



# Trabajo de fin de grado

## PAPEL DE LA METFORMINA EN LA RESISTENCIA A LA INSULINA ASOCIADA A LA INFLAMACIÓN EN ESTADOS DE OBESIDAD

Pérez Marín P.

Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid

### Introducción:

- La obesidad es una patología que está incrementando exponencialmente en los países industrializados, y a su creciente prevalencia le acompaña el desarrollo de otras enfermedades concomitantes tales como la Diabetes Mellitus o las Enfermedades Cardiovasculares.
- Estudios recientes han demostrado que en los pacientes obesos se produce también un proceso inflamatorio de bajo grado que si se prolonga puede provocar una resistencia a insulina que a la larga puede desencadenar Diabetes Mellitus de tipo 2.
- Debido a las características de esta relación y a la gravedad de sus consecuencias, se estudiaron diferentes fármacos antidiabéticos para verificar sus mecanismos de acción y evaluar la presencia de un posible efecto antiinflamatorio por parte de los mismos. Entre los fármacos antidiabéticos, la metformina es uno de los más prescritos vía oral.
- Este trabajo se ha centrado en la revisión de dos estudios que han analizado el papel de la metformina en el proceso inflamatorio y en las propiedades antiinflamatorias de la misma.

### Objetivos:

- Examinar el efecto de la metformina sobre diferentes moléculas que intervienen en el desarrollo del proceso inflamatorio en macrófagos.
- Conocer el mecanismo por el cual la metformina ejerce su efecto antiinflamatorio en estas células.

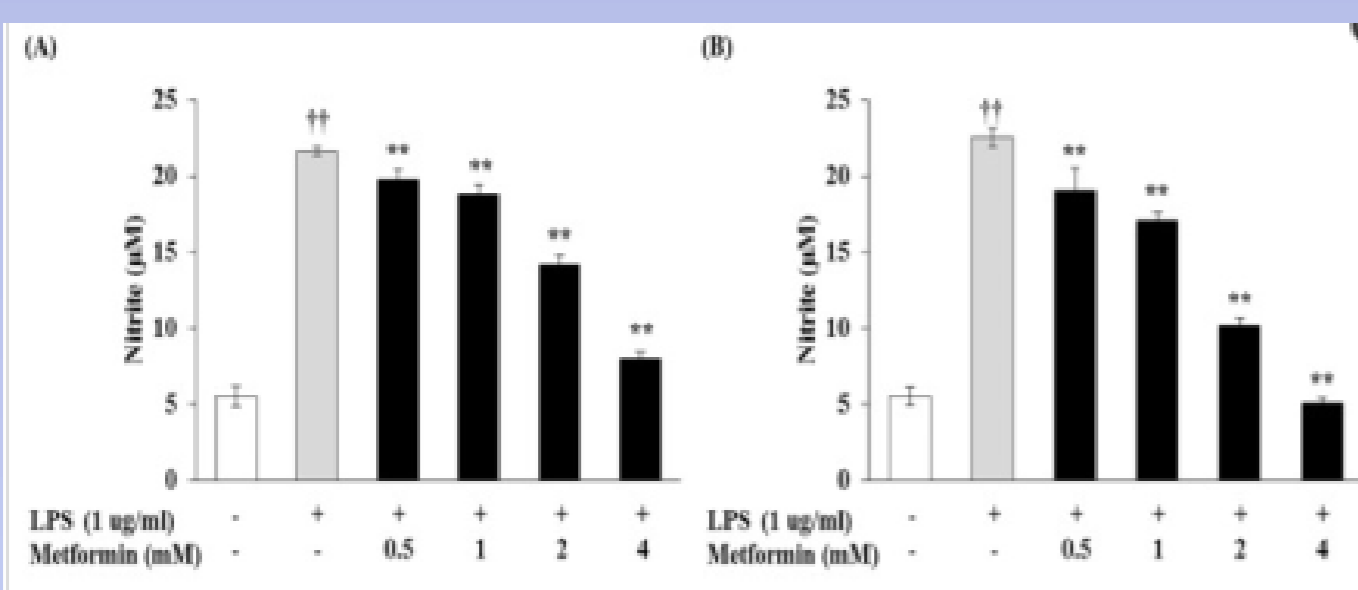
### Material y métodos:

- Revisión bibliográfica descriptiva en Medline, PubMed, Bucea, Scielo y editorial Médica Panamericana.
- Resultados: Revisión bibliográfica de dos estudios (1,2)
- *In vitro*: Se trabaja con una línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 y con macrófagos peritoneales de ratón.
- *In vivo*: Se trabaja con dos condiciones experimentales murinas diferentes (RD y HFD).

### Resultados:

#### IN VITRO

##### 1. Efectos de la metformina en la producción de NO

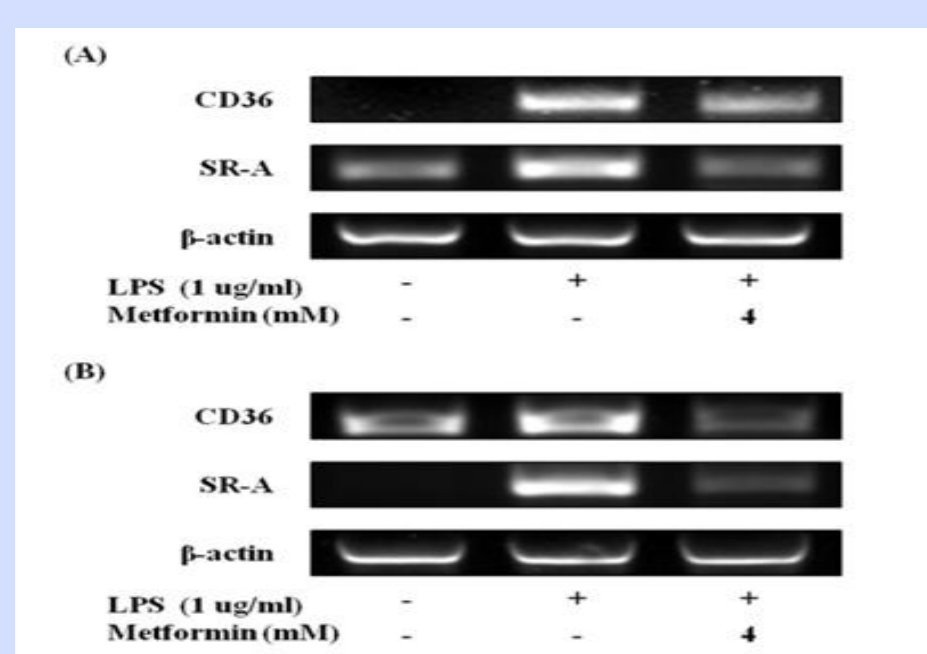


**Figura 1:** El NO (óxido nítrico) es una molécula que se libera en el proceso inflamatorio.

Se observa que hay un grupo control tanto en las células RAW 264.7(A) como en los macrófagos (B), que no liberan NO (barra blanca). A continuación se somete a estas células a tratamiento con LPS cuya finalidad es desencadenar el proceso inflamatorio y se analiza la secreción de NO (barra gris). En otras placas de cultivo se añade LPS con concentraciones crecientes de metformina (barras negras).

Se puede determinar que la metformina ejerce un efecto supresor sobre la producción de NO, ya que vemos que a mayor concentración de fármaco, disminuye la producción de NO.

##### 4. Efectos de la metformina en la expresión de los receptores scavenger

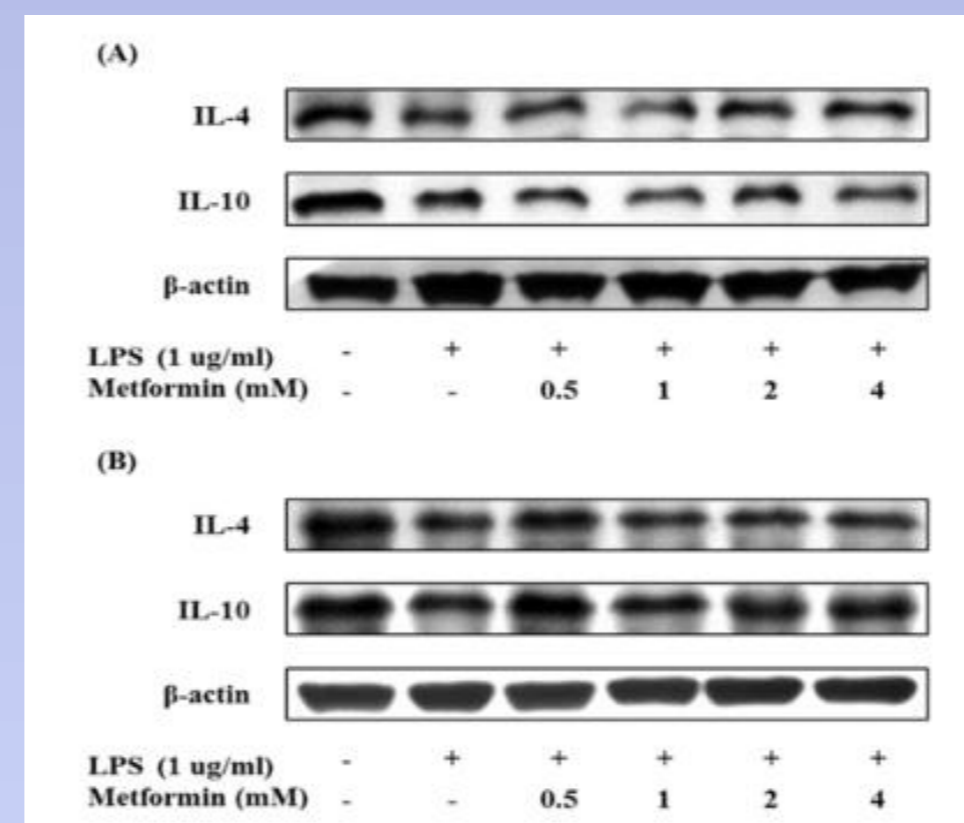


**Figura 4:** Los receptores scavenger se encuentran en los macrófagos y son esenciales a la hora de determinar la polarización de los mismos a M1 (proinflamatorio) o M2 (antiinflamatorio).

Se observa que en las células RAW 264.7 (A) se produce un aumento notable de la expresión de CD36 y SR-A (receptores proinflamatorios) tras la exposición al LPS. Asimismo, hay un descenso considerable de dicha expresión tras la administración del fármaco. En el caso de los macrófagos peritoneales (B), se observa una supresión de dichos receptores.

La metformina disminuye la expresión de estos receptores, provocando una disminución del fenotipo M1 proinflamatorio.

##### 2. Efectos de la metformina en la expresión de citoquinas antiinflamatorias

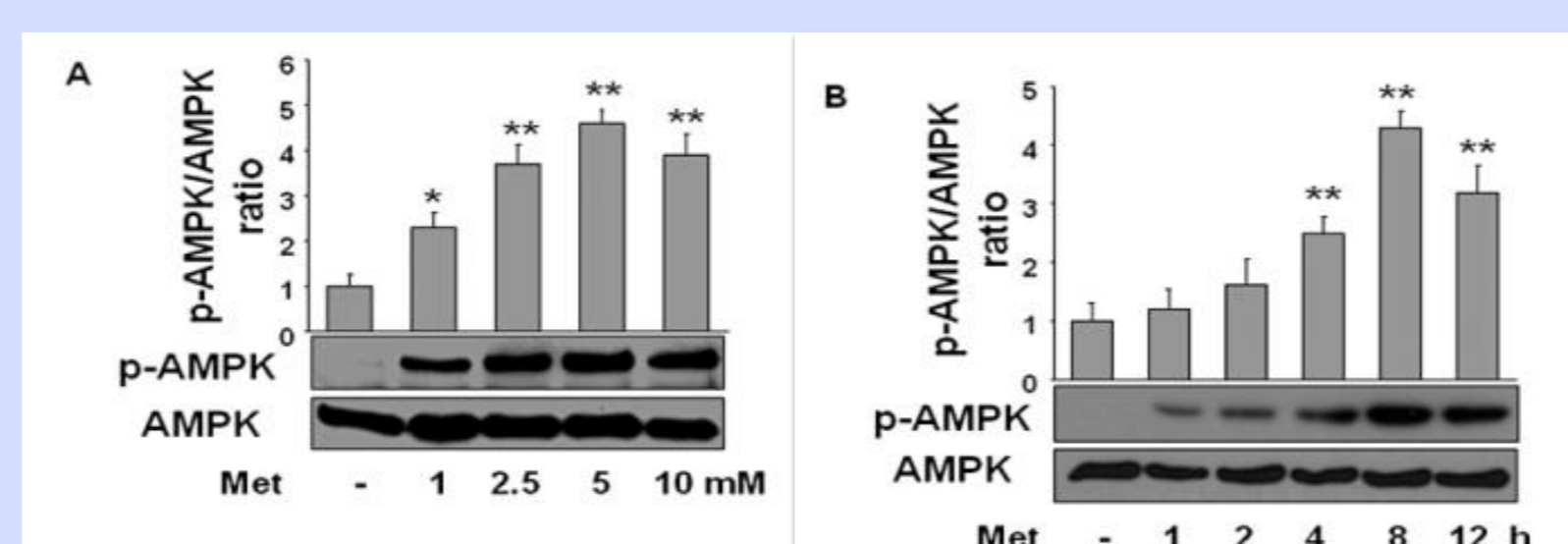


**Figura 2:** La primera gráfica (A) corresponde a la línea celular RAW 264.7 y en ella podemos observar que ambas citoquinas (IL-4 e IL-10) mantienen en cierta manera su expresión, conforme aumenta la dosis de metformina.

La gráfica B corresponde a los macrófagos peritoneales y en este caso sí se puede percibir que se aumenta considerablemente la expresión de las citoquinas al aumentar la concentración de fármaco.

La metformina aumenta, por tanto, la expresión de citoquinas antiinflamatorias.

##### 5) El efecto antiinflamatorio de la metformina está mediado a través de la activación de AMPK



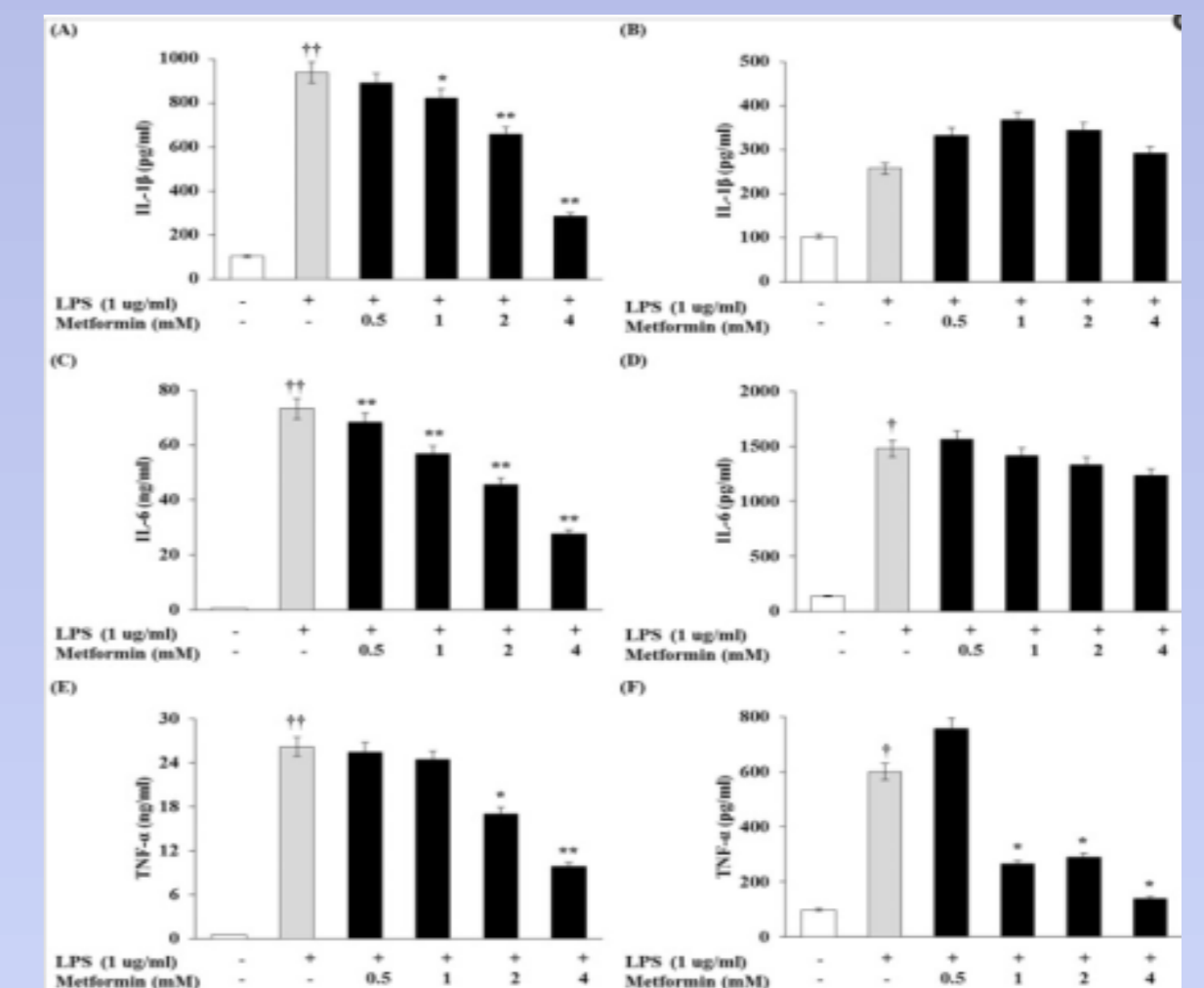
**Figura 5:** La principal diana de la metformina es la AMPK (proteína quinasa activada por AMP).

Los macrófagos (A) fueron tratados con concentraciones crecientes de metformina (1, 2.5, 5, 10mM) durante 8 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se analizaron la AMPK y la AMPK fosforilada.

En la segunda gráfica (B) las células RAW 264.7 fueron tratadas con 5mM de metformina durante 12 horas.

Se observa que existe una intensificación de la producción de p-AMPK en relación al tiempo de exposición a la metformina. Además existe también un aumento del cociente p-AMPK/AMPK a medida que la concentración de fármaco aumenta, por tanto podemos determinar que el mecanismo de acción antiinflamatorio de la metformina, es mediante la fosforilación de esta enzima.

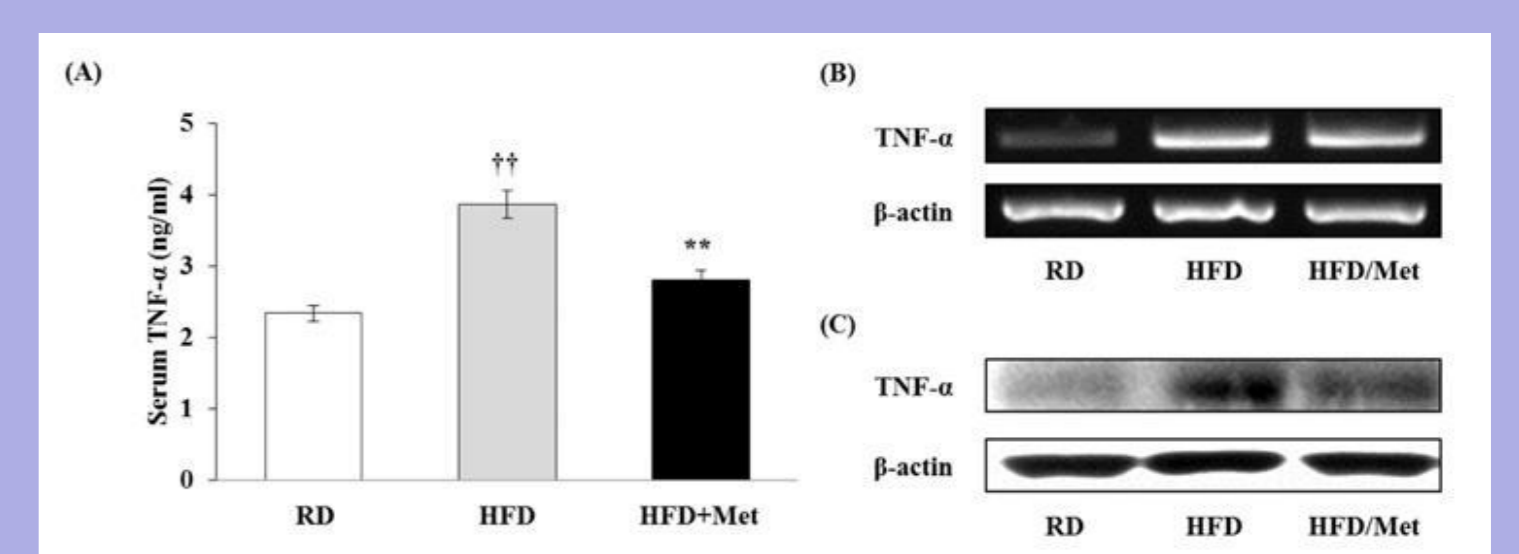
##### 3. Papel de la metformina en la producción de citoquinas proinflamatorias



**Figura 3:** En la primera imagen, las gráficas A, C y E corresponden al ensayo realizado en la línea celular Raw 264.7 y las gráficas B, D y F al ensayo realizado en macrófagos peritoneales. Se puede apreciar que el efecto de la metformina es más relevante en las células cultivadas Raw, excepto en el caso del TNF-α en cuyo caso el descenso de esta molécula es más brusco en los macrófagos peritoneales.

#### IN VIVO

##### 6) Reducción de la secreción de TNF-α



**Figura 6:** En el gráfico A, la primera columna corresponde a los ratones que fueron alimentados con dieta estándar (RD). La segunda a aquellos que recibieron una dieta rica en grasa (HFD) y la tercera a aquellos que recibiendo una dieta rica en grasa, fueron tratados con metformina (HFD + Met)

Se aprecia en el gráfico A que en el grupo de ratones tratados con metformina se redujo la producción de TNF-α.

Asimismo en los gráficos B y C (Western Blot) se observa también un descenso de la producción del mRNA de TNF-α en los tratados con el fármaco.

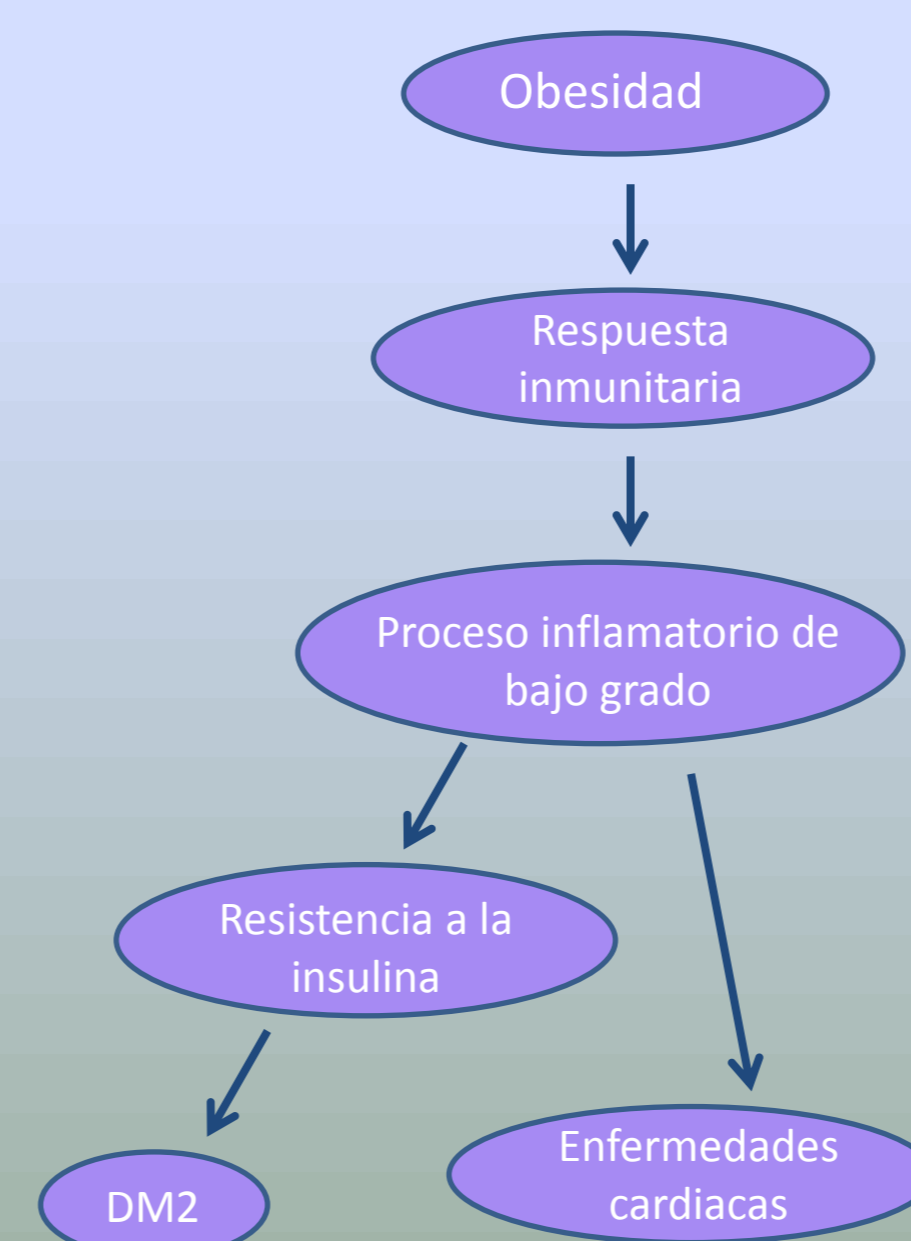
De acuerdo a estos resultados se puede afirmar que la metformina atenúa la producción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos, especialmente del TNF-α y además reduce significativamente e incluso disminuye la regulación de los niveles de mRNA y proteínas de TNF-α.

### Discusión :

Gracias a la revisión de ambos estudios se ha visto que la metformina tiene un papel activo frente al desarrollo del proceso inflamatorio actuando a diferentes niveles del mismo.

- Disminuye la producción de óxido nítrico (NO).
- Aumenta la expresión de citoquinas antiinflamatorias como IL-4 e IL-10.
- Reduce la producción de citoquinas proinflamatorias tales como IL-1β, IL-6 y TNF-α.
- Reduce la expresión de los receptores scavenger CD-36 y SR-A que inducen el cambio de polarización de los macrófagos a M1 (estado proinflamatorio)
- Aumenta la fosforilación del AMPK, evitando la traslocación de la subunidad p65 al núcleo e impidiendo por tanto transcripción de las proteínas inflamatorias
- Suprime de forma significativa la producción de TNF-α y atenúa la expresión de genes y de proteínas de TNF-α en macrófagos y ratones obesos.

En vista de estas características, la metformina se convierte en una **alternativa terapéutica interesante** para tratar la resistencia a la insulina derivada de la inflamación asociada a la diabetes.



### Conclusión:

La metformina interviene de forma directa en el proceso inflamatorio mediante la fosforilación de la enzima AMPK y también a otros niveles de este proceso mediante la disminución de la expresión o producción de moléculas proinflamatorias.

### Bibliografía:

1. Bobae Hyun, et al. *Metformin Down-regulates TNF-α Secretion via Suppression of Scavenger Receptors. INMUNE NETWORK Vol. 13, No. 4: 123-132, August, 2013*
2. K. Tsuji et al. *Metformin inhibits HMGB1 release in LPS-treated RAW 264.7 cells and increases survival rate of endotoxaemic mice. British Journal of Pharmacology (2011) 162 1498-1508*
3. Maximilian Zeyda, Thomas M. Stulnig. *Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance- A Mini- Review. Gerontology.*
4. S. Galic et al. *Adipose tissue as an endocrine organ. Molecular and Cellular Endocrinology 316(2010) 129-139 (Review)*
5. Steven E. Shoelson, Jongsoo Lee Allison B. Goldfine. *Inflammation and insulin resistance. The Journal of Clinical Investigation, 2006, Volume 116: 1793-1801 (Review) http://www.jci.org*