



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**Papel de la metformina en la resistencia a la  
insulina asociada a la inflamación en estados de  
obesidad**

Autor: Paula Pérez Marín

D.N.I.: 71310301

Tutor: Ángela Martínez Valverde

Convocatoria: Junio 2016

# Índice

1. Resumen /Abstract.....	1
2. Introducción y antecedentes	
- La obesidad: causas y consecuencias.....	2
- Etiopatología de la inflamación asociada a la obesidad .....	2-4
- Resistencia a la insulina como consecuencia de la inflamación crónica de bajo grado asociada a la obesidad.....	4-5
- Efectos patológicos de la Resistencia a la Insulina producida por la inflamación crónica de bajo grado asociada a la obesidad.....	5
- La metformina: posible uso terapéutico en estados de inflamación .....	6
3. Objetivos.....	6-7
4. Materiales y Métodos.....	7
5. Resultados.....	8-14
ENSAYOS EN MODELOS CELULARES .....	8-13
- <i>Efectos de la metformina sobre la producción de NO.....</i>	8-9
- <i>Papel de la metformina en la producción de citoquinas proinflamatorias.....</i>	9-10
- <i>Efectos de la metformina en la expresión de citoquinas antiinflamatorias.....</i>	10
- <i>Expresión de mRNA y proteínas de los mediadores inflamatorios modulados por la meformina.....</i>	10-11
- <i>Supresión de la activación de la vía NF-<math>\kappa</math>B por la metformina.....</i>	11-12
- <i>Efectos de la metformina en la expresión de los receptores scavenger.....</i>	12- 13
- <i>El efecto antiinflamatorio de la metformina está mediado a través de la activación de AMPK.....</i>	13
ENSAYOS EN TEJIDOS ANIMALES .....	14
6. Discusión.....	15-17
7. Conclusión.....	17
8. Revisiones bibliográficas.....	17-18

## **1. RESUMEN**

La obesidad es una patología que está incrementando de forma exponencial especialmente en los países occidentales y su creciente prevalencia va acompañada del desarrollo de otras enfermedades concomitantes tales como la Diabetes Mellitus o las enfermedades cardiovasculares, cuya gravedad es también considerable.

En los últimos años se ha demostrado que la obesidad induce un estado de inflamación crónica de bajo grado asociado al incremento del tejido adiposo y, como consecuencia, se produce una resistencia a la insulina que es desencadenante de Diabetes. La complejidad de esta asociación produce una serie de consecuencias que por sus características disminuyen el estado de salud y la calidad de vida del paciente, ya que aumentan la morbilidad y la mortalidad.

Diversos trabajos apuntan a que ciertos fármacos antidiabéticos, presentan también un efecto beneficioso sobre procesos inflamatorios, ejerciendo su acción por tanto a dos niveles y mejorando el desarrollo ambas patologías. La metformina, uno de los antidiabéticos orales más prescritos para el tratamiento de la Diabetes Mellitus de tipo 2, ha sido uno de los fármacos que presentan estos efectos duales.

Este trabajo se centra 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.

**Palabras clave:** Metformina, Inflamación, Macrófagos, Citoquinas, Obesidad, Resistencia a la Insulina

## **ABSTRACT**

Obesity is a pathology which is increasing exponentially, especially in western countries and its increasing prevalence is associated with the development of other concomitant diseases such as diabetes mellitus or cardiovascular diseases, whose severity is important as well.

In the last few years, researches have shown obesity induces a chronic low-grade inflammation condition associated with the increase of adipose tissue, due to this fact, insulin resistance might be developed and diabetes appears as a result. The severity of this association produces different consequences which diminish the health and quality of patient's life because of its natural characteristics, increasing morbidity and mortality probabilities.

Several researches suggest that certain antidiabetic agents have also positive effects on inflammatory processes. Impacting not only in one level, but improving the development of both pathologies. Metformin is one of the most prescribed oral drugs in order to treat Diabetes Mellitus Type 2, being one of the drugs with these dual effects.

This project focuses on the review of two researches which have examined the role of metformin in the inflammatory process and its anti-inflammatory skills.

**Key Words:** Metformin, Inflammation, Macrophages, Cytokines, Obesity, Insulin resistance.

## **2. INTRODUCCIÓN**

### **La obesidad: causas y consecuencias**

La obesidad es un estado patológico que se caracteriza por la acumulación excesiva y general de grasa por todo el cuerpo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), “la obesidad es el estado patológico que se alcanza cuando se tiene un IMC (Índice de Masa Corporal) superior a 30”<sup>1</sup>.

En España, 17 de cada 100 adultos padecen obesidad y 37 presentan sobrepeso. En los últimos 33 años el número de personas con sobrepeso y obesidad a nivel mundial, aumentó de 857 millones a 2100 millones y su prevalencia unida a la reducción de la esperanza de vida está cada vez más clara.<sup>1</sup>

Las causas exactas que producen la obesidad son aún desconocidas, pero sus **consecuencias** son graves ya que es un factor de riesgo para desarrollar una resistencia a la insulina que acabe resultando en Diabetes Mellitus 2 y otras enfermedades características del Síndrome Metabólico como la hipertensión o las dislipemias.<sup>2,3</sup>

### **Etiopatología de la inflamación crónica de bajo grado asociada a la obesidad**

Además, recientemente se ha observado que los pacientes obesos tienen una mayor predisposición a desarrollar un proceso inflamatorio de bajo grado.

Las causas de ello son variadas, pero destaca por su importancia, la **sobrenutrición** del paciente obeso. Esto origina un estrés en el retículo endoplásmico (RE) del hígado y del tejido adiposo, debido a un exceso lipídico y a una perturbación en el metabolismo energético.<sup>2</sup>

Este **estrés a nivel del RE** produce una cascada de reacciones celulares inflamatorias que van a finalizar en la activación de dos vías proinflamatorias importantes que son la JNK y la IKK/ NF-kB o en la apoptosis celular.<sup>2,4</sup>

La segunda causa es que dicha sobrenutrición produce la hipertrofia del adipocito y la muerte celular del mismo. Estos adipocitos se rodean de Macrófagos del Tejido Adiposo (ATMs) produciendo una serie de estructuras propias del paciente obeso llamadas “Estructuras de tipo corona” que van a encargarse de la limpieza de los restos celulares.<sup>3,5</sup>

Las alteraciones metabólicas unidas al estrés del RE, provocan la **producción de citoquinas y quimioquinas** por las células adiposas, como interleucina 6 (IL-6), proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1), interleucina 1β (IL-1β) y factor de necrosis tumoral α (TNFα), que tienen carácter proinflamatorio.<sup>2,3,4</sup>

Concretamente la MCP-1 es crucial para el desarrollo del proceso inflamatorio ya que tiene un rol importante en la **atracción de monocitos** al tejido adiposo que a su vez van a evolucionar a macrófagos y van a producir citoquinas proinflamatorias.<sup>3,4</sup>

Los macrófagos, una vez dentro del tejido adiposo tienen que activarse y transformarse en el fenotipo M1 que tiene un rol proinflamatorio, o el M2 con características antiinflamatorias. Este cambio fenotípico se produce gracias a la expresión de los **receptores scavenger** que se encuentran en los macrófagos.

Existen algunos de estos receptores como SR-A1 y CD163 cuya expresión se ve aumentada en los macrófagos M2 que van a poseer actividad antiinflamatoria. Por el contrario, la expresión de CD36 se ve potenciada en los macrófagos M1 y contribuye en la producción de citoquinas inflamatorias.

La mayor o menor expresión de estos receptores scavenger en los macrófagos contribuye no sólo en el desarrollo del proceso inflamatorio, sino también en la inducción de otras patologías como la aterosclerosis.<sup>5,6</sup>

Además de los receptores scavenger, se ha visto que tanto la dieta, como la obesidad y la edad influyen en el **cambio de modulación fenotípica**, produciendo una mayor tendencia de cambio de M2 a M1 y por tanto a que el grado de inflamación sea superior.<sup>2,6</sup>

El incremento del tejido adiposo permite el **reclutamiento de células inmunes** al mismo, por tanto el proceso inflamatorio va a ser iniciado por la acumulación de lípidos en

los adipocitos y los macrófagos se van a encargar de **amplificar la señal inflamatoria** mediante la producción de citoquinas y quimioquinas.<sup>2,4,7</sup>

Esto es de gran importancia debido a que esta inflamación asociada a la obesidad va a inducir una resistencia a la insulina que es un factor clave en la etiología de muchas enfermedades, de entre las que destaca la diabetes Mellitus de tipo 2.<sup>7</sup>

### **Resistencia a la insulina como consecuencia de la inflamación crónica de bajo grado asociada a la obesidad**

La insulina es la responsable de la regulación de la homeostasis glucídica del organismo. La resistencia a la insulina se caracteriza por una disminución de la sensibilidad a la insulina en sus principales órganos dianas. Esto cursa fundamentalmente con una disminución de la captación de glucosa por parte del músculo esquelético, una reducción de la producción de glucosa hepática en el hígado, y un aumento de la lipólisis en el tejido adiposo.

La regulación negativa de la señalización de la insulina involucra entre otros, a componentes de dos de las principales vías proinflamatorias: la IKK y JNK, siendo estas vías quienes establecen un vínculo potencial entre la inflamación y la resistencia a la insulina.

La disminución de la sensibilidad a la insulina en el paciente obeso se da por varios factores, pero es de gran importancia la existencia de un **exceso de nutrientes** prolongado en el tiempo<sup>8</sup> y éste se manifiesta de forma compleja mediante mecanismos que involucran el flujo de ácidos grasos del tejido adiposo a otros órganos, la secreción de citoquinas y quimioquinas, la inflamación de los tejidos y la predisposición genética. Es por esto que no podemos atribuir este desorden a una sola causa.<sup>2,7</sup>

En la persona obesa hay con frecuencia un **balance energético positivo** debido a una nutrición hipercalórica que induce una resistencia a la insulina fundamentalmente en músculo e hígado. La pérdida de calorías produce, por tanto, un aumento de la sensibilidad a la insulina.

En segundo lugar, existe también una **concentración lipídica mayor** y por tanto aumenta la rotura y absorción de ácidos grasos. Esto aumenta a su vez su concentración en la circulación, lo que produce un aumento de la resistencia a la insulina.

Asimismo, fruto del metabolismo oxidativo de dichos ácidos grasos se producen **productos intermedios** que se acumulan en el hígado y en el músculo contribuyendo a este

desorden. Esto produce además una **saturación mitocondrial** a nivel celular en el proceso de la  $\beta$ -oxidación y un estrés a nivel de RE que se ha visto que afecta directamente a la señalización de la insulina, contribuyendo a la resistencia a la misma.<sup>7</sup>

En última instancia se ha comprobado que un aumento del flujo de ácidos grasos en el paciente aumenta también el **cambio de polarización de los macrófagos** pasando de M2 a M1 y por tanto contribuyendo a la situación inflamatoria y a la resistencia a la insulina.

### **Efectos patológicos de la resistencia a la insulina producida por la inflamación crónica de bajo grado asociada a la obesidad**

Estos tres factores que poseen ciertos pacientes pueden desencadenar una Diabetes Mellitus de Tipo 2 y en muchos casos **complicaciones** de la misma que aumentan la mortalidad de los pacientes. Las de mayor importancia son las enfermedades cardiovasculares, ya que representan la mayor causa de mortalidad en los pacientes con Diabetes.<sup>8,9</sup>

Asimismo es frecuente la nefropatía diabética y los daños oculares (retinopatías) que pueden cursar con una disminución de la visión e incluso con ceguera.

Finalmente puede haber daño en el Sistema Nervioso, lo que se conoce como neuropatía y que cursa con hormigueo, dolor y pérdida de sensibilidad. Esto último es importante porque a causa de ello pueden pasar desapercibidas lesiones o infecciones de importancia.<sup>8,9,10</sup>

Además la unión del proceso inflamatorio con la resistencia a la insulina cursa con una **disminución de la cicatrización de las heridas** y por tanto una cronicidad de dicho proceso.

Estas heridas sin cicatrizar son un verdadero problema en un estado proinflamatorio persistente, caracterizado por la acumulación de macrófagos proinflamatorios, citoquinas y proteasas y la disminución de factores de crecimiento; lo que conlleva un estancamiento en la curación de las heridas y el aumento del estado inflamatorio del paciente que expresa altos niveles de algunas citoquinas inflamatorias tales como: TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  o IL-6.<sup>10</sup>

Si este estado inflamatorio no se resuelve es posible que pueda llegarse incluso a la **amputación** de alguno de los miembros donde se encuentra la herida no cicatrizante.

La prevalencia de este problema ha ido aumentando con los años y la no cicatrización de heridas unidas al aumento de las enfermedades concomitantes en el paciente ha supuesto un grave aumento de la morbilidad y de la mortalidad en el paciente diabético.<sup>10</sup>

### **La metformina: posible uso terapéutico en estados de inflamación**

En los últimos años se ha visto que hay ciertos medicamentos administrados a los diabéticos que ayudan no solo a reestablecer la glucemia en el paciente, sino que además tienen un **factor antiinflamatorio** que contribuye a la disminución de la inflamación y por tanto aumentan el índice de supervivencia en estos pacientes.

Se sabe que algunos de estos fármacos contribuyen a la disminución del fenotipo proinflamatorio de los macrófagos y mediante una serie de mecanismos celulares y moleculares aceleran también la cicatrización de las heridas.<sup>10</sup>

El medicamento principal con estas características es la **metformina**, una biguanida que se prescribe para el tratamiento de inicio de la diabetes de tipo 2 y que ejerce su acción mediante la supresión de la gluconeogénesis hepática y también favoreciendo la captación de glucosa por el músculo.<sup>11</sup>

Este fármaco actúa activando la enzima AMPK (AMP quinasa) que es una serina/threonina quinasa que está involucrada en la regulación de los mecanismos celulares y en la homeostasis energética.<sup>12</sup> Además, se ha visto que la AMPK juega un rol importante en la inflamación, ya que su activación en músculo e hígado limita el depósito de grasas ejerciendo de esta forma acción sobre la obesidad. Además de esta forma la AMPK puede mantener activa la respuesta a la insulina en hígado y músculo contribuyendo a aumentar la sensibilidad a la insulina.<sup>13,14</sup>

En este trabajo vamos a analizar el papel de la metformina como antiinflamatorio en macrófagos basándonos en 2 estudios diferentes:

- Bobae Hyun, et al. Metformin Down-regulates TNF- $\alpha$  Secretion via Suppression of Scavenger Receptors. INMUNE NETWORK Vol.13, No. 4: 123-132, August, 2013<sup>15</sup>
- K. Tsoyi 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<sup>16</sup>

### **3. OBJETIVOS**

Nuestros objetivos en este estudio son principalmente dos.

- 1) Conocer si existe un efecto antiinflamatorio de la metformina.
- 2) Saber si la metformina tiene un papel activo y directo en el proceso inflamatorio.

Para ello, vamos a trabajar en vivo y en vitro, valorando varios parámetros relacionados con la inflamación utilizando una línea celular llamada Raw 264.7 y macrófagos peritoneales en unos casos y en otros macrófagos obtenidos del tejido adiposo de ratones obesos en otros.

#### **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

Se realizó una **revisión bibliográfica descriptiva** de diferentes artículos referentes a la obesidad, la inflamación y la resistencia a la insulina y estudios sobre sus asociaciones. Se recurrió para ello a una búsqueda en las bases de datos Medline, PubMed, Bucea, Scielo y la editorial Médica Panamericana. Asimismo, se consultaron diferentes páginas web como la web de la Agencia Española del Medicamento y Productos sanitarios, la de la OMS, la web de la American Diabetes Association y la de la American Diabetes Federation.

En cuanto a los materiales y métodos en los que se basa la parte de **resultados**, forman parte de una revisión bibliográfica de los dos estudios citados anteriormente.

Como ya se ha comentado, se realizaron dos tipos de estudio, in vitro e in vivo. En el primero se determinó el papel de la metformina en la producción de NO (óxido nítrico) y de citoquinas proinflamatorias, en la expresión de mRNA y de proteínas inflamatorias, en la expresión de citoquinas anti-inflamatorias, en la vía NF- $\kappa$ B, en la expresión de receptores scavenger y en la activación de la AMPK.

Para su determinación se utilizaron diferentes **técnicas** tales como ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), Western Blot, ensayo de NO, la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction)

En el caso del estudio in vivo, se dilucidó además el papel de la metformina en la secreción de TNF- $\alpha$ . Para llevarlo a cabo, se utilizaron ratones a los que se les inyectó tioglicolato vía intraperitoneal. Al cabo de 4 días se sacrificaron y se extrajeron los macrófagos de la cavidad abdominal.

En ambos ensayos se sometió a las células a una exposición de LPS, un lipopolisacárido de la pared bacteriana que activa a los macrófagos produciendo el comienzo del proceso inflamatorio. Acto seguido se expuso dichas líneas celulares a la metformina con el fin de evaluar el efecto de la misma sobre el proceso inflamatorio y determinar asimismo esta propiedad además del efecto antiglicémico característico.

## 5. RESULTADOS

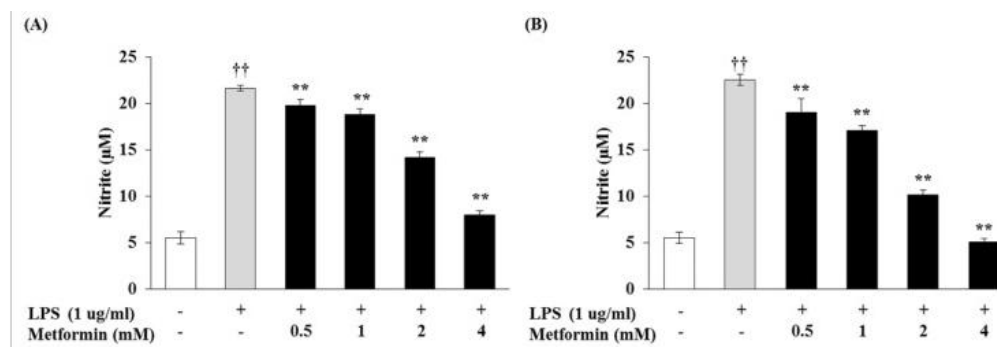
Para realizar el análisis de los resultados hemos dividido el ensayo in vitro del ensayo in vivo.

### 1) ENSAYOS EN MODELOS CELULARES

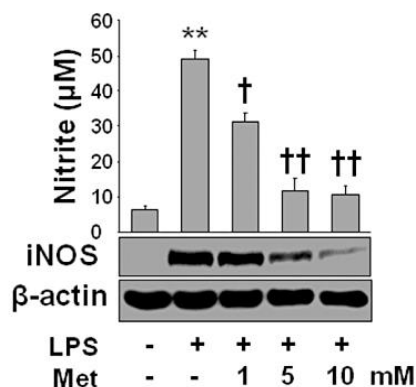
Dicho ensayo se realizaba sobre una línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 y en macrófagos peritoneales de ratón obteniéndose los siguientes resultados.

#### 1) Efectos de la metformina en la producción de NO<sup>15,16</sup>

Se examinó en el efecto de la metformina en la producción de NO por parte de los macrófagos inducidos con LPS mediante el ensayo de NO.



**Figura 1:** 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 y concentraciones crecientes de metformina (barras negras).



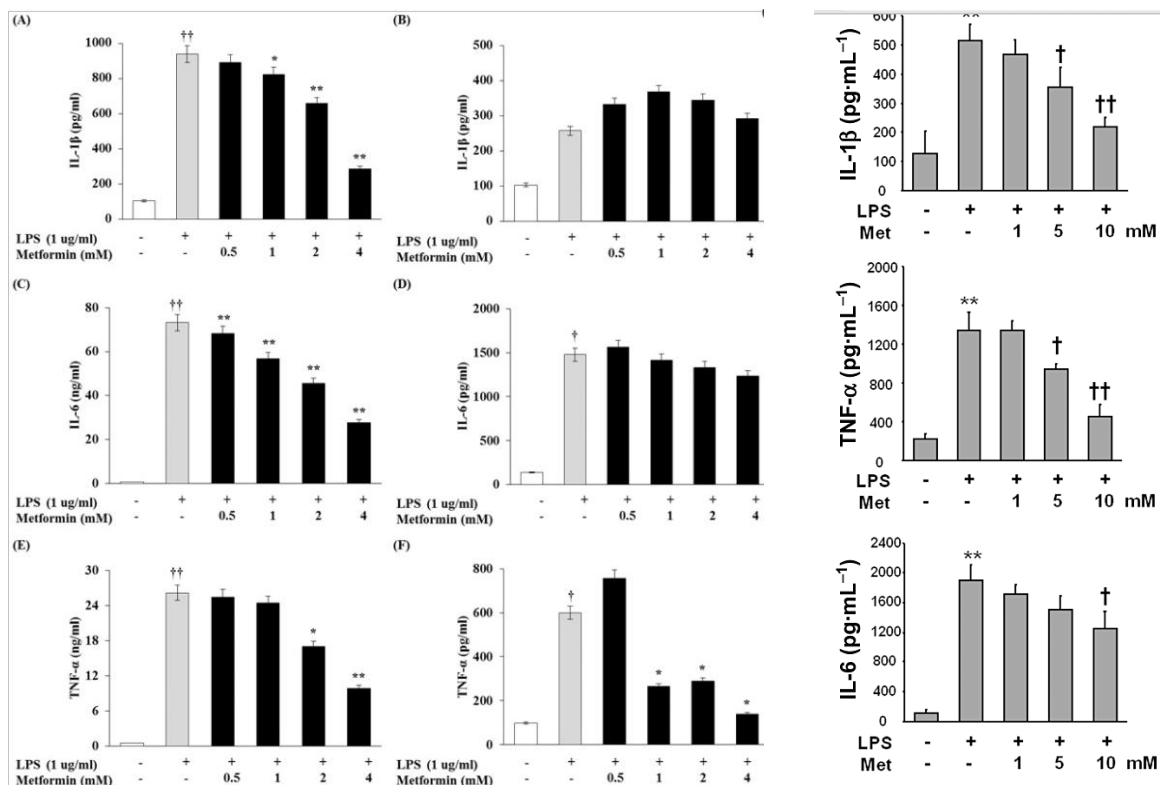
**Figura 2:** En este estudio se somete a las células al mismo proceso anterior y además se comprueba la expresión génica (iNOS) mediante un ensayo Western Blot en relación a la exposición a LPS y a las concentraciones de metformina. En cuanto a la β-actina se utiliza en los ensayos de Western Blot como control de carga.

Según los dos estudios, la presencia de metformina atenúa de manera dosis-dependiente la producción de NO y disminuye también su expresión génica como se puede

observar en la figura 2 (iNOS). iNOS es un gen inducible de características proinflamatorias que se ve significativamente atenuado por la presencia creciente de metformina.

## 2) Papel de la metformina en la producción de citoquinas proinflamatorias <sup>15, 16</sup>

Para determinar si la metformina tiene un efecto sobre la producción de citoquinas proinflamatorias, se cuantificaron los niveles de algunas de ellas (IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ) mediante el ensayo de ELISA.



**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- $\alpha$  en cuyo caso el descenso de la producción de esta molécula es más brusco en los macrófagos peritoneales.

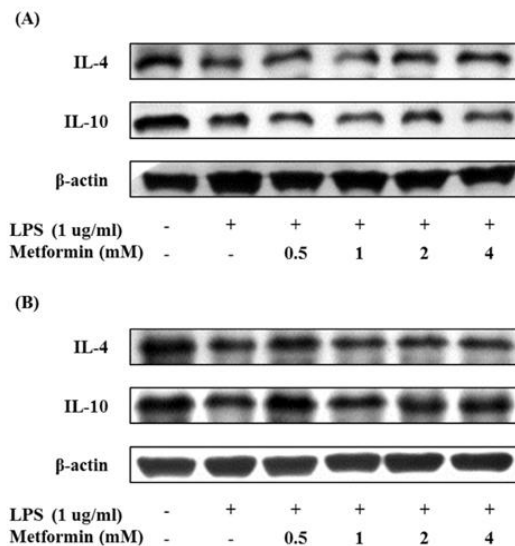
**Figura 4:** En la segunda imagen podemos confirmar que tras la administración del fármaco, se disminuye considerablemente la producción de citoquinas.

En ambos estudios se puede observar que la producción de citoquinas inflamatorias aumenta en relación al LPS (control positivo), por lo que se confirma que se produce un inicio del proceso inflamatorio causado por este lipopolisacárido.

En la segunda línea en abscisas, se representan las concentraciones crecientes de nuestro fármaco en estudio, y observamos que la cantidad de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ) se reduce conforme aumenta la dosis. Por tanto se puede decir que la metformina disminuye la producción de citoquinas proinflamatorias.

### 3) Efectos de la metformina en la expresión de citoquinas antiinflamatorias <sup>15</sup>

Para evaluar el efecto de la metformina en la expresión de citoquinas antiinflamatorias se procedió a realizar un análisis Western Blot para medir los niveles de IL-4 e IL-10.



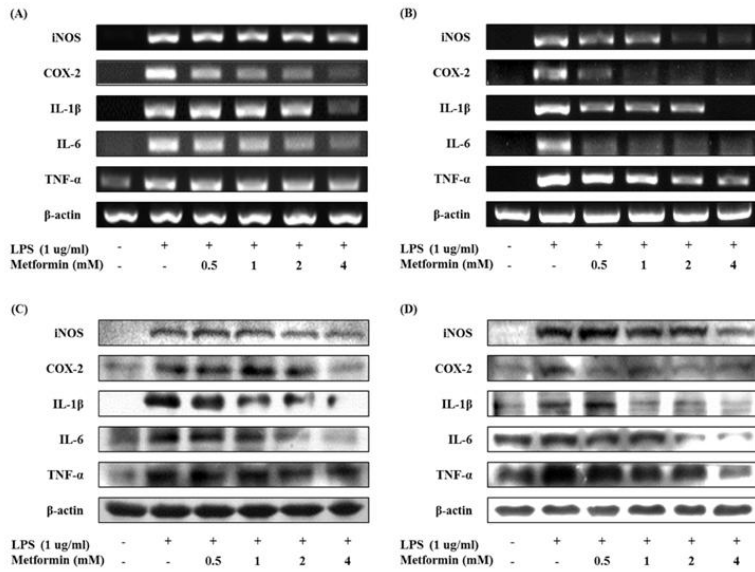
**Figura 5:** La primera gráfica (A) corresponde a la línea celular RAW 264.7 y en ella podemos observar que ambas citoquinas (IL-4 e IL-10) mantienen en cierta manera su expresión, conforme aumenta la dosis de metformina.

La segunda 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.

En base a estos resultados, se puede afirmar que uno de los mecanismos mediante los cuales la metformina puede prevenir la inflamación, es mediante la inducción de la expresión de estas citoquinas de carácter antiinflamatorio que van a contrarrestar el efecto proinflamatorio de las otras citoquinas (IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ).

### 4) Expresión de mRNA y proteínas de los mediadores inflamatorios modulados por la metformina <sup>15,16</sup>

La expresión de mRNA de los mediadores inflamatorios se llevó a cabo mediante la técnica de RT-PCR (Real Time-Polymerase Chain Reaction) y continuación se midieron los niveles proteicos de dichos mediadores mediante la técnica del Western Blot.



**Figura 6:** La dosis de metformina disminuye la regulación de los niveles de mRNA de iNOS, de la ciclooxigenasa 2 (COX-2), IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en las células RAW 264.7 estimuladas previamente con LPS y en los macrófagos peritoneales (A y B)

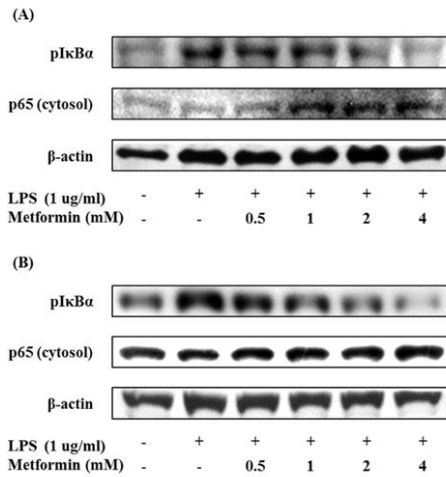
Además en el caso de las proteínas se observa que nuestro fármaco en estudio reduce considerablemente la producción de las mismas conforme se incrementa su concentración en el medio. (C y D)

Por estos resultados, se puede pensar que la metformina atenúa de forma notable, incluso inhibe en algunos casos la producción de moléculas proinflamatorias tales como NO o PGE<sub>2</sub> y de citoquinas proinflamatorias. Además según los resultados, también produce una disminución de la expresión de mRNA en macrófagos inducidos con LPS.

### 5) Supresión de la activación de la vía NF- $\kappa$ B por la metformina <sup>15</sup>

Se ha estudiado la supresión de la vía NF- $\kappa$ B mediante un análisis de Western Blot. En él analizamos la expresión de la proteína pI  $\kappa$ B $\alpha$  y el p65 NF- $\kappa$ B citosólico para determinar el efecto de la metformina sobre esta vía celular.

Si la proteína pI  $\kappa$ B $\alpha$  se activa, el p65 NF- $\kappa$ B citosólico se trasloca al núcleo, lo que induce la expresión de citoquinas proinflamatorias.



**Figura 7:** En las células RAW 264.7 (A) observamos un claro descenso de la expresión de la proteína pI  $\kappa B\alpha$ , así como de la expresión del p65 citosólico.

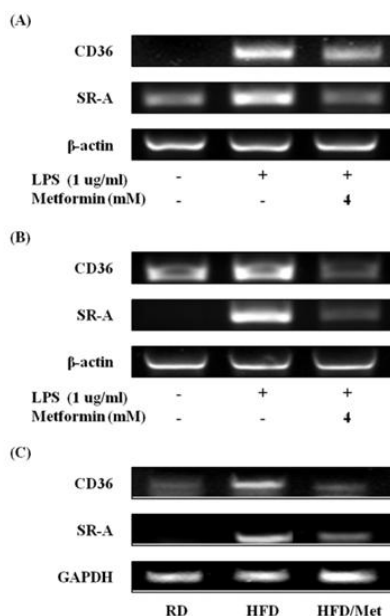
En el caso de los macrófagos peritoneales (B) si que se aprecia una reducción de la expresión de la proteína pI  $\kappa B\alpha$ , pero no del p65 citosólico.

Podemos concluir, por tanto, que el fármaco suprime la fosforilación de I  $\kappa B\alpha$  y la traslocación de la subunidad p65 citosólica en los macrófagos, lo que conlleva una disminución de la activación de esta vía proinflamatoria.

### 6) Efectos de la metformina en la expresión de los receptores scavenger <sup>15,18</sup>

Para llevar a cabo este análisis de los efectos de la metformina en la inducción de los receptores scavengers, se procedió a detectar la expresión genética de estos receptores (CD36 y SR-A) mediante RT-PCR, ya que su sobreexpresión nos da idea de la condición fenotípica M1 de dichos macrófagos.

Se va a valorar la expresión de los distintos receptores en macrófagos y en tejido adiposo blanco de ratones obesos High-Fat Diet (HFD) (A y B). Para ello se les somete a una exposición a LPS y a continuación a una concentración de metformina de 4 Mm. También se analizará la expresión de mRNA de CD36 y SR-A mediante RT-PCR (C).



**Figura 8:** Se observa que en las células RAW 264.7 (A) se produce un aumento notable de la expresión de CD36 y SR-A 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.

Finalmente en el análisis de la expresión de mRNA de CD36 y SR-A, podemos observar que la expresión de estos receptores en los ratones alimentados con una dieta rica en grasa está aumentada y que tras la administración del fármaco la expresión disminuye considerablemente.

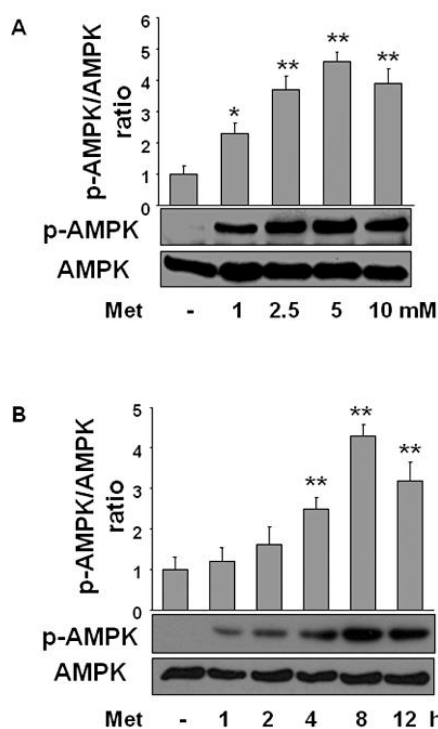
Podemos deducir por tanto, que la metformina juega un papel importante en la inhibición de la expresión de los receptores proinflamatorios scavenger tanto en macrófagos como en ratones con obesidad. Esto conlleva una disminución del cambio de fenotipo a M1 y por tanto una reducción del desarrollo del proceso inflamatorio.

**7) El efecto antiinflamatorio de la metformina está mediado a través de la activación de la AMPK** <sup>16, 17, 18</sup>

La principal diana molecular de la metformina es la AMPK (proteín quinasa activada por AMP). Esta enzima es muy importante porque cumple un papel decisivo en el desarrollo de varias enfermedades como son la diabetes, el cáncer, la inflamación o la obesidad.

Se investigó si el efecto antiinflamatorio de la metformina como mediador de la respuesta del LPS se produce mediante la activación de la AMPK.

Para ello se quiso demostrar que la metformina inducía la fosforilación de la AMPK de forma dosis dependiente y si esta acción dependía del tiempo.



**Figura 9:** Los macrófagos (A) fueron tratados con concentraciones crecientes de metformina (1, 2.5, 5, 10mM) durante 8 horas. Una vez transcurrido este tiempo, la AMPK total y la AMPK fosforilada se analizó mediante Western Blot.

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.

A medida que se incrementa la dosis de metformina y el tiempo de exposición, aumenta también la fosforilación de la AMPK, por lo que podemos determinar que el mecanismo de acción antiinflamatorio de la metformina, es mediante la fosforilación de esta molécula.

## 2) ENSAYOS EN TEJIDOS ANIMALES

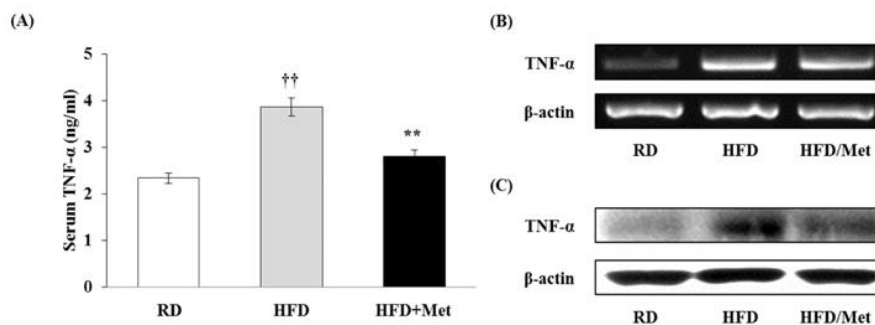
Trabajamos en dos condiciones experimentales distintos.

En primer lugar tenemos unos ratones que han sido alimentados con una dieta hidrocarbonada estándar. (RD)

El segundo modelo corresponde a ratones que han sido alimentados con una dieta rica en grasa (ratones obesos – HFD) y que a continuación se les ha administrado metformina (HFD+ Metformin).

### 8) Reducción de la secreción de TNF- $\alpha$ IN VIVO<sup>15</sup>

Para la realización de este ensayo se analizaron los niveles de TNF- $\alpha$  en suero mediante la técnica de ELISA en muestras tomadas de la sangre de los ratones en ambas condiciones experimentales.



**Figura 8:** 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 y que 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- $\alpha$ .

Asimismo en los gráficos B y C (Western Blot) se observa también un descenso de la producción del mRNA de TNF- $\alpha$  en los tratados con nuestro fármaco, en contraste con los no tratados.

De acuerdo a estos resultados se puede afirmar que la metformina atenúa la producción de citoquinas proinflamatorias en macrófagos, especialmente del TNF- $\alpha$ .

Además nuestro fármaco reduce significativamente e incluso disminuye la regulación de los niveles de mRNA y proteínas de TNF- $\alpha$ .

## **6. DISCUSION**

Las características de la dieta de los países industrializados, cada vez más hipercalórica, inducen una tendencia a la obesidad que contribuye directamente al desarrollo de una resistencia a la insulina y por ende a una Diabetes Mellitus tipo 2<sup>2,3</sup>.

Gracias a diferentes estudios, se ha comprobado que las personas obesas generan una respuesta inflamatoria de bajo grado que es un factor determinante a la hora de inducir una resistencia a la insulina<sup>2</sup> y los macrófagos cumplen un rol importante en este proceso, ya que van a hipersecretar citoquinas proinflamatorias desequilibrando el balance entre citoquinas inflamatorias y antiinflamatorias<sup>2,3,4</sup>. De esta forma, inducen la filtración y la activación de otros macrófagos en sangre, provocando a la larga una inflamación innecesaria que puede desencadenar una resistencia a la insulina<sup>4,7</sup>.

En nuestro estudio hemos dilucidado los mecanismos por los cuales la metformina modula el proceso inflamatorio, y su acción antiinflamatoria directa.

En primer lugar se observa que el **NO** es un mediador inflamatorio de importancia ya que el gen iNOS solamente se expresa después de que se dé una infección y la síntesis de NO catalizada por dicho gen es un marcador de inflamación. En este trabajo se ha visto que una dosis dependiente de metformina reduce la producción de esta molécula y además suprime los niveles de mRNA y de proteínas de iNOS en los macrófagos activados con LPS<sup>15,16,17</sup>.

A continuación se ha valorado si el fármaco elegido influye en la **secreción de citoquinas**. Se conoce que las células inmunes liberan citoquinas en respuesta a diferentes estímulos<sup>2,3,4</sup>. Estas moléculas pueden tener un carácter proinflamatorio si activan macrófagos u otras células provocando la activación del proceso inflamatorio, o por el contrario son antiinflamatorias inhibiendo el exceso de inflamación y manteniendo así la homeostasis.

En situaciones normales existe un equilibrio de la secreción de ambas citoquinas, pero se ha visto que en el paciente obeso este equilibrio está desplazado hacia la producción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de los macrófagos<sup>2,4</sup>.

En este estudio, se puede observar que una dosis dependiente de metformina disminuye la producción de **citoquinas proinflamatorias** importantes tales como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  mediante la inhibición de la expresión del mRNA<sup>15,16</sup>.

Sin embargo, este fármaco aumenta la expresión de **citoquinas antiinflamatorias** (IL-4 e IL-10)<sup>15</sup>.

Además el hecho de que exista un desequilibrio favorable al desarrollo del proceso inflamatorio es en parte porque existe una sobreexpresión de los **receptores scavenger** CD-36 y SR-4 en los macrófagos<sup>5,6,15</sup>.

Al tratar con la metformina esos macrófagos se aprecia un descenso de la expresión de dichos receptores, lo que nos indica que este fármaco ejerce un efecto directo sobre los macrófagos determinando un cambio de polarización hacia M2 en lugar de M1, y por tanto reduciendo el efecto inflamatorio<sup>15</sup>.

Dentro de las citoquinas proinflamatorias liberadas, el **TNF- $\alpha$**  es una de las que está más asociada con la inflamación a fin de proteger al huésped de la infección. Esta citoquina afecta no sólo en procesos inflamatorios sino también en enfermedades metabólicas que cursan con sintomatología grave<sup>3</sup>. Esta molécula se encuentra en niveles muy altos en el tejido adiposo sobretodo de los pacientes obesos y tiene efectos a nivel del metabolismo de la glucosa causando resistencia a la insulina. En consecuencia, interfiere con el metabolismo lipídico incrementando las concentraciones de ácidos grasos y de triglicéridos en sangre y altera la composición de algunas proteínas como las VLDL y las LDL, contribuyendo de esta forma a la obesidad<sup>2,3,4</sup>.

En este estudio podemos ver que la metformina suprime significativamente la producción de TNF- $\alpha$  y atenúa la expresión de genes y de proteínas de TNF- $\alpha$  en macrófagos y en ratones obesos. Esto nos lleva a la conclusión de que la biguanida inhibe la inflamación mediante la atenuación de la producción de TNF- $\alpha$ <sup>15</sup>.

Dentro del proceso inflamatorio, una de las vías de mayor importancia es la **vía NF- $\kappa$ B**. Cuando el estímulo inflamatorio activa la quinasa I  $\kappa$ B (IKK), ésta fosforila la subunidad  $\alpha$  de I  $\kappa$ B, y la subunidad p65 se activa por la degradación de la subunidad anterior. Esta última subunidad p65 induce la expresión de citoquinas pro-inflamatorias al trasladarse al núcleo.<sup>12</sup>

En el trabajo realizado se ha medido la capacidad de la metformina a la hora de inhibir la expresión génica de la quinasa I  $\kappa$ B y de la subunidad p65.

Se puede determinar que la metformina tiene efectos antiinflamatorios ya que produce la reducción de la producción de las citoquinas mediante la supresión de la expresión de los genes que inducen la fosforilación del factor I  $\kappa$ B  $\alpha$  y la traslocación de la subunidad p65 del citosol al núcleo<sup>15</sup>.

Finalmente se ha estudiado el **efecto antiinflamatorio** de la metformina a través de la **activación de la AMPK**, ya que esta es su principal diana molecular.

Se observa que existe un aumento de la fosforilación de la AMPK conforme se eleva la concentración de metformina a la que las células están expuestas.

Gracias a estos datos, llegamos a la conclusión de que el mecanismo de acción de la metformina a nivel inflamatorio es mediante la fosforilación de la AMPK<sup>13, 14, 16</sup>.

## **7. CONCLUSION**

Gracias a la revisión de ambos estudios podemos concluir que la metformina, además de tener un importante papel a nivel de la glucemia, tiene características antiinflamatorias cruciales para que se pueda evitar el desarrollo del proceso inflamatorio y por ende de las posibles complicaciones asociadas a asociación de la resistencia a la insulina y la inflamación.

Mediante el uso de este fármaco se podría tratar la inflamación desde un comienzo y al mismo tiempo que sirva como profilaxis a la hora de desarrollar una enfermedad secundaria relacionada con la resistencia a la insulina.

## **8. REVISIONES BIBLIOGRÁFICAS**

[1].- Organización Mundial de la Salud. *Obesidad y sobrepeso, Centro de prensa* <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/> (último acceso 24 de mayo de 2016)

[2].- Maximilian Zeyda, Thomas M. Stulnig. Obesity, Inflammation, and Insulin Resistance- A Mini- Review. *Gerontology*

[3].- S. Galic et al. Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and Cellular Endocrinology* 316(2010) 129-139 (Review)

[4]. Steven E. Shoelson, Jongsoon Lee Allison B. Goldfine. Inflammation and insulin resistance. *The Journal of Clinical Investigation*, 2006, Volume 116: 1793-1801 (Review) <http://www.jci.org>

[5].- Canton, Johnathan; Neculai, Dante; Grinstein, Sergio *Nature reviews. Immunology*, 09/2013, Volumen 13, Número 9

[6].- Kzhyshkowska, Julia; Neyen, Claudine; Gordon, Siamon *Immunobiology*, 05/2012, Volumen 217, Número 5,

[7].- Simos Schenk, Mazyar Saberi, and Jerrold M. Olefsky. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*, 2008, Volume 118: 2992-3002 Number 9 <http://www.jci.org>

- [8].- International Diabetes Federation. *About Diabetes, Complications*  
<http://www.idf.org/complications-diabetes?language=es> (último acceso el 22 de mayo de 2016)
- [9] American Diabetes Association. *Vivir con Diabetes, Complicaciones*  
<http://www.diabetes.org/es/vivir-con-diabetes/complicaciones/> (último acceso el 22 de mayo de 2016)
- [10].- Salazar, J.J., et al., Diabetes Medications: Impact of Inflammation and Wound Healing, *Journal of Diabetes and Its Complications* (2015),  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2015.12.017>
- [11].- *Farmacología Básica y Clínica/ Velázquez* - P. Lorenzo et al- 18ª Ed – Buenos Aires; Madrid: Médica Panamericana, 2008, Capítulo 37
- [12].- *Biología Celular y Molecular/ Harvey Lodish et. Al.- 7ª ed.- Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Médica Panamericana, 2013, Capítulo 16*
- [13].- MARCOS-GOMEZ, B. et al. Obesidad, inflamación e insulino-resistencia: papel de los ligandos del receptor gp 130. *Anales Sis San Navarra* [online]. 2008, vol.31, n.2, pp.113-123. ISSN 1137-6627 [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1137-66272008000300002](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272008000300002) (último acceso 24 de mayo de 2016)
- [14].- Ramesh M, Vepuri SB<sup>1</sup>, Oosthuizen F<sup>1</sup>, Soliman ME, *Applied Biochemistry and Biotechnology Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase (AMPK) as a Diverse Therapeutic Target: A Computational Perspective*. February 2016, Volume 178, Issue 4, pp 810-830
- [15].- Bobae Hyun, et al. Metformin Down-regulates TNF- $\alpha$  Secretion via Suppression of Scavenger Receptors. *INMUNE NETWORK* Vol. 13, No. 4: 123-132, August, 2013
- [16].- K. Tsoyi 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
- [17] Kato Y et al. Inhibition of NO by Metformin in response to Lipopolysaccharide by Inhibiting MyD88-Independent Pathway *Horm Metab Res* 2010; 42: 632-636
- [18].- L. Buldak et al., *Pharmacological Reports* 66: Metformin affects macrophages' phenotype and improves the activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase and decreases malondialdehyde concentration in a partially AMPK-independent manner in LPS stimulated human monocytes/ macrophages (2014) 418-429
- [19].- L. Buldak et al., Metformin reduces the expression of NADPH oxidase and increases the expression of antioxidative enzymes in human monocytes/macrophages cultured *in vitro*, *Epub* 2016 Jan 11: 1095-1103.