 2. El efecto de los hepatotóxicos, la metformina y la diosmina sobre la concentración de la glucosa sérica.** Cada barra representa la media de cada grupo de ratas del estudio (n=7)  $\pm$  SEM. (mg/dL) miligramos/decilitros, (C) Control, (D) Daño, (DM) Daño + metformina, (DD) Daño + diosmina, (DMD) Daño + metformina + diosmina, (CM) Control de metformina, (CD) Control de diosmina. (a)  $p < 0.05$  en comparación con C.

### 7.3. La metformina previno parcialmente el aumento de peso del hígado

En la gráfica 3A se muestran los pesos de los hígados de los diferentes grupos. El grupo de ratas control que recibió el alimento Labdiet® mostró un peso del hígado normal. Por el contrario, el grupo de ratas que recibió los hepatotóxicos mostró un aumento en el peso del hígado y presentó una diferencia significativa respecto al grupo control. Sin embargo, este aumento de peso del hígado fue prevenido parcialmente en el grupo de ratas que recibió la metformina como tratamiento. Por otro lado, la administración de la diosmina como tratamiento no mostró el mismo efecto que la metformina, ya que no presentó diferencia significativa respecto al grupo de ratas de daño. El grupo de ratas que recibió ambos compuestos como tratamiento presentó diferencia significativa contra el grupo de daño; además, mostró una prevención aun mayor a lo observado en el grupo de ratas que recibió la metformina sola.

La relación entre el peso del hígado y el peso corporal de las ratas fue utilizada para normalizar los pesos (Gráfica 3B). Todos los grupos mostraron una tendencia similar a la gráfica 3A, excepto el grupo que recibió el tratamiento con la metformina y la diosmina. Este grupo mostró un aumento en la relación, y no presentó diferencia significativa respecto al grupo de ratas de daño.

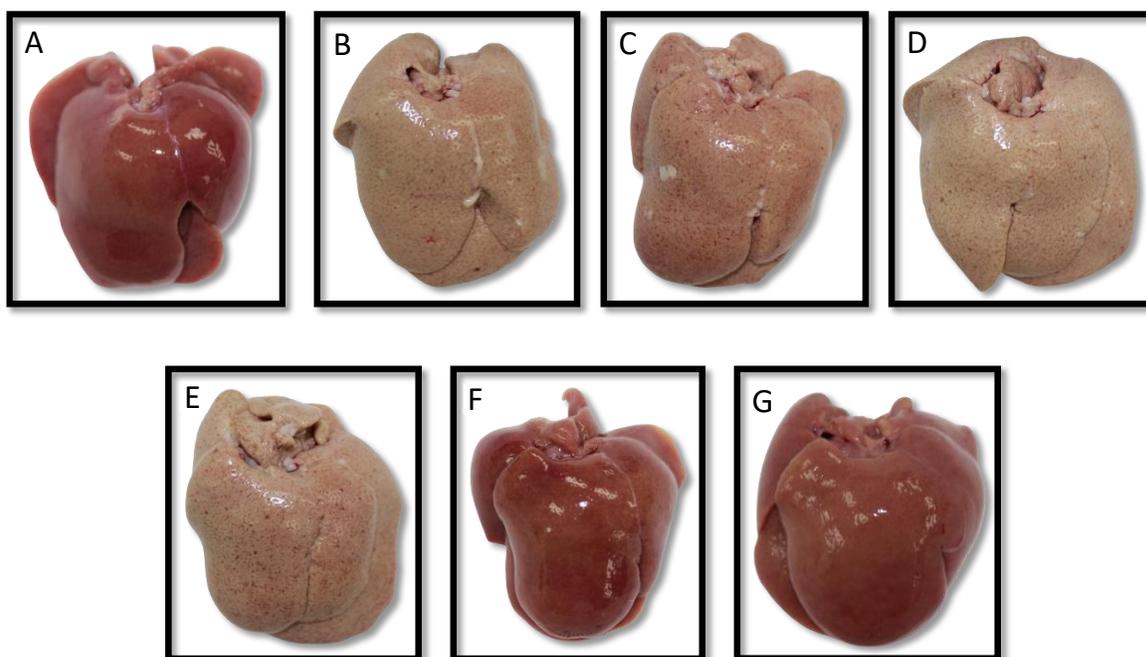


**Gráfica 3. El efecto de la administración de los hepatotóxicos, la metformina y la diosmina sobre el peso del hígado y la relación con el peso corporal. A)** Se presentan los pesos de los hígados de las ratas de cada grupo de estudio, obtenidos al final del experimento. **B)** La relación entre el peso del hígado y el peso corporal de las ratas al finalizar el experimento. Cada barra representa la media de cada grupo de ratas del experimento ( $n=7$ )  $\pm$  SEM. (g) gramos, (C) Control, (D) Daño, (DM) Daño + metformina, (DD) Daño + diosmina, (DMD) Daño + metformina + diosmina, (CM) Control de metformina, (CD) Control de diosmina. (a)  $p<0.05$  en comparación con C; (b)  $p<0.05$  en comparación con D; (c)  $p<0.05$  en comparación con DM; (d)  $p<0.05$  en comparación con DD.

#### 7.4. La administración de los hepatotóxicos alteró la coloración del hígado

Los hígados representativos de cada uno de los diferentes grupos se pueden observar en la figura 9. El hígado del grupo de ratas control presentó un color marrón, característico de un hígado sano (Fig. 9A). Por el contrario, el hígado del grupo de ratas que desarrolló el daño presentó un cambio de coloración tornando a una coloración blanquecina (Fig. 9B). El hígado del grupo de ratas que recibió la metformina como tratamiento (Fig. 9C) mostró un cambio de coloración respecto al hígado del grupo de ratas control, el cual tiende a presentar una coloración

intermedia entre el hígado del grupo control y el hígado del grupo de daño. El hígado del grupo de ratas que recibió la diosmina como tratamiento (Fig. 9D) presentó una coloración muy diferente al hígado del grupo control y muy similar al hígado del grupo de daño. El hígado del grupo de ratas que recibió los dos compuestos como tratamiento (Fig. 9E) mostró una coloración blanquecina, similar al hígado del grupo de ratas de daño. Los hígados de los grupos de ratas que solamente recibieron la administración de la metformina (Fig. 9F) y de la diosmina (Fig. 9G) como controles, presentaron características similares al hígado del grupo de ratas control.



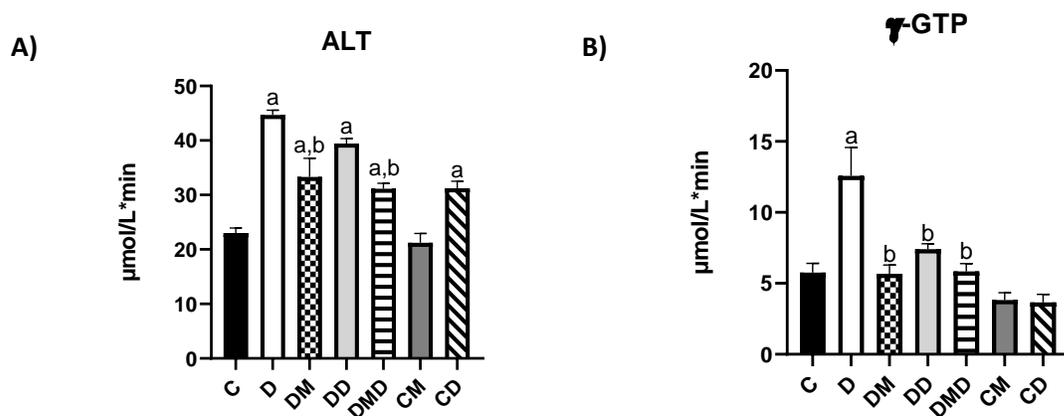
**Fig. 9 La anatomía macroscópica de los hígados de los grupos de estudio.** Los hígados representativos de cada grupo del estudio mostraron cambios en el color, debido a las respectivas administraciones de los hepatotóxicos y los tratamientos. A) Control, B) Daño, C) Daño + metformina, D) Daño + diosmina, E) Daño + metformina + diosmina, F) Control de metformina, G) Control de diosmina.

### **7.5. La administración de la metformina previno parcial y totalmente el aumento de la actividad enzimática de la ALT y la $\gamma$ -GTP, respectivamente**

Los niveles de las actividades enzimáticas de la ALT y la  $\gamma$ -GTP, son presentados en la gráfica 4A y 4B, respectivamente. El grupo control mostró un nivel de actividad normal o basal de estas enzimas. Por el contrario, el grupo de ratas que recibió los

hepatotóxicos mostró un aumento significativo en el nivel de la actividad de estas enzimas. Los aumentos de las actividades enzimáticas que mostró el grupo de daño fueron prevenidos en el grupo de ratas que recibió la metformina como tratamiento. La prevención de la elevación de la actividad enzimática fue parcial en la enzima ALT y total en la enzima  $\gamma$ -GTP, en ambas enzimas la administración de la metformina mostró diferencia significativa respecto al grupo de daño. La diosmina no previno el aumento de la actividad de la ALT, ya que no presentó diferencia significativa respecto al grupo de daño. Sin embargo, sí previno totalmente el aumento de la actividad de la enzima  $\gamma$ -GTP, este efecto tuvo diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo de daño, pero no con respecto al grupo control.

La administración conjunta de la metformina y la diosmina, previno el aumento de la actividad en ambas enzimas, de manera similar a lo observado en el grupo que solo recibió el tratamiento con la metformina. El grupo control de metformina presentó un nivel basal en la actividad de ambas enzimas y no presentó diferencia significativa respecto al grupo control. Sin embargo, el grupo que recibió la diosmina como control mostró un aumento en la actividad enzimática de la ALT, este efecto fue estadísticamente significativo con respecto al grupo control. Por otro lado, la actividad de la  $\gamma$ -GTP en este grupo no presentó diferencia significativa respecto al grupo control.



**Gráfica 4. El efecto de los hepatotóxicos, la metformina y la diosmina sobre la actividad enzimática de la ALT y la  $\gamma$ -GTP. A) La actividad enzimática de la ALT y B) la**

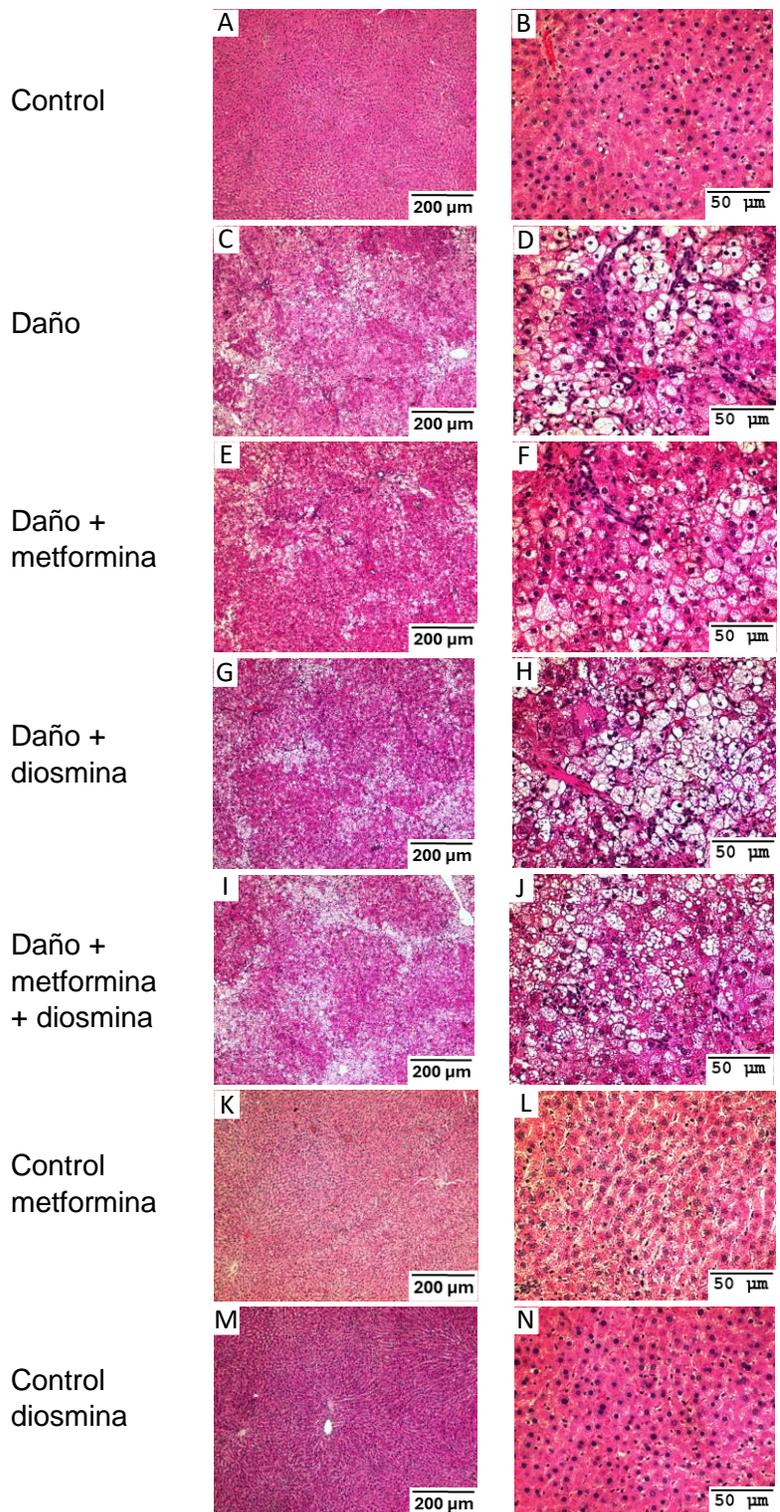
$\gamma$ -GTP de los diferentes grupos. Cada barra representa la media de cada grupo del estudio (n=7 por duplicado)  $\pm$  SEM. (C) Control, (D) Daño, (DM) Daño + metformina, (DD) Daño + diosmina, (DMD) Daño + metformina + diosmina, (CM) Control de metformina, (CD) Control de diosmina. (a)  $p < 0.05$  en comparación con C; (b)  $p < 0.05$  en comparación con D.

### **7.6. La administración de la metformina evitó la disrupción parcial de la arquitectura microscópica del parénquima hepático**

La tinción de H&E en los tejidos fue realizada para visualizar la estructura microscópica del parénquima hepático de los grupos en estudio (Fig.10). El grupo control mostró un parénquima hepático aparentemente normal, sin ninguna alteración en su estructura (Fig. 10A), a una mayor magnificación (Fig. 10B) se pueden apreciar los cordones hepáticos en orden y sin alteración de los hepatocitos o su núcleo.

Las ratas en el grupo tratado con la dieta hepatopatogénica y los hepatotóxicos mostraron una alteración en el ordenamiento del parénquima hepático, con visibles disrupciones o huecos (Fig. 10C), a una mayor magnificación (Fig. 10D) se pueden apreciar los cordones de hepatocitos desordenados, los hepatocitos presentaron forma de balón y su núcleo se movió hacia la periferia. El grupo que recibió la metformina como tratamiento (Fig. 10E) mostró un parénquima hepático con menor cantidad de disrupciones, y a mayor magnificación (Fig. 10F) se aprecia una menor cantidad de hepatocitos alterados en comparación con el grupo de daño.

El grupo que recibió la diosmina como tratamiento (Fig. 10G, H) y el grupo que recibió los dos compuestos como tratamiento (Fig. 10I, J) mostraron cambios muy similares a los observados en el grupo de daño. Los grupos que recibieron la metformina (Fig. 10K, L) y la diosmina (Fig. 10M, N) como controles no mostraron un cambio en el parénquima hepático, mostraron una estructura microscópica similar a la observada en el grupo control.



**Fig. 10** Los efectos de los hepatotóxicos, la diosmina y la metformina sobre el parénquima hepático. La tinción de H&E realizada en muestras de tejido de hígado de los grupos de estudio. El parénquima hepático se encuentra alterado por la administración de los hepatotóxicos. Las imágenes fueron capturadas con los objetivos 10x (200 μm) y 40x

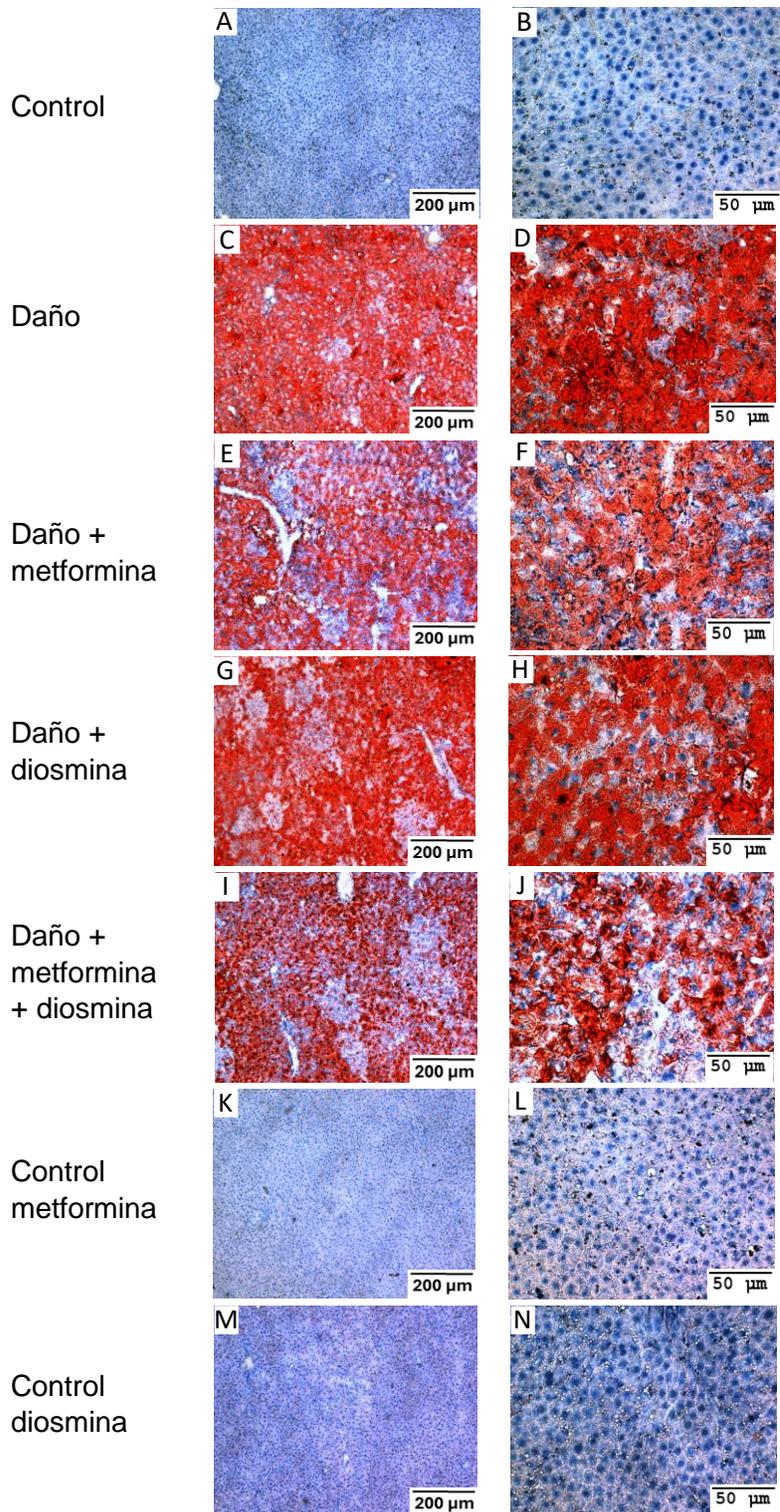
(50  $\mu\text{m}$ ). (A, B) grupo control, (C, D) grupo de daño, (E, F) grupo daño + metformina, (G, H) grupo de daño + diosmina, (I, J) grupo de daño + metformina + diosmina, (K, L) grupo control de metformina, (M, N) grupo control de diosmina.

### **7.7. La administración de la diosmina y la metformina en combinación previno la acumulación de lípidos en los hepatocitos**

La acumulación de los lípidos en los hepatocitos fue determinada con la tinción de ORO, la cual tiñe de color rojo los lípidos presentes en el tejido (Fig. 11). El color rojo fue cuantificado como porcentaje de área teñida, estos porcentajes del área teñida obtenidos de los diferentes grupos se encuentran en la gráfica 5.

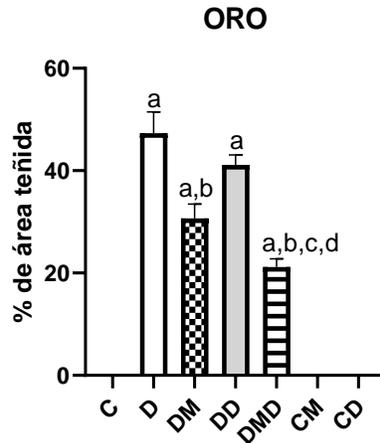
El grupo de ratas control no mostró la presencia del color rojo en el tejido (Fig.11A, B), además, mostró un porcentaje de área teñida cercano a cero. Por el contrario, el grupo que recibió la administración de los hepatotóxicos mostró un aumento en la coloración roja (Fig.11C, D), el cual presentó un porcentaje de área teñida cerca del 50%. La acumulación de lípidos observada en el grupo que recibió los hepatotóxicos fue prevenida parcialmente pero significativamente con la administración de la metformina, ya que mostró menor cantidad del color rojo (Fig. 11E, F). También, presentó un porcentaje de área teñida que fue estadísticamente significativo respecto al grupo de daño. En contraste, el grupo que recibió la diosmina como tratamiento (Fig. 11G, H) mostró una intensidad del color rojo y un porcentaje de área teñida similar al del grupo de daño.

El grupo que recibió los dos compuestos como tratamiento (Fig. 11I, J), mostró una menor área del color rojo cuando se comparó con el grupo de daño. Sumado a esto, este grupo mostró una menor intensidad de este color que la que se observó en el grupo que recibió el tratamiento con la metformina. Además, Este grupo presentó diferencia significativa respecto al grupo de daño y al grupo que recibió la metformina como tratamiento. Los grupos que recibieron la administración de la metformina (Fig. 11K, L) y la diosmina (Fig. 11M, N) como controles, no tienen la presencia del color rojo y presentaron un porcentaje de área teñida cercano a cero, similar al grupo control.



**Fig. 11 El efecto de los hepatotóxicos, la metformina y la diosmina sobre la acumulación de los lípidos dentro de los hepatocitos.** La tinción de ORO realizada en muestras de tejido de hígado de los diferentes grupos de estudio. El color rojo señala la presencia de lípidos en los hepatocitos. Las imágenes fueron capturadas con los objetivos

10x (200  $\mu\text{m}$ ) y 40x (50  $\mu\text{m}$ ). (A, B) grupo control, (C, D) grupo de daño, (E, F) grupo daño + metformina, (G, H) grupo de daño + diosmina, (I, J) grupo de daño + metformina + diosmina, (K, L) grupo control de metformina, (M, N) grupo control de diosmina.



**Gráfica 5. La cuantificación del porcentaje de área teñida de color rojo en el tejido.** La determinación del porcentaje de área de cada imagen fue realizada mediante el programa ImageJ®. Cada barra representa la media de cada grupo del estudio (n=3 por triplicado)  $\pm$  SEM. (C) Control, (D) Daño, (DM) Daño + metformina, (DD) Daño + diosmina, (DMD) Daño + metformina + diosmina, (CM) Control de metformina, (CD) Control de diosmina. (a)  $p < 0.05$  en comparación con C; (b)  $p < 0.05$  en comparación con D; (c)  $p < 0.05$  en comparación con DM; (d)  $p < 0.05$  en comparación con DD.

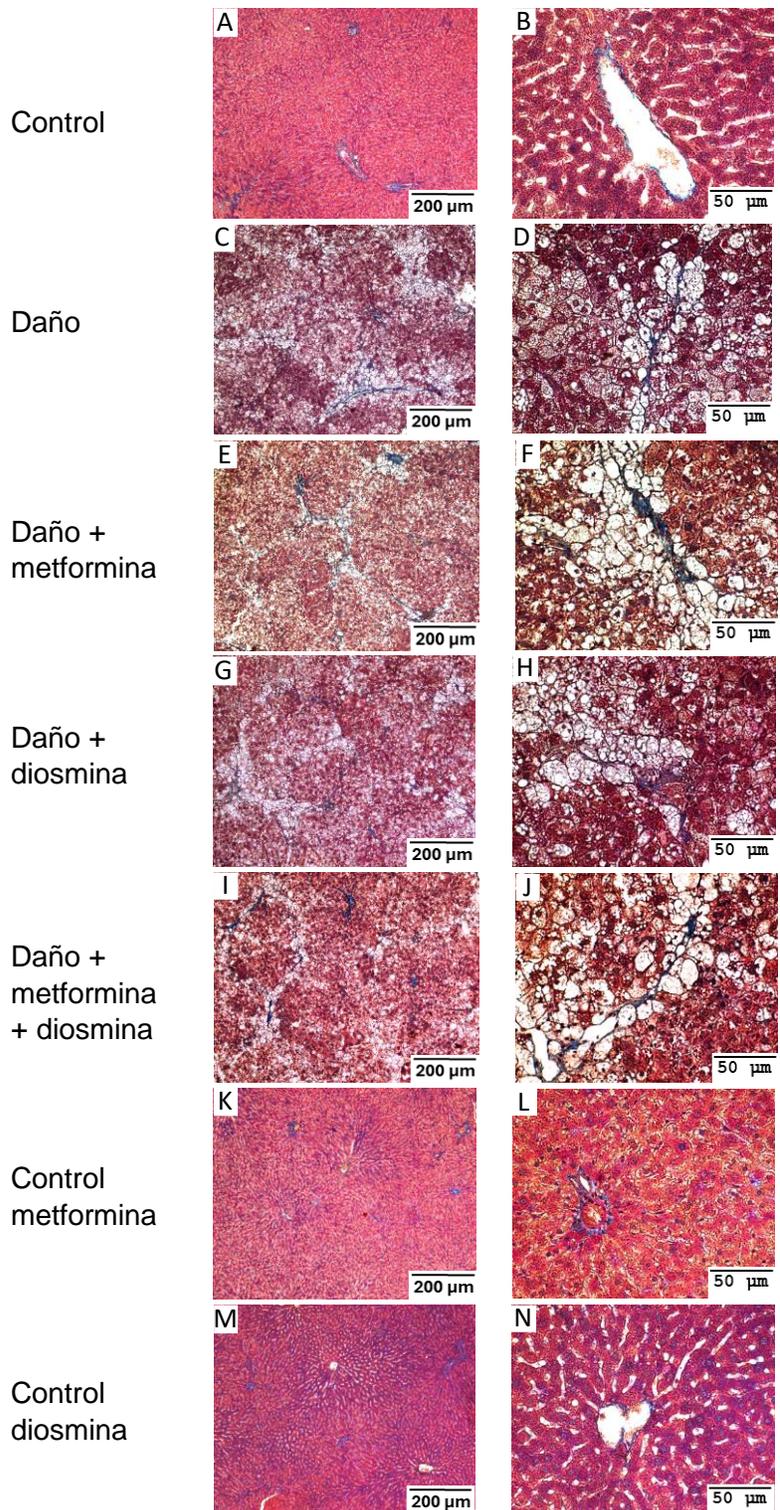
### 7.8. La administración de la diosmina y la metformina no previno la fibrosis

Las fibras de colágena fueron visualizadas en los tejidos teñidos mediante la tinción tricrómica de Masson, la cual tiñe de color azul grisáceo a este tipo de fibras (Fig.12). El color azul grisáceo cuantificado de los diferentes grupos es presentado en la gráfica 6A en porcentajes de área teñida, donde no se encontraron diferencias significativas respecto al grupo control y el grupo de daño.

El tejido hepático del grupo control mostró solamente presencia del color azul grisáceo en el contorno de los vasos sanguíneos del hígado (Fig. 12A, B). Por el contrario, en el grupo de ratas que recibió los hepatotóxicos también fue observado este color en el contorno de los vasos sanguíneos, pero, además, se encontró entre los hepatocitos (Fig. 12C, D). La administración de la metformina no previno la

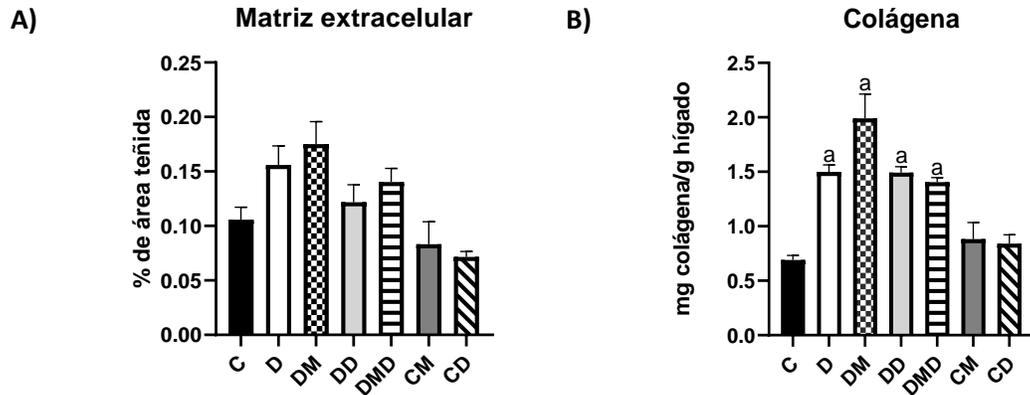
acumulación de fibras de colágena en los tejidos (Fig.12E, F), ya que presentó el color azul grisáceo entre los hepatocitos similar al grupo de daño. De igual manera, el grupo de ratas que además de recibir el tratamiento para producir la enfermedad, recibió la diosmina, presentó las bandas de colágena de manera similar al grupo no protegido (Fig. 12G, H). La administración de los dos compuestos simultáneamente no previno la aparición de las fibras de colágena (Fig. 12I, J). Los grupos controles tanto de la metformina (Fig. 12K, L) como de la diosmina (Fig. 12M, N) mostraron similitud con el grupo control, los cuales presentaron el color azul grisáceo únicamente en el contorno de los vasos sanguíneos. Además, la colágena fue cuantificada por la determinación de la hidroxiprolina, aminoácido importante en la síntesis de esta proteína, las cantidades de colágena de cada grupo se encuentran en la gráfica 6B. Las cantidades de colágena en el grupo control fueron normales o basales, mientras que en el grupo de daño tuvo un aumento, el cual fue estadísticamente significativo con respecto al grupo control. El grupo que recibió la metformina como tratamiento presentó una diferencia significativa respecto al grupo control, pero no respecto al grupo de daño. El grupo de ratas que recibió el tratamiento con la diosmina no mostró diferencia significativa respecto al grupo de daño.

El grupo que recibió la administración de ambos compuestos como tratamiento mostró un aumento de la cantidad de colágena respecto al grupo control, sin embargo, no mostró diferencia significativa respecto al grupo de daño. Los grupos que recibieron la metformina y la diosmina como controles no presentaron diferencia significativa respecto al grupo control.



**Fig. 12 El efecto de los hepatotóxicos, la diosmina y la metformina en la síntesis de las fibras de colágena.** La tinción tricrómica de Masson realizada en muestras de tejido de hígado de los grupos de estudio. La visualización de las fibras de colágena, en donde se puede observar el color azul grisáceo. Las imágenes fueron capturadas con los objetivos

10x (200  $\mu\text{m}$ ) y 40x (50  $\mu\text{m}$ ). (A, B) grupo control, (C, D) grupo de daño, (E, F) grupo daño + metformina, (G, H) grupo de daño + diosmina, (I, J) grupo de daño + metformina + diosmina, (K, L) grupo control de metformina, (M, N) grupo control de diosmina.



**Gráfica 6. El efecto de los hepatotóxicos, la diosmina y la metformina en la síntesis de la matriz extracelular y la colágena. A)** La cuantificación del porcentaje de área teñida de las fibras de colágena (n=3 por triplicado). **B)** La cuantificación de la hidroxiprolina mediante el método descrito en (73) (n=7 por duplicado). Cada barra representa la media de cada grupo de ratas del estudio  $\pm$  SEM. (C) Control, (D) Daño, (DM) Daño + metformina, (DD) Daño + diosmina, (DMD) Daño + metformina + diosmina, (CM) Control de metformina, (CD) Control de diosmina. (a)  $p < 0.05$  en comparación con C.

## VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El CHC es el principal cáncer de hígado con un alto número de muertes a nivel mundial debido al diagnóstico tardío y a la falta de un tratamiento eficaz (23,39,40). La búsqueda de nuevos tratamientos contra este tipo de enfermedad es esencial. La combinación de fármacos es una herramienta utilizada para combatir diversas enfermedades complejas, ya que se podría obtener un mayor efecto farmacológico cuando se administran de dos o más moléculas que actúan sobre diferentes vías moleculares. En este trabajo se evaluaron los efectos farmacológicos de la metformina y la diosmina, al ser administrados tanto de manera individual como en combinación en un modelo murino de EHNA que conduce a CHC. Este modelo reproduce el estadio temprano del CHC similar al ser humano, el cual pasa por el estadio de la EHNA.

### **8.1. El modelo de esteatohepatitis no alcohólica conducente a cáncer hepatocelular**

La administración de la dieta alta en grasas y carbohidratos simples provoca una acumulación de lípidos, lo cual conduce a la EHNA (74). Esta dieta fue necesaria para que los excesos de los componentes promuevan la formación de ácidos grasos libres tóxicos para el hígado. La acumulación en exceso de los lípidos induce la formación de las ROS y activa las vías de señalización relacionadas a la inflamación. El CCl<sub>4</sub> y la DEN producen un efecto fibrótico y tumorigénico, respectivamente (75). El CCl<sub>4</sub> se metaboliza y forma el radical libre triclorometilo que induce a la formación de las ROS y con ello la inflamación. Además, se ha reportado que el CCl<sub>4</sub> a bajas dosis induce la fibrosis en el hígado. La DEN produce estrés oxidativo, aumenta la proliferación de los hepatocitos y provoca daño en el DNA, lo que provoca mutaciones que originan el CHC (76).

La administración de la dieta hepatopatogénica, la DEN y el CCl<sub>4</sub> provocó alteraciones a diferentes niveles celulares y moleculares en el hígado de las ratas. Por ejemplo, el hígado presentó un cambio en el color y una elevación en el peso. La dieta hepatopatogénica estaba compuesta de una alta cantidad de carbohidratos simples, grasas y colesterol, por lo que el cambio de coloración del hígado pudo ser

por la acumulación excesiva de lípidos. Por consiguiente, la elevación del peso de este órgano se vio afectada por esta acumulación de lípidos. Además, las actividades enzimáticas de la ALT y  $\gamma$ -GTP fueron mayores en este grupo. La elevación de la actividad de las enzimas hepáticas señala un daño en el órgano (59). La enzima ALT se encuentra en el citoplasma de los hepatocitos, la cual es liberada cuando la membrana de esta célula es dañada, esto provoca un aumento anormal de esta enzima en el torrente sanguíneo. Por otro lado, la  $\gamma$ -GTP es una enzima que se encuentra en los canalículos biliares, por lo que, cuando existe una obstrucción de las vías biliares se produce un aumento de esta enzima en la sangre.

Este modelo también provocó una alteración morfológica de los hepatocitos, un aumento de lípidos en el citoplasma de los hepatocitos y el posterior desarrollo de fibrosis, debido al daño recibido. Las alteraciones que mostró el grupo de daño fueron algunos de los resultados que se pretendían encontrar. Se esperaba que la administración de la dieta hepatopatogénica, el CCl<sub>4</sub> y la DEN indujera la formación de los nódulos neoplásicos en el hígado, característicos del CHC. Sin embargo, a pesar del daño que recibió el órgano con la administración de los hepatotóxicos no se pudieron observar dichos nódulos. No se conocen exactamente los factores que impidieron el desarrollo de los nódulos neoplásicos en este estudio, ya que en estudios previos si se logró el desarrollo de dichos nódulos (resultados no publicados). Es posible que la preparación, la dosis, o la conservación de la DEN no haya sido la correcta. La DEN es sensible a la luz, principalmente a la luz ultravioleta (77), por lo que su degradación pudo ocurrir y provocar la disminución del efecto tumorogénico. De cualquier manera, la administración de los hepatotóxicos produjo hepatosteatois, inflamación, necrosis y fibrosis hepática, por lo que en este modelo si se pudieron evaluar los efectos de la metformina y la diosmina sobre estas alteraciones.

## **8.2. Los efectos de la administración de la metformina en el hígado**

La metformina ha demostrado tener efectos benéficos importantes en el tratamiento del cáncer. Los diversos estudios realizados en animales y líneas celulares demuestran el potencial anticancerígeno de esta molécula (34,46-48).

La metformina previno el aumento de peso y las alteraciones macroscópicas del hígado; además, previno el aumento de la actividad de las enzimas ALT y  $\gamma$ -GTP y evitó las alteraciones microscópicas del parénquima hepático inducidas con la dieta, el CCl<sub>4</sub> y la DEN. Los resultados anteriores son similares a otro estudio donde se reportó que la administración de la metformina a una dosis de 200 mg/Kg de peso corporal, dos veces al día durante 12 semanas previno el aumento de peso del hígado, el aumento en la actividad de los marcadores de daño hepático y las alteraciones microscópicas del órgano, esto en un modelo de EHNA y cirrosis, inducido con CCl<sub>4</sub> y una dieta con un contenido alto de grasas y carbohidratos simples (58). Estos resultados mostraron que la metformina quizá presentó un efecto antiinflamatorio en el hígado.

En este estudio encontramos que la metformina previno la acumulación de los lípidos en los hepatocitos, derivada de la administración de la dieta alta en grasas, el colesterol y los carbohidratos simples. El efecto de la metformina sobre los lípidos en este estudio es similar a lo reportado por otros autores (58,79). Posiblemente, este efecto se debe a la acción de la metformina sobre la AMPK. La literatura menciona que la AMPK puede inhibir a SREBP-1 y a la acetil CoA carboxilasa (52,80,81). Además, otros autores sugieren que la metformina disminuye la expresión de la proteína relacionada con la diferenciación adiposa (ADRP). El aumento en la expresión de la ADRP se ha encontrado asociado a la esteatosis hepática. (79). Este efecto preventivo contra la acumulación de los lípidos del hígado puede explicar la coloración del hígado y la prevención en el aumento de peso del órgano.

En nuestro estudio, la metformina utilizada como tratamiento contra los efectos de los hepatotóxicos y como control no mostró tener un efecto sobre el peso corporal de las ratas. Sin embargo, este compuesto mostró aumentar el nivel de glucosa sérica en ratas sanas. Este resultado es controversial, ya que es mundialmente reconocido que la metformina es un fármaco usado para disminuir la glucosa sérica en pacientes diabéticos. Sin embargo, existen reportes que demuestran que la metformina es capaz de aumentar la producción de glucosa endógena en pacientes

sanos no diabéticos, donde se señala que este aumento puede estar dado por la liberación de glucagón cuando la glucosa sérica se encuentra en concentraciones bajas y también podría deberse a una respuesta regulatoria del cuerpo para no presentar hipoglucemia (78). Sin embargo, también existe la posibilidad de que sea un error del método de cuantificación utilizado, ya que se usaron tiras reactivas por el método One Touch Ultra®, cuya sensibilidad es limitada.

Los vasos sanguíneos del hígado contienen ciertas cantidades de colágena para mantener los procesos fisiológicos (82), tal como fue encontrado en el grupo control sano. Sin embargo, el grupo que recibió los hepatotóxicos mostró un aumento anormal en la cantidad de colágena, este aumento no fue prevenido con la administración de la metformina. La incapacidad de la metformina para prevenir el aumento en la cantidad de colágena puede deberse a que se administró solo una vez al día. La metformina a una dosis de 200 mg/Kg de peso corporal administrada dos veces al día, ha demostrado la capacidad de disminuir la cantidad de colágena en el hígado en un modelo murino de EHNA y cirrosis, inducido con CCl<sub>4</sub> y una dieta con alto contenido de grasas y carbohidratos simples (58). Además, la metformina tiene un  $t_{1/2}$  que oscila entre 6-7 horas, por lo que posiblemente, la frecuencia de administración de una vez al día en nuestro estudio no fue suficiente para mantener niveles efectivos del compuesto y así producir el efecto antifibrótico deseado.

Las diferencias entre los resultados de nuestro estudio con los resultados de otros investigadores pueden estar dadas por las diferentes dosis y los modelos experimentales empleados (34,46-48,58,79). Además, el mecanismo de acción de la metformina no ha sido totalmente esclarecido, por lo que los diversos estudios en la literatura entran en controversias en cuanto al beneficio real y el mecanismo de acción de este compuesto (58).

### **8.3. Los efectos de la administración de la diosmina sobre el daño hepático**

La diosmina previno el aumento de la actividad enzimática de la  $\gamma$ -GTP en suero, esta prevención fue similar a la observada en otro estudio, en el cual la diosmina mostró una prevención del aumento de la actividad enzimática de la  $\gamma$ -GTP en un modelo de CHC inducido con la DEN (77). La diosmina podría tener su efecto sobre

la liberación de esta enzima al disminuir la obstrucción de las vías biliares, posiblemente presentando un efecto antiinflamatorio y así previniendo el aumento de liberación de la enzima  $\gamma$ -GTP hacia a la sangre. La elevación de esta enzima se ha asociado con las enfermedades hepáticas, las cardiovasculares, la hipertensión, y la diabetes (84). Por lo que el efecto preventivo de la diosmina en el aumento anormal de esta enzima puede ser útil en estas enfermedades.

Se ha reportado que la diosmina previene el aumento de los marcadores de daño hepático, la fibrosis, las alteraciones microscópicas, el aumento de peso del hígado y el cambio de coloración del órgano. Estos efectos se han encontrado en estudios utilizando la diosmina a una dosis diaria de 50, 20, 100 mg/Kg de peso corporal durante 6 semanas, 10 días y 8 semanas, respectivamente (74,83,85). Este compuesto fue evaluado en el modelo de hígado graso inducido por una dieta con alto contenido de grasas (74), el modelo de daño hepático inducido con sulfato ferroso (83) y el modelo de EHNA inducido con una dieta alta en grasas y una inyección de estreptozotocina (85). En contraste, nuestros resultados no mostraron estos efectos de la diosmina en el modelo de EHNA-CHC. Sin embargo, cabe señalar que las dosis, los modelos de experimentación y los tiempos de administración en estos estudios no son similares a los utilizados en nuestro trabajo.

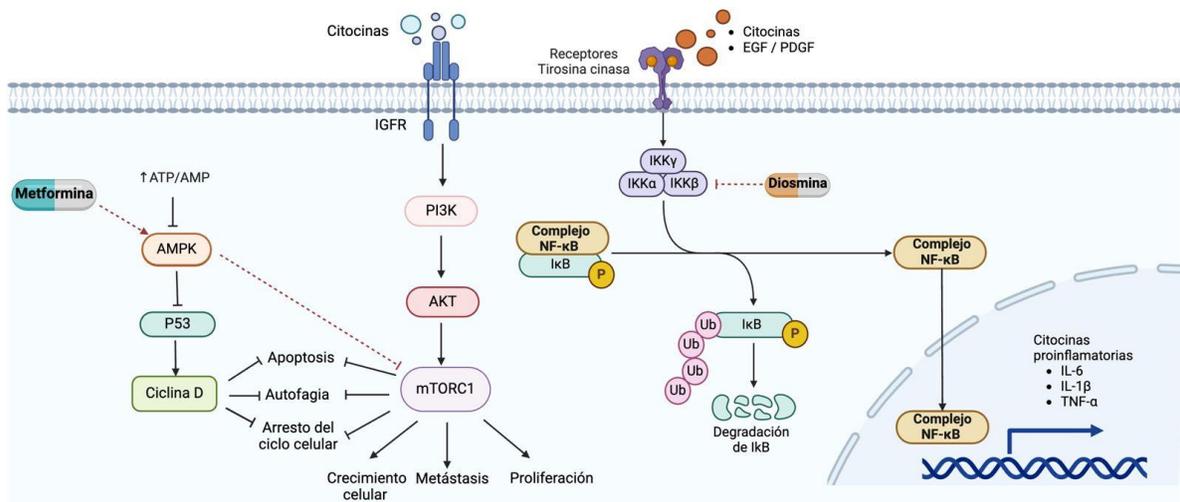
La elevación de la actividad de la enzima ALT por la administración de la diosmina no ha sido reportada con anterioridad (77). Por lo que existe la posibilidad de que el tiempo de la administración y la dosis de la diosmina utilizadas en este trabajo hayan producido un efecto tóxico, ya que se ha reportado que en ratas la dosis de letalidad 50 (LD50) de la diosmina es mayor a 3 gramos por día (63), por lo que la dosis administrada fue aproximadamente una décima de la LD50 y sumado a esto el tiempo de exposición fue largo. También es importante considerar que clínicamente el aumento en la actividad enzimática de la ALT es relevante cuando es de al menos el doble del valor normal. En nuestro estudio la administración de la diosmina como control incrementó muy poco la actividad de esta enzima, por lo que consecuentemente podría ser clínicamente poco relevante. Sin embargo, se recomienda realizar más estudios sobre este efecto, ya que no podemos descartar

un error en la determinación, debido, por ejemplo, a la presencia de hemólisis, ya que la hemoglobina se lee a una longitud de onda similar a la empleada en la determinación de la actividad de esta enzima.

#### **8.4. La administración conjunta de la metformina y la diosmina mostró un efecto antiesteatósico importante en el hígado**

La combinación de la metformina y la diosmina para el tratamiento del CHC no había sido reportada hasta ahora. Esta combinación de fármacos es prometedora, ya que sus mecanismos moleculares conocidos son diferentes (Fig. 13), y se esperaba que la administración conjunta de estos compuestos mostrara tener un efecto de sinergismo aumentando el beneficio farmacológico contra el CHC, en comparación con su administración individual. Cabe señalar que uno de los efectos adversos de la metformina y la diosmina es la diarrea, por lo que un aumento en la diarrea de las ratas pudo haber interferido en la absorción de los compuestos, y consecuentemente disminuir los efectos farmacológicos de esta combinación.

La administración de ambos compuestos mostró tener un efecto de prevención en el aumento de peso del hígado y en el aumento de los marcadores de daño hepático. Además, esta combinación mostró tener un efecto importante al prevenir la acumulación de lípidos en el hígado, por lo que sería interesante investigar su potencial antiesteatósico. Por otro lado, se ha reportado que tanto la metformina como la diosmina son compuestos que actúan sobre algunas de las proteínas como SREBP-1 y la acetil CoA carboxilasa, lo que podría explicar el efecto de prevención en la acumulación de lípidos, al tener acción sobre estas proteínas y disminuir la esteatosis hepática.



**Fig. 13 Mecanismo de acción de la metformina y la diosmina.** La metformina tiene efecto sobre la AMPK, la cual es un sensor energético que mantiene bloqueada la activación de p53, la cual permite que la ciclina D se encuentre activa y bloquea la apoptosis, la autofagia, y el arresto del ciclo celular en diferentes tipos de cáncer. La vía PI3K-Akt-mTOR induce el crecimiento celular, la metástasis y la proliferación en diferentes tipos celulares. La metformina al activar a la AMPK, por consiguiente, activa a p53 lo que resulta en el bloqueo de la ciclina D, lo que conduce a un arresto del ciclo celular, la autofagia y la apoptosis de células cancerígenas. La activación de la AMPK actuará también inhibiendo la actividad de la mTOR, lo que resultará en el bloqueo del crecimiento celular, la metástasis y la proliferación celular. Por otro lado, la diosmina actúa sobre la vía del NF-κB, la cual puede ser activada por diversas citocinas y factores de crecimiento, los cuales activan a los receptores tirosinas cinasas. Una vez activado este tipo de receptor actuará sobre la IKK, y se liberará a la subunidad β. Esta cinasa cuenta con tres subunidades (α, β y γ), la subunidad β liberada será capaz de fosforilar al IκB. El IκB al sufrir una fosforilación en su residuo de serina, pierde afinidad hacia el NF-κB, se ubiquitina y se degrada por el proteasoma. Una vez liberado el NF-κB, se transloca al núcleo e inicia la transcripción de interleucinas y del TNF-α. La diosmina inhibe a la IKK lo que resulta en un bloqueo en la vía proinflamatoria del NF-κB. (AMPK) proteína cinasa activada por la AMP, (PI3K-Akt-mTOR) cinasa del 3 fosfatidilinositol - proteína cinasa B - diana de rapamicina en células de mamífero, (EGF) factor de crecimiento epidérmico, (PDGF) factor de crecimiento derivado de plaquetas, (NF-κB) factor nuclear kappa B, (IKK) cinasa del inhibidor del NF-κB, (IκB) inhibidor del NF-κB, (Ub) ubiquitina, (P) grupo fosfato, (IL-6) interleucina 6, (IL-1β) interleucina 1-beta, (TNF-α) factor de necrosis tumoral alfa.

## **IX. CONCLUSIONES**

La metformina mostró tener efectos farmacológicos benéficos sobre el daño hepático producido por el modelo de EHNA conducente a CHC, ya que previno el aumento en la actividad de las enzimas ALT y  $\gamma$ -GTP que son marcadores de daño hepático y la acumulación de lípidos dentro de los hepatocitos.

La diosmina previno la elevación en la actividad de la enzima  $\gamma$ -GTP. Sin embargo, no demostró tener otros efectos farmacológicos en este modelo.

La administración de la combinación de la metformina y la diosmina mostró tener un efecto farmacológico en la prevención de la elevación de los marcadores de daño hepático, además mostró un importante efecto en la acumulación de lípidos en el hígado, donde presentó una prevención mayor que cuando se administró por sí solo cada compuesto.

## **X. PERSPECTIVAS**

La metformina mostró efectos preventivos en la acumulación de lípidos en el hígado, por lo que se sugiere realizar estudios con una mayor profundidad en modelos experimentales de esteatosis hepática. La administración de este compuesto podría ser de dos veces al día, ya que el  $t_{1/2}$  de la metformina es de 6-7 horas con el fin de mejorar su efecto farmacológico.

La combinación de la metformina y la diosmina mostró una prevención importante en la acumulación de lípidos en el hígado en el modelo de EHNA. Así también, esta combinación previno el aumento de los marcadores de daño hepático como la enzima ALT y la  $\gamma$ -GTP. Lo que da pie a una investigación más profunda sobre los mecanismos de acción involucrados en esta combinación para el tratamiento de la EHNA. Por otro lado, la metformina mostró tener mayores efectos que la diosmina cuando fueron administrados individualmente. Por lo que es necesaria la búsqueda de un compuesto que junto a la metformina produzca un efecto sinérgico contra el CHC. La cafeína y la curcumina han demostrado efectos antiinflamatorios y antifibróticos en la enfermedad hepática, por lo que se pudiese investigar la combinación de la metformina con alguno de estos compuestos en la búsqueda de nuevas terapias farmacológicas.

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Cavalcanti A, Martins C. 2013. History of liver anatomy: Mesopotamian liver clay models. *IHPBA*. 15(4):322-323. DOI: 10.1111/j.1477-2574.2012.00555.x.
- 2.- Riva MA, Riva E, Spicci M, Strazzabosco M, Giovannini M, Cesana G. 2011. "The city of Hepar": Rituals, gastronomy, and politics at the origins of the modern names for the liver. *J Hepatol*. 55(5):1132-1136. DOI: 10.1016/j.jhep.2011.05.011.
- 3.- Power C, Rasko JE. 2008. Whither prometheus' liver? greek myth and the science of regeneration. *Ann Intern Med*. 149(6):421-426. DOI: 10.7326/0003-4819-149-6-200809160-00009.
- 4.- Muriel P. 2017. The liver: General aspects and epidemiology. En: Muriel P. editor. *Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants*. USA. Elsevier. pp. 3-22. DOI: 10.1016/B978-0-12-804274-8.00001-1.
- 5.- Sibulesky L. 2013. Anatomía normal del hígado. *Clin Liver Dis*. 2(S4): S61–S63. DOI: 10.1002/cld.275.
- 6.- Nagy P, Thorgeirsson SS, Grisham JW. 2020. Organizational principles of the liver. En: Arias IM, Alter HJ, Boyer JL, Cohen DE, Shafritz DA, Thorgeirsson SS, Wolkoff AW. Editores. *The liver: Biology and pathobiology*. USA. pp. 1-13. DOI:10.1002/9781119436812.
- 7.- Zhang W, Cui Y, Du Y, Yang Y, Fang T, Lu F, Kong W, Xiao C, Shi J, Reid LM, He Z. 2023. Liver cell therapies: Cellular sources and grafting strategies. *Front Med*. 17(3):432-457. DOI: 10.1007/s11684-023-1002-1.
- 8.- Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. 2017. The liver. *Curr Biol*. 27(21):1147-1151. DOI: 10.1016/j.cub.2017.09.019.
- 9.- Rappaport AM. 1976. The microcirculatory acinar concept of normal and pathological hepatic structure. *Beitr Pathol*. 157(3):215-243. DOI: 10.1016/s0005-8165(76)80083-2.
- 10.- Ho H, Means S, Safaei S, Hunter PJ. 2023. In silico modeling for the hepatic circulation and transport: From the liver organ to lobules. *WIREs Mech Dis*. 15(2): e1586. DOI: 10.1002/wsbm.1586.
- 11.- Porat-Shliom N. 2024. Compartmentalization, cooperation, and communication: The 3Cs of Hepatocyte zonation. *Curr Opin Cell Biol*. 86:102292. DOI: 10.1016/j.ceb.2023.102292.
- 12.- Cheng ML, Nakib D, Perciani CT, MacParland SA. 2021. The immune niche of the liver. *Clin Sci*. 135(20):2445-2466. DOI: 10.1042/CS20190654.

- 13.- Tsutsumi V, Nakamura T, Ueno T, Torimura T, Aguirre-García J. 2017. Structure and ultrastructure of the normal and diseased liver. En: Muriel P. editor. *Liver Pathophysiology: Therapies and Antioxidants*. USA. Elsevier. pp. 23-44. DOI: 10.1016/B978-0-12-804274-8.00001-1.
- 14.- Kubes P, Jenne C. 2018. Immune responses in the liver. *Annu Rev Immunol*. 36:247-277. DOI: 10.1146/annurev-immunol-051116-052415.
- 15.- Chen F, Schönberger K, Tchorz JS. 2023. Distinct hepatocyte identities in liver homeostasis and regeneration. *JHEP Rep*. 5(8):100779. DOI: 10.1016/j.jhepr.2023.100779.
- 16.- Paris J, Henderson NC. 2022. Liver zonation, revisited. *Hepatology*. 76(4):1219-1230. DOI: 10.1002/hep.32408.
- 17.- Neshat SY, Quiroz VM, Wang Y, Tamayo S, Doloff JC. 2021. Liver disease: Induction, progression, immunological mechanisms, and therapeutic interventions. *Int J Mol Sci*. 22(13):6777. DOI: 10.3390/ijms22136777.
- 18.- Kisseleva T, Brenner D. 2021. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 18(3):151-166. DOI: 10.1038/s41575-020-00372-7.
- 19.- Heymann F, Tacke F. 2016. Immunology in the liver-from homeostasis to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 13(2):88-110. DOI: 10.1038/nrgastro.2015.200.
- 20.- Peng H, Tian Z. 2018. NK cells in liver homeostasis and viral hepatitis. *Sci China Life Sci*. 61(12):1477-1485. DOI: 10.1007/s11427-018-9407-2.
- 21.- Ahmed IA., 2019. Major dietary interventions for the management of liver disease. En: Watson RR, Preedy VR., editor. *Dietary interventions in liver disease: Foods, nutrients, and dietary supplements*. USA. Elsevier. pp. 205-212.
- 22.- Zajkowska M, Mroczko B. 2022. Chemokines in primary liver cancer. *Int J Mol Sci*. 23(16):8846. DOI: 10.3390/ijms23168846.
- 23.- Devarbhavi H, Asrani SK, Arab JP, Nartey YA, Pose E, Kamath PS. 2023. Global burden of liver disease: 2023 update. *J Hepatol*. 79(2):516-537. DOI: 10.1016/j.jhep.2023.03.017.
- 24.- Rinella ME. 2015. Nonalcoholic fatty liver disease: A systematic review. *JAMA*. 313(22):2263-2273. DOI: 10.1001/jama.2015.5370.
- 25.- Parola M, Pinzani M. 2019. Liver fibrosis: Pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues. *Mol Aspects Med*. 65:37-55. DOI: 10.1016/j.mam.2018.09.002.
- 26.- Riazi K, Azhari H, Charette JH, Underwood FE, King JA, Afshar EE, Swain MG, Congly SE, Kaplan GG, Shaheen AA. 2022. The prevalence and incidence of

NAFLD worldwide: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 7(9):851-861. DOI: 10.1016/S2468-1253(22)00165-0.

27.- Alves-Bezerra M, Cohen DE. 2017. Triglyceride metabolism in the liver. *Compr Physiol.* 8(1):1-8. DOI: 10.1002/cphy.c170012.

28.- Vargas-Pozada EE, Ramos-Tovar E, Rodriguez-Callejas JD, Cardoso-Lezama I, Galindo-Gómez S, Talamás-Lara D, Vásquez-Garzón VR, Arellanes-Robledo J, Tsutsumi V, Villa-Treviño S, Muriel P. 2022. Caffeine inhibits NLRP3 inflammasome activation by downregulating TLR4/MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway in an experimental NASH model. *Int J Mol Sci.* 23(17):9954. DOI: 10.3390/ijms23179954.

29.- Mak LY, Cruz-Ramón V, Chinchilla-López P, Torres HA, LoConte NK, Rice JP, Foxhall LE, Sturgis EM, Merrill JK, Bailey HH, Méndez-Sánchez N, Yuen MF, Hwang JP. 2018. Global epidemiology, prevention, and management of hepatocellular carcinoma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 38:262-279. DOI: 10.1200/EDBK\_200939.

30.- Younossi Z, Anstee QM, Marietti M, Hardy T, Henry L, Eslam M, George J, Bugianesi E. 2018. Global burden of NAFLD and NASH: Trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 15(1):11-20. DOI: 10.1038/nrgastro.2017.109.

31.- Abdelmalek MF. 2021. Nonalcoholic fatty liver disease: Another leap forward. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 18(2):85-86. DOI: 10.1038/s41575-020-00406-0.

32.- Chidambaranathan-Reghupaty S, Fisher PB, Sarkar D. 2021. Hepatocellular carcinoma (HCC): Epidemiology, etiology and molecular classification. *Adv Cancer Res.* 149:1-61. DOI: 10.1016/bs.acr.2020.10.001.

33.- Buzzetti E, Pinzani M, Tsochatzis EA. 2016. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism.* 65(8):1038-1048. DOI: 10.1016/j.metabol.2015.12.012.

34.- Zhang Y, Wang H, Xiao H. 2021. Metformin actions on the liver: Protection mechanisms emerging in hepatocytes and immune cells against NASH-Related HCC. *Int J Mol Sci.* 22(9):5016. DOI: 10.3390/ijms22095016.

35.- Byrne CD, Targher G. 2015. NAFLD: A multisystem disease. *J Hepatol.* 62: S47-S64. DOI: 10.1016/j.jhep.2014.12.012.

36.- Sakurai Y, Kubota N, Yamauchi T, Kadowaki T. 2021. Role of insulin resistance in MAFLD. *Int J Mol Sci.* 22(8):4156. DOI: 10.3390/ijms22084156.

37.- Zinatizadeh MR, Schock B, Chalbatani GM, Zarandi PK, Jalali SA, Miri SR. 2020. The nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) signaling in cancer development and immune diseases. *Genes Dis.* 8(3):287-297. DOI: 10.1016/j.gendis.2020.06.005.

- 38.- Luedde T, Schwabe RF. 2011. NF- $\kappa$ B in the liver-linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 8(2):108-118. DOI: 10.1038/nrgastro.2010.213.
- 39.- Wang Y, Deng B. 2023. Hepatocellular carcinoma: Molecular mechanism, targeted therapy, and biomarkers. *Cancer Metastasis Rev*. 42(3):629-652. DOI: 10.1007/s10555-023-10084-4.
- 40.- Anwanwan D, Singh SK, Singh S, Saikam V, Singh R. 2020. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 1873(1):188314. DOI: 10.1016/j.bbcan.2019.188314.
- 41.- Urquijo-Ponce JJ, Alventosa-Mateu C, Latorre-Sánchez M, Castelló-Miralles I, Diago M. 2024. Present and future of new systemic therapies for early and intermediate stages of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 30(19):2512-2522. DOI: 10.3748/wjg.v30.i19.2512.
- 42.- Villarruel-Melquiades F, Mendoza-Garrido ME, García-Cuellar CM, Sánchez-Pérez Y, Pérez-Carreón JI, Camacho J. 2023. Current and novel approaches in the pharmacological treatment of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 29(17):2571-2599. DOI: 10.3748/wjg.v29.i17.2571.
- 43.- Mejia JC, Pasko J. 2020. Primary liver cancers: Intrahepatic cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma. *Surg Clin North Am*. 100(3):535-549. DOI: 10.1016/j.suc.2020.02.013.
- 44.- Zeya B, Nafees S, Imtiyaz K, Uroog L, Fakhri KU, Rizvi MMA. 2022. Diosmin in combination with naringenin enhances apoptosis in colon cancer cells. *Oncol Rep*. 47(1):4. DOI: 10.3892/or.2021.8215.
- 45.- Cheng K, Cai N, Zhu J, Yang X, Liang H, Zhang W. 2022. Tumor-associated macrophages in liver cancer: From mechanisms to therapy. *Cancer Commun*. 42(11):1112-1140. DOI: 10.1002/cac2.12345.
- 46.- Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, Viollet B. 2014. Metformin: From mechanisms of action to therapies. *Cell Metab*. 20(6):953-966. DOI: 10.1016/j.cmet.2014.09.018.
- 47.- Chen S, Gan D, Lin S, Zhong Y, Chen M, Zou X, Shao Z, Xiao G. 2022. Metformin in aging and aging-related diseases: Clinical applications and relevant mechanisms. *Theranostics*. 12(6): 2722-2740. DOI: 10.7150/thno.71360.
- 48.- Triggle CR, Mohammed I, Bshesh K, Marei I, Ye K, Ding H, MacDonald R, Hollenberg MD, Hill MA. 2022. Metformin: Is it a drug for all reasons and diseases? *Metabolism*. 133:155223. DOI: 10.1016/j.metabol.2022.155223.
- 49.- Bailey CJ. 2017. Metformin: Historical overview. *Diabetologia*. 60(9):1566-1576. DOI: 10.1007/s00125-017-4318-z.

- 50.- LaMoia TE, Shulman GI. 2021. Cellular and molecular mechanisms of metformin action. *Endocr Rev.* 42(1):77-96. DOI: 10.1210/edrv/bnaa023.
- 51.- Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong JK, Furlong TJ, Greenfield JR, Greenup LC, Kirkpatrick CM, Ray JE, Timmins P, Williams KM. 2011. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet.* 50(2):81-98. DOI: 10.2165/11534750-000000000-00000.
- 52.- Gong L, Goswami S, Giacomini KM, Altman RB, Klein TE. 2012. Metformin pathways: Pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics.* 22(11):820-827. DOI: 10.1097/FPC.0b013e3283559b22.
- 53.- Pernicova I, Korbonits M. 2014. Metformin-mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat Rev Endocrinol.* 10(3):143-156. DOI: 10.1038/nrendo.2013.256.
- 54.- Konopka AR, Esponda RR, Robinson MM, Johnson ML, Carter RE, Schiavon M, Cobelli C, Wondisford FE, Lanza IR, Nair KS. 2016. Hyperglucagonemia mitigates the effect of metformin on glucose production in prediabetes. *Cell Rep.* 15(7):1394-1400. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.04.024.
- 55.- Lu G, Wu Z, Shang J, Xie Z, Chen C, Zhang C. 2021. The effects of metformin on autophagy. *Biomed Pharmacother.* 137:111286. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111286.
- 56.- Bharath LP, Nikolajczyk BS. 2021. The intersection of metformin and inflammation. *Am J Physiol. Cell Physiol.* 320(5):873-879. DOI: 10.1152/ajpcell.00604.2020.
- 57.- Arrieta O, Barrón F, Padilla MS, Avilés-Salas A, Ramírez-Tirado LA, Arguelles Jiménez MJ, Vergara E, Zatarain-Barrón ZL, Hernández-Pedro N, Cardona AF, Cruz-Rico G, Barrios-Bernal P, Yamamoto Ramos M, Rosell R. 2019. Effect of metformin plus tyrosine kinase inhibitors compared with tyrosine kinase inhibitors alone in patients with epidermal growth factor receptor-mutated lung adenocarcinoma: A phase 2 randomized clinical trial. *JAMA Oncol.* 5(11):e192553. DOI: 10.1001/jamaoncol.2019.2553.
- 58.- Xu H, Zhou Y, Liu Y, Ping J, Shou Q, Chen F, Ruo R. 2016. Metformin improves hepatic IRS2/PI3K/Akt signaling in insulin-resistant rats of NASH and cirrhosis. *J Endocrinol.* 229(2):133-144. DOI: 10.1530/JOE-15-0409.
- 59.- Mustafa S, Akbar M, Khan MA, Sunita K, Parveen S, Pawar JS, Massey S, Agarwal NR, Husain SA. 2022. Plant metabolite diosmin as the therapeutic agent in human diseases. *Curr Res Pharmacol Drug Discov.* 3:100122. DOI: 10.1016/j.crphar.2022.100122.
- 60.- Gandhi GR, Vasconcelos ABS, Wu DT, Li HB, Antony PJ, Li H, Geng F, Gurgel RQ, Narain N, Gan RY. 2020. Citrus flavonoids as promising phytochemicals

targeting diabetes and related complications: A systematic review of in vitro and in vivo studies. *Nutrients*. 12(10):2907. DOI: 10.3390/nu12102907.

61.- Cazaubon M, Benigni JP, Steinbruch M, Jabbour V, Gouhier-Kodas C. 2021. Is there a difference in the clinical efficacy of diosmin and micronized purified flavonoid fraction for the treatment of chronic venous disorders? review of available evidence. *Vasc Health Risk Manag*. 17:591-600. DOI: 10.2147/VHRM.S324112.

62.- Gerges SH, Wahdan SA, Elsherbiny DA, El-Demerdash E. 2022. Pharmacology of diosmin, a citrus flavone glycoside: An updated review. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 47(1):1-18. DOI: 10.1007/s13318-021-00731-y.

63.- Zheng Y, Zhang R, Shi W, Li L, Liu H, Chen Z, Wu L. 2020. Metabolism and pharmacological activities of the natural health-benefiting compound diosmin. *Food Funct*. 11(10):8472-8492. DOI: 10.1039/d0fo01598a.

64.- Ramelet AA, 2017. Venoactive Drugs, en Mitchel P., et al., editor. *Sclerotherapy*. Elsevier, pp.426-434.

65.- Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias-Guiu X. 2005. NF- $\kappa$ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch*. 446(5):475-482. DOI: 10.1007/s00428-005-1264-9.

66.- Imran M, Rauf A, Abu-Izneid T, Nadeem M, Shariati MA, Khan IA, Imran A, Orhan IE, Rizwan M, Atif M, Gondal TA, Mubarak MS. 2019. Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review. *Biomed Pharmacother*. 112:108612. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108612.

67.- Silvestro L, Tarcomnicu I, Dulea C, Attili NR, Ciuca V, Peru D, Rizea Savu S. 2013. Confirmation of diosmetin 3-O-glucuronide as major metabolite of diosmin in humans, using micro-liquid-chromatography-mass spectrometry and ion mobility mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 405(25):8295-8310. DOI: 10.1007/s00216-013-7237-y.

68.- Martinez-Zapata MJ, Vernooij RW, Simancas-Racines D, Uriona Tuma SM, Stein AT, Moreno Carriles RMM, Vargas E, Bonfill Cosp X. 2020. Phlebotonics for venous insufficiency. *Cochrane Database Syst Rev*. 11(11):CD003229. DOI: 10.1002/14651858.CD003229.pub4.

69.- Huwait E, Mobashir M. 2022. Potential and therapeutic roles of diosmin in human diseases. *Biomedicines*. 10(5):1076. DOI: 10.3390/biomedicines10051076.

70.- Lewinska A, Adamczyk-Grochala J, Kwasniewicz E, Deregowska A, Wnuk M. 2017. Diosmin-induced senescence, apoptosis and autophagy in breast cancer cells of different p53 status and ERK activity. *Toxicol Lett*. 265:117-130. DOI: 10.1016/j.toxlet.2016.11.018.

- 71.- Reitman S, Frankel S. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol.* 28(1):56-63. DOI: 10.1093/ajcp/28.1.56.
- 72.- Glossmann H, Neville DM. 1972. Gamma-glutamyltransferase in kidney brush border membranes. *FEBS Lett.* 19(4):340-344. DOI: 10.1016/0014-5793(72)80075-9.
- 73.- Rojkind M, González E. 1974. An improved method for determining specific radioactivities of proline-14C and hydroxyproline-14C in collagen and in noncollagenous proteins. *Anal Biochem.* 57(1):1-7. DOI: 10.1016/0003-2697(74)90043-8.
- 74.- Afarin R, Dinarvand N, Jaberian Asl B, Orak G, Shakerian E, Bineshfar F, Ahangarpour A. 2024. Comparison of the anti-inflammatory and antilipidemic activity of diosmin and saroglitazar in a model of nonalcoholic fatty liver induced by a high-fat diet in Wistar rats. *Iran J Basic Med Sci.* 27(2):241-246. DOI: 10.22038/IJBMS.2023.70157.15255.
- 75.- Uehara T, Pogribny IP, Rusyn I. 2014. The DEN and CCl<sub>4</sub> -induced mouse model of fibrosis and inflammation-associated hepatocellular carcinoma. *Curr Protoc Pharmacol.* 66:14.30.1-14.30.10. DOI: 10.1002/0471141755.ph1430s66.
- 76.- Schulien I, Hasselblatt P. 2020. Diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in mice. *Methods Cell Biol.* 163:137-152. DOI: 10.1016/bs.mcb.2020.08.006.
- 77.- Perumal S, Babu LH, Langeswaran K, Kumar SG, Balasubramanian MP. 2015. Pharmacological potential of natural flavonoid diosmin against n-nitrosodiethylamine induced hepatocellular carcinogenesis in Wistar albino rats. 4(1):25-36.
- 78.- Gormsen LC, Søndergaard E, Christensen NL, Brøsen K, Jessen N, Nielsen S. 2019. Metformin increases endogenous glucose production in non-diabetic individuals and individuals with recent-onset type 2 diabetes. *Diabetologia.* 62(7):1251-1256. doi: 10.1007/s00125-019-4872-7.
- 79.- Liu F, Wang C, Zhang L, Xu Y, Jang L, Gu Y, Cao X, Zhao X, Ye J, Li Q. 2014. Metformin prevents hepatic steatosis by regulating the expression of adipose differentiation-related protein. *Int J Mol Med.* 33(1):51-58. DOI: 10.3892/ijmm.2013.1560.
- 80.- Dutta S, Shah RB, Singhal S, Dutta SB, Bansal S, Sinha S, Haque M. 2023. Metformin: A review of potential mechanism and therapeutic utility beyond diabetes. *Drug Des Devel Ther.* 17:1907-1932. DOI: 10.2147/DDDT.S409373.
- 81.- Witters LA. 2001. The blooming of the French lilac. *J Clin Invest.* 108(8):1105-1107. DOI: 10.1172/JCI14178.

82.- Luangmonkong T, Parichatikanond W, Olinga P. 2023. Targeting collagen homeostasis for the treatment of liver fibrosis: Opportunities and challenges. *Biochem Pharmacol.* 215:115740. DOI: 10.1016/j.bcp.2023.115740.

83.- Abdel-Reheim MA, Shehata Messiha BA, Abo-Saif AA. 2017. Hepatoprotective effect of diosmin on iron-induced liver damage. *Int J Pharmacol.* 13(6):529-540. DOI: 10.3923/ijp.2017.529.540.

84.- Caravaca-Fontán F, Azevedo L, Bayo MÁ, Gonzales-Candia B, Luna E, Caravaca F. 2017. High levels of both serum gamma-glutamyl transferase and alkaline phosphatase are independent predictors of mortality in patients with stage 4-5 chronic kidney disease. *Nefrologia.* 37(3):267-275. doi: 10.1016/j.nefro.2016.11.010.

85.- Gerges SH, Wahdan SA, Elsherbiny DA, El-Demerdash E. 2020. Diosmin ameliorates inflammation, insulin resistance, and fibrosis in an experimental model of non-alcoholic steatohepatitis in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 401:115101. DOI: 10.1016/j.taap.2020.115101.