

Efecto de la NeuroEPO en el hígado de ratas diabéticas

Effect of NeuroEPO on the liver of diabetic rats

Ketty Suárez Borrás^{1*} <https://orcid.org/0000-0002-3998-1657>

Mónica Elena Fernández Jiménez¹ <https://orcid.org/0000-0002-5094-6721>

Alicia Borroto Leiseca¹ <https://orcid.org/0000-0002-5567-9052>

Gisselle Fernández Peña¹ <https://orcid.org/0000-0002-5339-8118>

Víctor Manuel Rodríguez Sosa¹ <https://orcid.org/0000-0002-4755-2166>

Melvis Taylín Zumeta Dubé¹ <https://orcid.org/0000-0002-6240-8883>

Mairen Sotomayor Gonzalez² <https://orcid.org/0000-0001-6332-4916>

Carlos Luis Pérez Hernández¹ <https://orcid.org/0000-0002-7063-6843>

Tammy Fernández Romero¹ <https://orcid.org/0000-0002-2478-6365>

¹Universidad de Ciencias Médicas de La Habana, Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón". La Habana, Cuba.

²Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia: suarezkety42@gmail.com

RESUMEN

Introducción: La enfermedad hepática grasa no alcohólica es una complicación de la diabetes mellitus con opciones terapéuticas limitadas. Se ha demostrado que la NeuroEPO reduce la hiperglicemia en ratas diabéticas.

Objetivo: Evaluar el efecto de la NeuroEPO en el hígado de ratas diabéticas.

Métodos: Se provocó diabetes con estreptozotocina en ratas Wistar. Dos grupos recibieron NeuroEPO y otro vehículo, tres veces por semana durante cinco semanas, vía subcutánea. Se utilizó un grupo control de ratas sanas. Se determinaron la glicemia, las transaminasas plasmáticas y la estructura hepática. Se compararon la varianza de un factor y Newman-Keuls, y las diferencias resultaron significativas con $p < 0,05$.

Resultados: El grupo vehículo presentó hiperglicemia, aumento del peso en el hígado, hepatocitos con alteraciones estructurales, dilatación y congestión sinusoidal moderada, infiltrado inflamatorio y esteatosis leves. El grupo con 0,25 mg/kg de NeuroEPO mostró menor hiperglicemia, mejor organización y estructura de los hepatocitos, menor dilatación, congestión sinusoidal e infiltrado inflamatorio, y ausencia de esteatosis. En el grupo con 0,5 mg/kg de NeuroEPO disminuyó la hiperglicemia y solo un animal presentó esteatosis, pero se apreció mayor alteración del peso hepático relativo, la estructura de los hepatocitos y las sinusoides; además de hemorragia focal e infiltrado inflamatorio moderado. Las concentraciones de transaminasas no se diferenciaron significativamente, pero fueron mayores en las ratas diabéticas.

Conclusiones: La NeuroEPO administrada por vía subcutánea a ratas diabéticas a la dosis de 0,25 mg/kg protege el hígado de los daños provocados por la diabetes. El doble de esa dosis provoca efectos adversos.

Palabras clave: ratas diabéticas; estreptozotocina; nefropatía diabética; eritropoyetina; NeuroEPO.

ABSTRACT

Introduction: Non-alcoholic fatty liver disease, a complication of diabetes mellitus, presents limited therapeutic options. NeuroEPO has been shown to reduce hyperglycemia in diabetic rats.

Objective: To evaluate the effect of NeuroEPO on the liver of diabetic rats.

Methods: Diabetes was induced with streptozotocin in Wistar rats. Two groups received NeuroEPO three times a week for five weeks, subcutaneously. A control group of healthy rats was used. Glycemia, plasma transaminases and liver

structure were determined. One-factor variance and Newman-Keuls were compared, and the differences were significant at $p < 0.05$.

Results: The vehicle group presented hyperglycemia, increased liver weight, hepatocytes with structural alterations, moderate sinusoidal dilatation and congestion, inflammatory infiltrate and mild steatosis. The group with 0.25 mg/kg NeuroEPO showed less hyperglycemia; better organization and structure of hepatocytes; less dilatation, sinusoidal congestion and inflammatory infiltrate; and absence of steatosis. In the group with 0.5 mg/kg NeuroEPO, hyperglycemia decreased and only one animal presented steatosis, but there was greater alteration of the relative hepatic weight, hepatocyte structure and sinusoids; in addition to focal hemorrhage and moderate inflammatory infiltrate. Transaminase concentrations did not differ significantly, but were higher in diabetic rats.

Conclusions: NeuroEPO, administered subcutaneously at the dose of 0.25 mg/kg in diabetic rats, protects the liver from diabetes-induced damage. Twice that dose causes adverse effects.

Keywords: diabetic rats; streptozotocin; diabetic nephropathy; erythropoietin; NeuroEPO.

Recibido: 11/02/2025

Aceptado: 23/04/2025

Introducción

Según la Federación Internacional de la Diabetes, 537 millones de adultos padecen diabetes mellitus en el mundo y se estima su incremento a 783 millones para 2045.⁽¹⁾ Este padecimiento provoca frecuentemente morbilidad y mortalidad en la población. En Cuba tiene una tendencia al ascenso y se encuentra entre las 10 primeras causas de muerte.⁽²⁾

La enfermedad hepática grasa no alcohólica (NAFLD) constituye una de las complicaciones de la diabetes mellitus y comprende trastornos como la esteatosis hepática aislada, la esteatohepatitis, la cirrosis y el carcinoma hepatocelular. Aunque se asocia, por lo general, a la diabetes mellitus tipo 2, se ha incrementado su prevalencia en la diabetes mellitus tipo 1. Se considera un problema grave de salud; sin embargo, no tiene tratamiento específico y las opciones terapéuticas se limitan a cambios en el estilo de vida, con un adecuado control glicémico.⁽³⁾

En los pacientes diabéticos resulta difícil el control metabólico, por ello se investigan sustancias que puedan proteger al hígado, como la eritropoyetina (EPO). Estudios experimentales han demostrado efectos hepatoprotectores de la EPO recombinante humana (rhuEPO), mediados por mecanismos antiapoptóticos, pro-proliferativos, angiogénicos, antioxidantes y antiinflamatorios.^(4,5,6)

La NeuroEPO constituye una variante de rhuEPO, producida en el Centro de Inmunología Molecular de Cuba, que ha mostrado neuroprotección en afecciones del sistema nervioso central.⁽⁷⁾ Además, en estudios realizados en el Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas “Victoria de Girón”- Facultad de Ciencias Médicas (ICBP), la administración repetida de 0,5 mg/kg de NeuroEPO, vía subcutánea, a ratas con diabetes inducida por estreptozotocina, disminuyó la hiperglicemia.^(8,9) A partir de estos resultados, el objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la NeuroEPO en el hígado de ratas diabéticas.

Métodos

Se realizó una investigación con diseño experimental de enero de 2023 a febrero de 2024, aprobada por el Consejo Científico y el Comité de Ética de la Investigación del Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas “Victoria de Girón”. Se emplearon ratas Wistar hembras adultas, con 200 g-250 g de peso corporal, provenientes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio de Cuba. Se mantuvieron con ciclos de 12 horas luz/12 horas oscuridad, temperatura de 21°C - 23°C, y acceso libre a alimento estándar y agua filtrada. Se

utilizó la menor cantidad de animales para cumplir las exigencias del tipo de estudio y el principio de las 3R.⁽¹⁰⁾

Después de una semana de adaptación al medio, a un grupo se le administró estreptozotocina (SIGMA), 65 mg/kg en 200 μ L de *buffer* citrato de sodio 0,1 M (pH 4,5) por vía intraperitoneal. A los siete días se determinó la glicemia (glucómetro SUMA) en sangre, la cual se obtuvo de la punta de la cola, y se diagnosticó la diabetes mellitus por niveles superiores a 11 mM.⁽¹¹⁾ Se formaron tres grupos de ratas diabéticas de manera aleatoria y un grupo de ratas sanas, cada uno de cinco animales: grupo 1- sanas, grupo 2- diabéticas con vehículo, grupo 3- diabéticas con 0,25 mg/kg de NeuroEPO y grupo 4- diabéticas con 0,5 mg/kg de NeuroEPO.

La NeuroEPO y el vehículo se administraron por vía subcutánea, una vez al día, tres veces por semana, durante cinco semanas. Al finalizar el experimento, se realizó la eutanasia por desangrado (punción intracardiaca) bajo anestesia⁽¹²⁾ (tiopental sódico 50 mg/kg intraperitoneal). La sangre se colectó con ácido etilendiamintetracético (EDTA) al 5,6 %, 1 mg/ml, se centrifugó (centrífuga Eppendorf) a 3000 rpm durante 15 min a 4°C, y se separó el plasma. Se extrajo el hígado para su estudio morfológico.

Las variables bioquímicas fueron la glicemia (mmol/L), que se realizó en ayuno de 6 h, iniciado en la mañana, antes de la primera dosis y después de la última dosis (glucómetro SUMA); la concentración (UI/L) de alanina aminotransferasa y el aspartato aminotransferasa en plasma (analizador Mindray BS-200E y reactivos HEL-FA).

Se determinó el peso del hígado con balanza digital Gibertini, y un fragmento del lóbulo mayor⁽¹³⁾ se colocó en formol al 10 % (buffer NaH_2PO_4 0,03 M- Na_2HPO_4 0,05 M, pH 7) de 24 h a 48 h para su fijación y posterior inclusión en parafina.⁽¹⁴⁾ Se prepararon cuatro láminas histológicas por animal, cada una con tres cortes de 5 μ m de espesor (micrótopo Histo-Line Laboratories MR 300); dos se tiñeron con hematoxilina y eosina⁽¹⁴⁾ y dos con la tinción Tricrómica de Mallory.^(14,15)

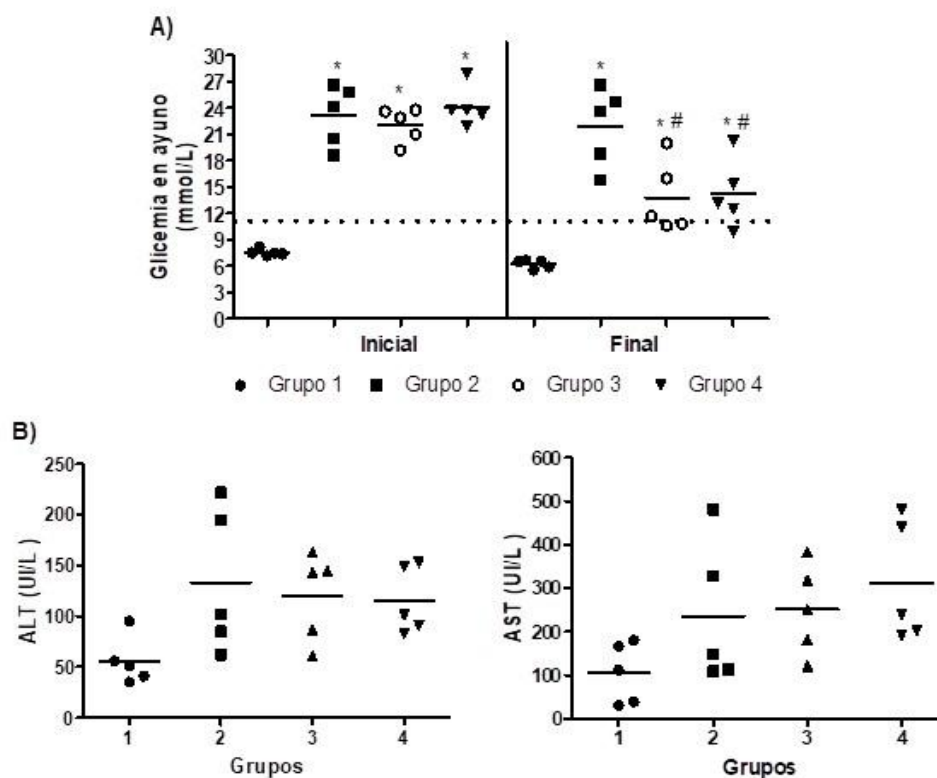
De cada coloración se observaron al microscopio óptico (Motic BA 210) 10 campos seleccionados al azar por animal. Los signos histológicos se clasificaron en ausente, leve, moderado o severo,^(13,16) según su presencia, número de animales y extensión de tejido afectados. Con el programa ImageJ⁽¹⁷⁾ se realizó el

estudio morfométrico de 20 hepatocitos en cada zona del lobulillo (periportal, intermedia y perivenosa), en imágenes digitales (cámara Moticam acoplada al microscopio) obtenidas de las láminas con eosina.

Se utilizó el programa GraphPad Prism, versión 5.01 para Windows, para el procesamiento estadístico. Las variables siguieron una distribución normal con la prueba Kolmogorov Smirnov. Para las comparaciones se emplearon las pruebas análisis de la varianza (ANOVA) de un factor y Newman-Keuls. Las diferencias se consideraron significativas con valores de $p < 0,05$.

Resultados

Al inicio del estudio la glicemia promedio se asemejó en los tres grupos de ratas diabéticas, con más de 20 mmol/L; en cambio, al finalizar el experimento se redujo en los grupos con NeuroEPO. No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de transaminasas entre los grupos del estudio, pero en la mayoría de los animales diabéticos los valores superaron la media del grupo de ratas sanas (fig. 1).



Nota: n = 5. A) Inicial - antes de la primera dosis; Final - después de administrar 15 dosis; * $p < 0,05$ contra grupo 1; # $p < 0,05$ contra grupo 2 (ANOVA de un factor y prueba de Newman-Keuls). B) $p > 0,05$ (ANOVA de un factor).

Leyenda: ALT - alanina aminotransferasa; AST- aspartato aminotransferasa

Fig. 1 - Glicemia y transaminasas de ratas diabéticas que recibieron NeuroEPO y sus controles.

El peso del hígado resultó mayor en los tres grupos de ratas diabéticas que en el de ratas sanas, sin diferencias con el uso de la NeuroEPO. Un resultado similar se observó en el peso relativo de los grupos 2 y 3, pero en el 4 fue superior que en el resto de los grupos (tabla 1).

Tabla 1 - Peso del hígado de ratas diabéticas que recibieron NeuroEPO y sus controles

Grupos	Peso (g)	Peso relativo (g/100 g- peso corporal)
Grupo 1	6,30 ± 0,44	2,79 ± 0,19
Grupo 2	8,04 ± 1,23 *	4,10 ± 0,39 *
Grupo 3	7,92 ± 0,69 *	4,13 ± 0,19 *

Grupo 4	8,01 ± 0,93 *	4,78 ± 0,57 * [#]
---------	---------------	----------------------------

Nota: Media ± desviación estándar. * $p < 0,05$ contra grupo 1; [#] $p < 0,05$ contra grupo 2; $p < 0,05$ contra grupo 3 (ANOVA de un factor y prueba de Newman-Keuls) (n = 5).

En el estudio histológico cualitativo del hígado, el grupo 1 mostró una estructura general preservada, con células binucleadas y sin esteatosis, infiltrado inflamatorio o necrosis. El grupo 2 también presentó células binucleadas y ausencia de necrosis, pero evidenció pérdida de la arquitectura de los hepatocitos, dilatación y congestión sinusoidal moderada, e infiltrado inflamatorio leve de linfocitos y macrófagos en las zonas periportal y perivenosa; en tres animales se apreció esteatosis microvacuolar leve, con predominio en las zonas periportal e intermedia, y macrovacuolar en la intermedia (tabla 2, figs. 2 y 3).

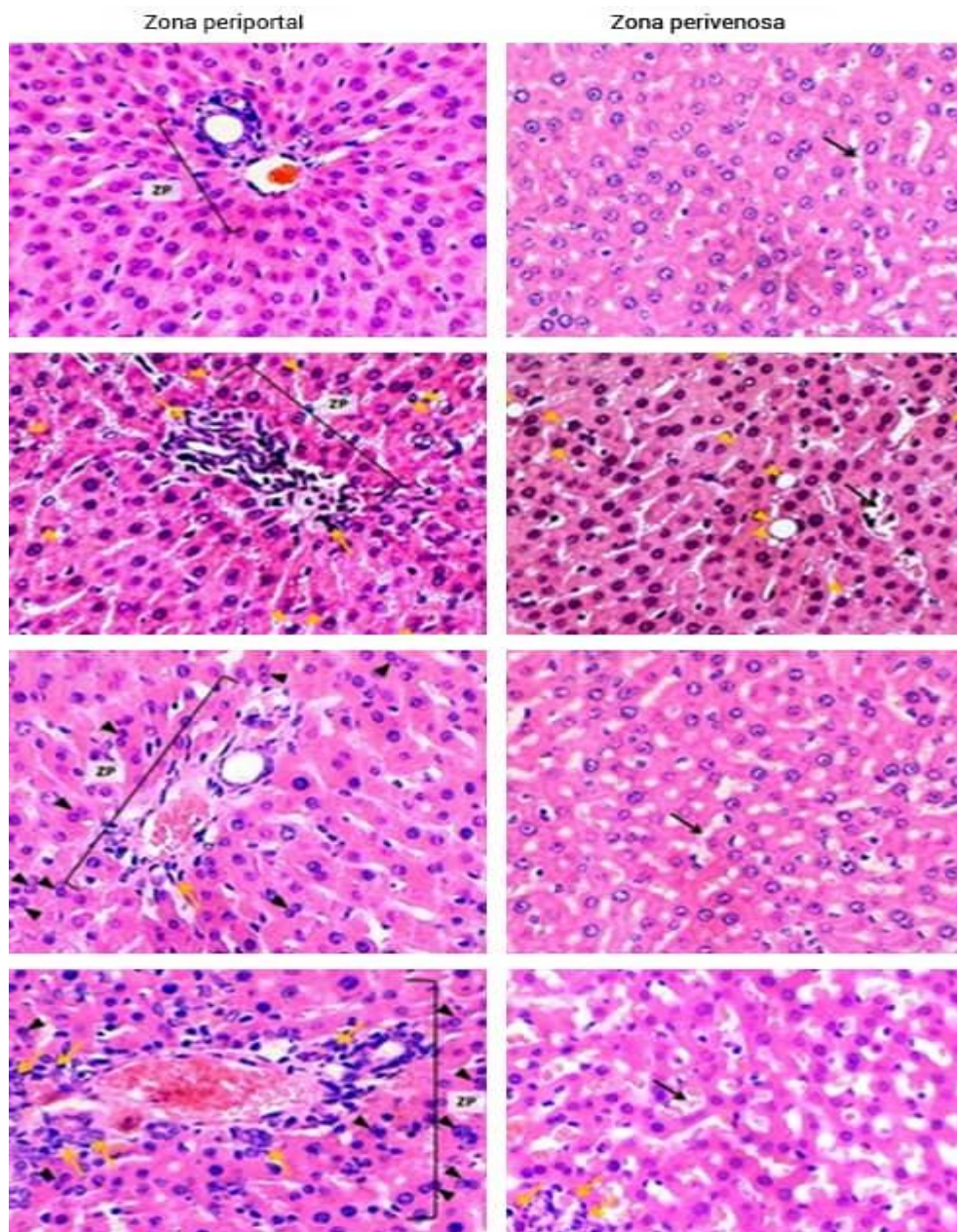
Las ratas del grupo 3 presentaron una arquitectura de los hepatocitos similar a la del grupo 1: incremento aparente de células binucleadas y ausencia de esteatosis o necrosis; en cuatro animales se constató dilatación y congestión sinusoidal leve, e infiltrado inflamatorio ligero de linfocitos y macrófagos en la zona periportal. El grupo 4 mostró un aumento de hepatocitos binucleados sin necrosis y un animal con esteatosis en las zonas periportal e intermedia; además de pérdida de la arquitectura de los hepatocitos, dilatación y congestión sinusoidal severa, infiltrado inflamatorio focal de linfocitos, macrófagos y polimorfonucleares, y hemorragia focal (tabla 2, figs. 2 y 3). No se apreció fibrosis en ninguno de los grupos (tabla 2, fig. 4).

Tabla 2 - Características histológicas del hígado de ratas diabéticas que recibieron NeuroEPO y sus controles

Variables	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Arquitectura alterada	0	+++	+	+++
Dilatación y congestión sinusoidal	0	++	+	+++
Inflamación	0	+	+	++
Hemorragia	0	0	0	++
Presencia de células binucleadas	+	+	++	++
Esteatosis	0	+	0	+
Fibrosis	0	0	0	0

Necrosis	0	0	0	0
----------	---	---	---	---

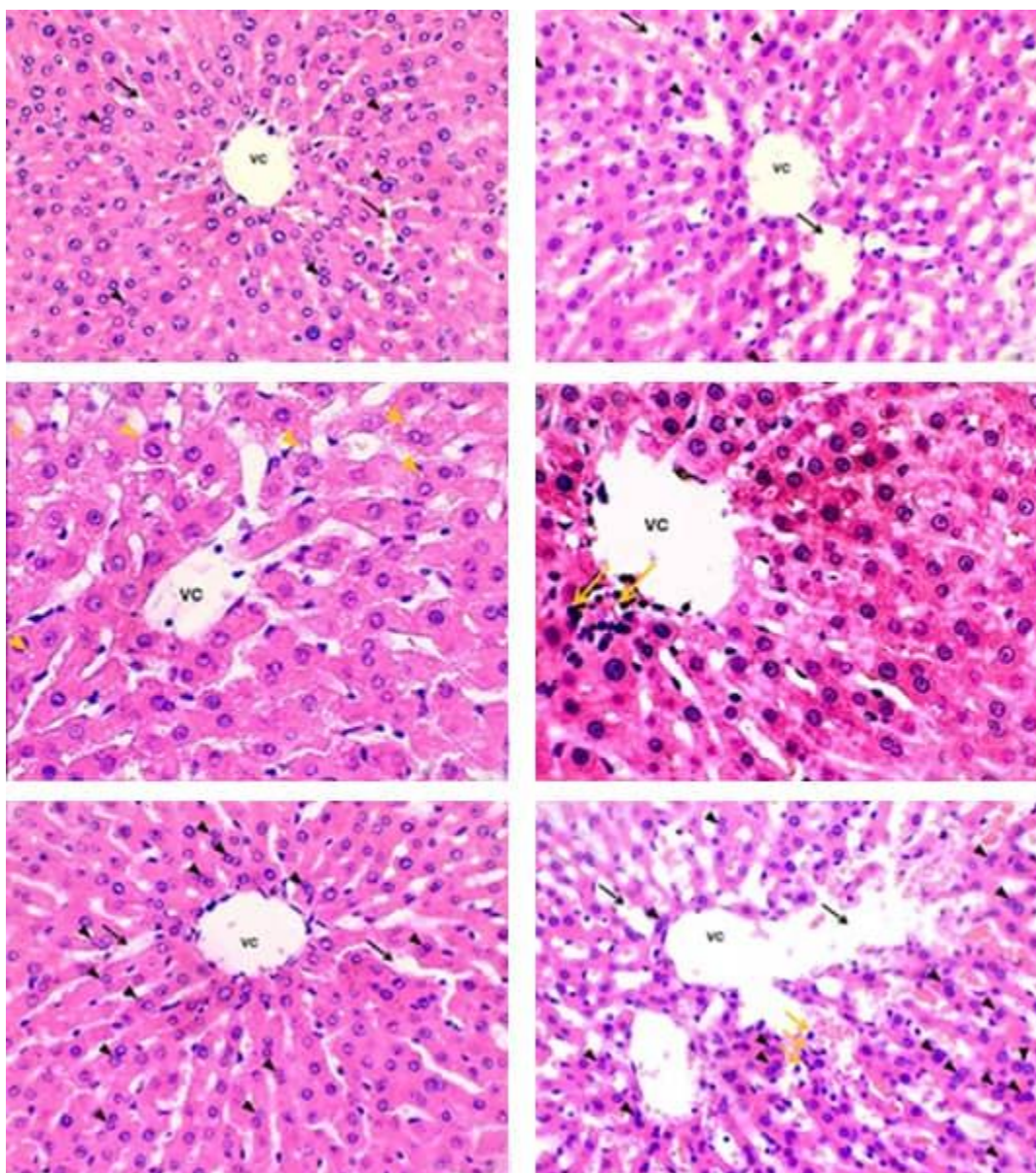
Nota: 0: ausente; +: leve; ++: moderado; +++: severo.



Nota: La flecha negra indica sinusoides; la punta de flecha negra, células binucleadas; la flecha amarilla, infiltrado inflamatorio y la punta de flecha amarilla, vacuolas de grasa. Se empleó coloración hematoxilina y eosina, y magnificación 400x.

Leyenda: ZP = zona portal.

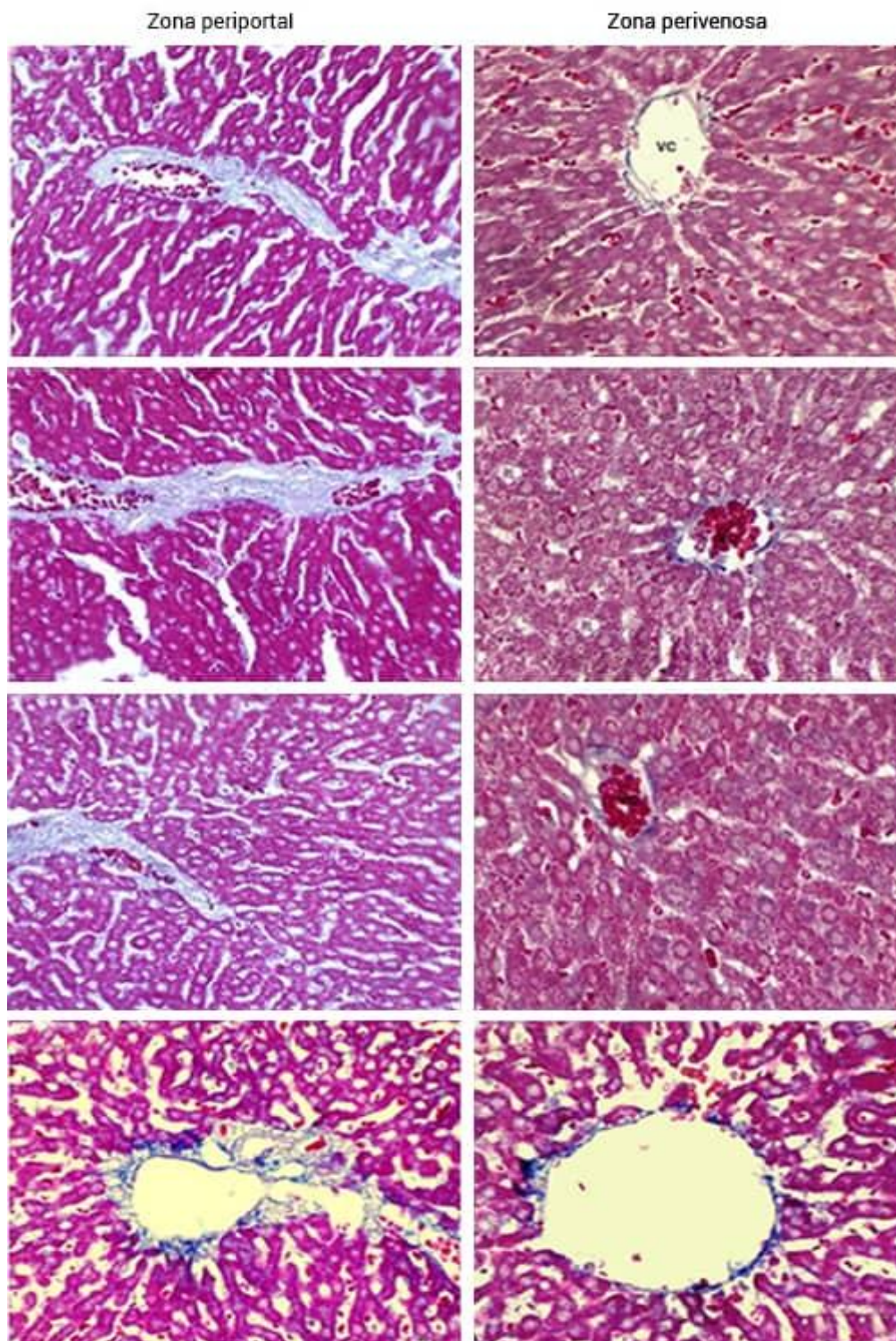
Fig. 2 - Micrografías ópticas representativas de las zonas periportal e intermedia del lobulillo hepático de ratas diabéticas que recibieron NeuroEPO y sus controles.



Nota: La flecha negra indica sinusoides; la punta de flecha negra, células binucleadas; la flecha amarilla, infiltrado inflamatorio y la punta de flecha amarilla, vacuolas de grasa. Se empleó coloración hematoxilina y eosina, y magnificación 400x.

Leyenda: VC = vena centrolobulillar.

Fig. 3 - Micrografías ópticas representativas de la zona perivenosa del lobulillo hepático de ratas diabéticas que recibieron NeuroEPO y sus controles.



Nota: Se empleó coloración tricrómica de Mallory, y magnificación 400x.

Leyenda: VC = vena centrolobulillar.

Fig. 4 - Micrografías ópticas representativas de la zona periportal y perivenosa del lobulillo hepático de ratas diabéticas que recibieron NeuroEPO y sus controles.

En el estudio morfométrico de los hepatocitos, el área de los núcleos del grupo 2 fue mayor que en el grupo 1 en las tres zonas del lobulillo; asimismo, el área de los núcleos de los grupos 3 y 4 en las zonas periportal e intermedia resultó superior al grupo 1, pero menor que en el 2. El área de los núcleos del grupo 3 se asemejó al grupo 1 en la zona perivenosa, mientras que en el grupo 4 sobrepasó a los grupos 1 y 3, lo cual se acompañó de un área de citoplasma más pequeña que en el resto de los grupos (tabla 3).

Tabla 3 - Morfometría de hepatocitos de ratas diabéticas que recibieron NeuroEPO y sus controles

G	Área de la célula (μm^2)			Área del núcleo (μm^2)			Área del citoplasma (μm^2)		
	PP	IM	PV	PP	IM	PV	PP	IM	PV
1	72,6 $\pm$ 13,9	77,6 $\pm$ 13,2	80,3 $\pm$ 14,3	17,9 $\pm$ 3,5	19,3 $\pm$ 4,2	17,7 $\pm$ 3,9	54,7 $\pm$ 12,6	58,3 $\pm$ 11,7	62,6 $\pm$ 13,5
2	71,4 $\pm$ 10,7	78,6 $\pm$ 10,8	81,5 $\pm$ 14,8	20,0* $\pm$ 3,2	23,8* $\pm$ 3,9	19,2* $\pm$ 3,8	51,5 $\pm$ 10,6	54,8 $\pm$ 10,9	62,3 $\pm$ 14,3
3	72,8 $\pm$ 13,3	78,0 $\pm$ 9,0	82,0 $\pm$ 14,6	19,9* $\pm$ 3,6	21,6* [#] $\pm$ 3,4	18,4 $\pm$ 4,5	52,9 $\pm$ 12,6	56,3 $\pm$ 9,1	63,7 $\pm$ 13,6
4	71,3 $\pm$ 13,3	76,2 $\pm$ 10,6	77,8 $\pm$ 15,3	19,1* $\pm$ 4,4	21,3* [#] $\pm$ 4,4	20,3* [†] $\pm$ 5,7	52,2 $\pm$ 11,5	54,9 $\pm$ 10,7	57,5* ^{#†} $\pm$ 13,3

Nota: Media $\pm$ desviación estándar. n= 100. *p < 0,05 contra grupo 1; [#]p < 0,05 contra grupo 2; [†]p < 0,05 contra grupo 3 (ANOVA de un factor y prueba de Newman-Keuls).

Leyenda: PP = zona periportal; IM = zona intermedia; PV = zona perivenosa.

Discusión

Las modificaciones evidenciadas en el hígado de ratas Wistar adultas corroboraron la efectividad del modelo de diabetes mellitus inducido con estreptozotocina. El hígado de las ratas diabéticas que recibieron el vehículo manifestó alteraciones morfológicas, dadas por la pérdida de la arquitectura de los cordones de hepatocitos, la dilatación y la congestión sinusoidal, infiltrado inflamatorio y esteatosis. Estos fenómenos también se han observado en otras investigaciones.^(16,18,19,20) Asimismo, el incremento del área de los núcleos de los hepatocitos en las tres zonas del lobulillo concordó con estudios en ratas que han consumido estreptozotocina por cinco semanas.⁽¹⁸⁾ La ausencia de fibrosis se correspondió con el corto tiempo de evolución de la diabetes mellitus, ya que

las lesiones fibróticas aparecen, por lo general, a las 26 semanas de administrar la estreptozotocina.⁽²¹⁾

El modelo de diabetes mellitus inducido con estreptozotocina imita el daño tisular crónico provocado por la hiperglicemia, pero puede afectar otros órganos.⁽²¹⁾ Sin embargo, los efectos sistémicos se evidencian durante las primeras dos semanas;⁽²¹⁾ por tanto, las alteraciones encontradas en el hígado de las ratas a las seis semanas se deben a la diabetes y no a una acción tóxica de la estreptozotocina.

El mayor peso del hígado en las ratas que recibieron el vehículo se atribuye, en parte, a la esteatosis. El déficit de insulina favorece la liberación de glucagón y la lipólisis en el tejido adiposo, lo que incrementa la llegada de ácidos grasos al hígado y la formación de triglicéridos. Además, la formación y la secreción de las lipoproteínas de baja densidad (VLDL) disminuye en esta condición, por menor síntesis de proteínas.⁽²²⁾ Algunos factores como las proteínas de unión a elementos de respuesta a carbohidratos y a esteroides, se activan en hiperglicemia y promueven la lipogénesis con independencia de la insulina.⁽²³⁾

Se ha descrito un predominio de la esteatosis en la región perivenosa del lobulillo hepático en humanos diabéticos,⁽²⁴⁾ debido a una expresión mayor de genes de la lipogénesis. Sin embargo, varias investigaciones han revelado perfiles de zonación hepática discordantes entre humanos y roedores, con mayor expresión de genes lipogénicos en la zona periportal de los ratones;^(25,26) lo cual explicaría el predominio de la esteatosis en las zonas periportal e intermedia en el grupo que recibió el vehículo, como ha sido reportado en otros estudios.^(16,20)

No se encontró esteatosis hepática en las ratas que recibieron la dosis más baja de NeuroEPO, y solo se observó en un animal con la dosis más alta. Previamente, se había observado que la EPO reducía la esteatosis por disminución de la resistencia a la insulina y el estrés oxidativo,^(5,6) mecanismos que pudieran mediar en los efectos de la NeuroEPO en el hígado de ratas diabéticas.

Lo referido demuestra un beneficio de la NeuroEPO en la prevención de la esteatosis hepática en ratas diabéticas, pero también sugiere la implicación de otros factores en el aumento del peso del hígado, como la inflamación, constatada en todos los grupos. No obstante, a excepción del grupo 2, la

apreciación de infiltrado inflamatorio leve en la zona periportal del lobulillo con la dosis más baja de NeuroEPO evidencia un efecto antiinflamatorio.

Por otra parte, en ratas diabéticas se ha reportado incremento de los niveles plasmáticos de alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa después de algunas semanas de utilizar la estreptozotocina,^(13,18) lo que constituye un indicador de daño tisular hepático. En el presente estudio las concentraciones de transaminasas no mostraron diferencias significativas, pero en la mayoría de las ratas diabéticas superaron los valores promedio del grupo de ratas sanas, sin modificaciones con el uso de la NeuroEPO.

Lo anterior significa que la NeuroEPO no protegió contra la ruptura celular en el hígado de las ratas diabéticas, aunque con la dosis menor se apreció mejor organización y morfometría de los hepatocitos, y numerosas células binucleadas, que constituye un signo de proliferación celular.⁽²⁷⁾ Estos resultados, junto con menor dilatación y congestión sinusoidal, e infiltrado inflamatorio, más la ausencia de esteatosis, aluden a beneficios de la NeuroEPO en la protección del hígado de ratas diabéticas.

La dosis más alta de NeuroEPO perjudicó el hígado de las ratas diabéticas: provocó mayor infiltrado inflamatorio, marcada dilatación y congestión sinusoidal, hemorragia focal y alteraciones en la morfometría de los hepatocitos de la zona perivenosa del lobulillo. Además, con mayores proporciones, el peso relativo del hígado superó al resto de los grupos, debido a la pérdida de peso corporal en los animales. Esto se considera un indicador de reacciones adversas.⁽²⁸⁾

La hiperglicemia produce daño tisular mediado por el estrés oxidativo y la inflamación,⁽²⁹⁾ por tanto, su disminución favorecería los efectos hepatoprotectores de la NeuroEPO en ratas diabéticas. Este efecto hipoglicemiante, reportado en otros estudios^(8,9) y comprobado en la presente investigación, pudiera deberse a la recuperación del páncreas, con mayor secreción de insulina, como se ha observado con el uso de la EPO.⁽³⁰⁾ Además, se reducirían los mecanismos lipogénicos estimulados en hiperglicemia, la acumulación de triacilglicerol y el daño tisular.

No determinar la insulinemia después de administrada la NeuroEPO resultó una limitación de la investigación. El descenso de la hiperglicemia, los efectos

antiinflamatorios, antioxidantes, pro-proliferativos y antiapoptóticos de la NeuroEPO en estudios de neuroprotección⁽⁷⁾ pudieran mediar en los beneficios para el hígado de ratas diabéticas. Estos y otros mecanismos deben continuar indagándose.

Se puede concluir que la NeuroEPO, administrada por vía subcutánea a ratas diabéticas a la dosis de 0,25 mg/kg, tiene efectos protectores en el hígado contra los daños inducidos por la diabetes. El doble de esa dosis provoca efectos adversos.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración de la Dr. C. Teresita Rodríguez que proporcionó la NeuroEPO y el vehículo, así como al personal técnico del Departamento de Bioquímica y el Bioterio del ICBP, por la atención y el cuidado de los animales.

Referencias bibliográficas

1. Sun H, Saeedi P, Karuranga S, Pinkepank M, Ogurtsova K, Duncan BB, *et al.* IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 2022;183:109119. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2021.109119>
2. Ministerio de Salud Pública (MINSAP) Dirección de Registros Médicos y Estadísticas de Salud. Anuario Estadístico de Salud 2022. La Habana: MINSAP; 2023 [acceso 29/08/2023]. Disponible en: <https://temas.sld.cu/estadisticassalud/>
3. Memaj P, Jornayvaz FR. Non-alcoholic fatty liver disease in type 1 diabetes: Prevalence and pathophysiology. *Front Endocrinol.* 2022;13. DOI: <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1031633>
4. Tsuma Y, Mori J, Ota T, Kawabe Y, Morimoto H, Fukuhara S, *et al.* Erythropoietin and long-acting erythropoiesis stimulating agent ameliorate non-alcoholic fatty

liver disease by increasing lipolysis and decreasing lipogenesis via EPOR/STAT pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019;509(1):306-13. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.12.131>

5. Said MA, Anwer HM, Mansour SW, Abdallah HA. The potential role of erythropoietin on fatty liver induced by methionine choline deficient diet in adult male rats. *Bull Egypt Soc Physiol Sci.* 2022;42(42):90-100. DOI: <https://dx.doi.org/10.21608/besps.2021.88294.1106>

6. Hong T, Ge Z, Zhang B, Meng R, Zhu D, Bi Y. Erythropoietin suppresses hepatic steatosis and obesity by inhibiting endoplasmic reticulum stress and upregulating fibroblast growth factor 21. *Int J Mol Med.* 2019;44(2):469-78. DOI: <https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4210>

7. Fernández G, Pérez CL, Román OI, Fernández T. Evidencias del potencial neuroprotector de la NeuroEPO en estudios preclínicos y ensayos clínicos; revisión sistemática. *Rev Hab Cienc Méd.* 2023 [acceso 29/08/2023];22(4):5452. Disponible en: <https://revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/5452>

8. Fernández T, Clapés S, Pérez C, Barreto J, Fernández G. Efecto hipoglicemiante de la NeuroEPO en ratas con y sin diabetes mellitus. *Rev Hab Cienc Méd.* 2022 [acceso 23/08/2023];21(1). Disponible en: <https://revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/4617>

9. Fernández T, Clapés S, Pérez C, Núñez N, Suárez G, Fernández G. Efecto protector de la NeuroEPO en la reproducción de ratas diabéticas. *Rev Hab Cienc Méd.* 2022 [acceso 27/08/2023];21(4). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2022000400004

10. Díaz L, Zambrano E, Flores ME, Contreras M, Crispín JC, Alemán G, *et al.* Ethical considerations in animal research: the principle of 3R's. *Rev Invest Clin.* 2021 [acceso 14/05/2024];73(4):199-209. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0034-83762021000400199&script=sci_arttext

11. Ghasemi A, Jeddi S. Streptozotocin as a tool for induction of rat models of diabetes: A practical guide. *EXCLI J.* 2023;22:274. DOI: <https://doi.org/10.17179/excli2022-5720>

12. Underwood W, Anthony R. AVMA guidelines for the euthanasia of animals: 2020 edition. American Veterinary Medical Association; 2020 [acceso 01/04/2024]. Disponible en: https://www.spandidos-publications.com/var/AVMA_euthanasia_guidelines_2020.pdf
13. Ramzani Ghara A, Ezzati Ghadi F, Hosseini SH, Piacente S, Cerulli A, Alizadeh A, *et al.* Antioxidant and antidiabetic effect of capparid seed extract on liver and pancreas of streptozotocin-induced diabetic rats. J Appl Biotechnol Rep. 2021;8(1). DOI: <https://doi.org/10.30491/jabr.2020.222547.1194>
14. Bernal Morera KM, Yepes Henao VM. Manual de procedimientos en el laboratorio de técnica histológica: Procesamiento de Tejidos, Inclusión y Corte [Trabajo de Grado]. Bogota: Fundación Universitaria de Ciencias de la Salud – FUCS; 2021 [acceso 11/09/2023]. Disponible en: <https://repositorio.fucsalud.edu.co/handle/001/1942>
15. Mondal SK. Manual of histological techniques. JP Medical Ltd; 2017.
16. Husna F, Suyatna FD, Arozal W, Purwaningsih EH, Sani Y. Restoration of pro-inflammatory cytokines and histopathological changes in pancreas and liver of hyperglycemic rats by *Murraya koenigii* leaves extract. J Appl Pharm Sci. 2020;10(1):8-15. DOI: <https://dx.doi.org/10.7324/JAPS.2020.101002>
17. Ferreira T, Rasband W. ImageJ, User Guide IJ 1.46r. EE:UU;2012 [acceso 10/2/2024]. Disponible en: <https://imagej.net/ij/docs/guide/>
18. Rodríguez V, Plavnik L, de Talamoni NT. Naringin attenuates liver damage in streptozotocin-induced diabetic rats. Biomedic Pharmacother. 2018;105:95-102. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.120>
19. Guven A, Yavuz O, Cam M, Ercan F, Bukan N, Comunoglu C, *et al.* Effects of melatonin on streptozotocin-induced diabetic liver injury in rats. Acta Histochem. 2006;108(2):85-93. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2006.03.005>
20. Janani C, Sundararajan B, Moola AK, Kumari BDR. Antidiabetic activity of methanolic leaves extract of transformed soybean plantlets in streptozotocin (STZ) induced diabetic rats. J Stress Physiol Biochem. 2021 [acceso 11/05/2024];17(2):66-78. Disponible en: <https://cyberleninka.ru/article/n/antidiabetic-activity-of-methanolic-leaves->

[extract-of-transformed-soybean-plantlets-in-streptozotocin-stz-induced-diabetic-rats](#)

21. Bilal HM, Riaz F, Munir K, Saqib A, Sarwar MR. Histological changes in the liver of diabetic rats: A review of pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease in type 1 diabetes mellitus. *Cogent Med.* 2016;3(1):1275415. DOI: <https://doi.org/10.1080/2331205X.2016.1275415>
22. Schofield JD, Liu Y, Rao-Balakrishna P, Malik RA, Soran H. Diabetes dyslipidemia. *Diabetes Ther.* 2016;7:203-19. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13300-016-0167-x>
23. Lee SH, Park SY, Choi CS. Insulin Resistance: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. *Diabetes Metab J.* 2022;46(1):15-37. DOI: <https://doi.org/10.4093/dmj.2021.0280>
24. Martini T, Naef F, Tchorz JS. Spatiotemporal metabolic liver zonation and consequences on pathophysiology. *Annual Rev Pathol Mechan Dis.* 2023;18(1):439-66. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-031521-024831>
25. Cunningham RP, Porat-Shliom N. Liver zonation—revisiting old questions with new technologies. *Front Physiol.* 2021;12:732929. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.732929>
26. Massalha H, Bahar Halpern K, Abu-Gazala S, Jana T, Massasa EE, Moor AE, et al. A single cell atlas of the human liver tumor microenvironment. *Mol Syst Biol.* 2021;16(12):e9682. DOI: <https://doi.org/10.15252/msb.20209682>
27. Huang W, Han N, Du L, Wang M, Chen L, Tang H. A narrative review of liver regeneration—from models to molecular basis. *Ann Transl Med.* 2021;9(22). DOI: <https://doi.org/10.21037/atm-21-5234>
28. Baig MW, Majid M, Nasir B, Hassan SS ul, Bungau S, Haq I ul. Toxicity evaluation induced by single and 28-days repeated exposure of withametelin and daturaolone in Sprague Dawley rats. *Front Pharmacol.* 2022;13:999078. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.999078>

29. Bae CS, Lee Y, Ahn T. Therapeutic treatments for diabetes mellitus-induced liver injury by regulating oxidative stress and inflammation. Appl Microsc. 2023;53(1):4. DOI: <https://doi.org/10.1186/s42649-023-00089-2>
30. Kuo SC, Li Y, Cheng KC, Niu CS, Cheng JT, Niu HS. Investigation of the pronounced erythropoietin-induced reduction in hyperglycemia in type 1-like diabetic rats. Endocr J. 2018;65(2):181-91. DOI: <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ17-0353>

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribución de los autores

Conceptualización: Tammy Fernández Romero.

Curación de contenidos y datos: Tammy Fernández Romero, Ketty Suárez Borrás, Mónica Elena Fernández Jiménez, Alicia Borroto Leiseca, Giselle Fernández Peña, Víctor Manuel Rodríguez Sosa, Melvis Taylín Zumeta Dubé, Mairén Sotomayor Gonzalez y Carlos Luis Pérez Hernández.

Análisis formal: Tammy Fernández Romero, Ketty Suárez Borrás, Mónica Elena Fernández Jiménez, Alicia Borroto Leiseca, Giselle Fernández Peña, Víctor Manuel Rodríguez Sosa, Melvis Taylín Zumeta Dubé, Mairén Sotomayor Gonzalez y Carlos Luis Pérez Hernández.

Adquisición de fondos: Tammy Fernández Romero.

Investigación: Tammy Fernández Romero, Ketty Suárez Borrás y Melvis Taylín Zumeta Dubé.

Metodología: Tammy Fernández Romero, Ketty Suárez Borrás y Melvis Taylín Zumeta Dubé.

Administración del proyecto: Tammy Fernández Romero.

Redacción-del borrador original: Tammy Fernández Romero, Ketty Suárez Borrás, Mónica Elena Fernández Jiménez, Alicia Borroto Leiseca, Giselle Fernández Peña, Víctor Manuel Rodríguez Sosa, Melvis Taylín Zumeta Dubé, Mairén Sotomayor Gonzalez y Carlos Luis Pérez Hernández.

Redacción-revisión y edición: Tammy Fernández Romero, Ketty Suárez Borrás, Mónica Elena Fernández Jiménez, Alicia Borroto Leiseca, Giselle Fernández Peña, Víctor Manuel Rodríguez Sosa, Melvis Taylín Zumeta Dubé, Mairén Sotomayor Gonzalez y Carlos Luis Pérez Hernández.