



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
SECCIÓN DE POSGRADO

**ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y
ANALGÉSICA DE LA METFORMINA EN EL CUADRO
AGUDO**

PRESENTADA POR
JOSEPH JESÚS SÁNCHEZ GAVIDIA

TESIS PARA OPTAR GRADO DE MAESTRO CIENCIAS BÁSICAS CON
MENCIÓN EN FARMACOLOGÍA

LIMA – PERÚ

2014



**Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada
CC BY-NC-ND**

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede cambiar de ninguna manera ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

SECCIÓN DE POSGRADO

**ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD
ANTIINFLAMATORIA Y ANALGÉSICA DE LA
METFORMINA EN EL CUADRO AGUDO**

TESIS

**PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO
EN CIENCIAS BÁSICAS CON MENCIÓN EN FARMACOLOGÍA**

PRESENTADO POR

JOSEPH JESÚS SÁNCHEZ GAVIDIA

LIMA - PERÚ

2014



**ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y
ANALGÉSICA DE LA METFORMINA EN EL CUADRO
AGUDO**

ASESOR

Dr. Alberto Alcibiades Salazar Granara

Médico Cirujano, Profesor Investigador. Doctor en Medicina, Magister en Ciencias Básicas Médicas-Farmacología. Centro de Investigación de Medicina Tradicional y Farmacología – CIMTFAR. Instituto de Investigación, Facultad de Medicina Humana, Universidad de San Martín de Porres

ASESOR

Dr. Benjamín Castañeda Castañeda

Médico Cirujano, Jefe del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la USMP. Director del Centro de Investigación de Medicina Tradicional y Farmacología – CIMTFAR. Instituto de Investigación

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. Teodoro Oscanoa Espinoza

Dra. Celina Montes Ruiz

Dr. Francisco Rojas Castañeda

A mis padres, quienes encaminaron mi vida en el camino de la fe, el honor y la esperanza

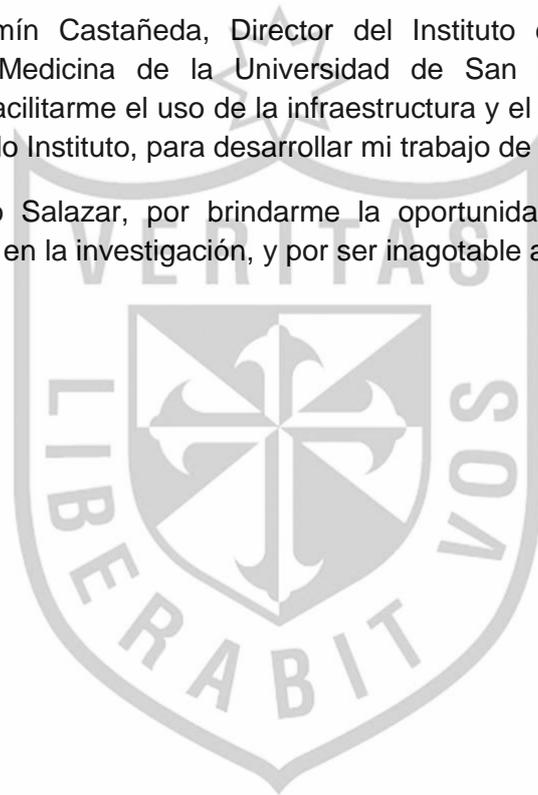
A mis hermanos, por darme la primera oportunidad de compartir y ser feliz

A mi esposa, por ser mi compañía perfecta



Al Dr. Benjamín Castañeda, Director del Instituto de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad de San Martín de Porres, por permitirme y facilitarme el uso de la infraestructura y el equipamiento necesario del mencionado Instituto, para desarrollar mi trabajo de investigación.

Al Dr. Alberto Salazar, por brindarme la oportunidad de seguir e inculcar perseverancia en la investigación, y por ser inagotable asesor, mentor y amigo.



ÍNDICE

| | Página |
|-----------------------------------|---------------|
| RESUMEN | 7 |
| ABSTRACT | 7 |
| INTRODUCCIÓN | 9 |
| MATERIAL Y MÉTODO | 11 |
| Tipo | 11 |
| Enfoque | 11 |
| Población y Muestra | 12 |
| Criterios de inclusión | 12 |
| Técnica de recolección de datos | 13 |
| Descripción de los instrumentos | 13 |
| RESULTADOS | 17 |
| DISCUSIÓN | 22 |
| CONCLUSIONES | 24 |
| RECOMENDACIONES | 25 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 26 |

RESUMEN

Objetivo: Conocer la actividad antiinflamatoria y analgésica de la Metformina en un evento agudo de inflamación y dolor inducido en roedor.

Material y Método: Estudio de tipo experimental, preclínico, doble ciego, randomizado, prospectivo de enfoque cuantitativo. Se utilizaron 124 ratones albinos hembras. Se evaluó el efecto sobre la inflamación por medio de la prueba de edema plantar inducido por Carragenina, en 64 ratones, divididos en 3 grupos control con diclofenaco, agua destilada y no recibe nada y 5 grupos experimentales con metformina a dosis de 50, 100, 150, 200 y 250 mg/Kg respectivamente. Para evaluar el efecto sobre dolor se utilizó la prueba de la placa caliente usando 64 ratones divididos de la misma manera que el primer caso. Para el análisis de las variables se emplearon las siguientes pruebas: ANOVA de una cola, t de Student, Tukey, Shapiro-Wilk y Correlación de Pearson.

Resultados: se evidenció un efecto antiinflamatorio mediante el cálculo del porcentaje de inhibición del edema, obteniéndose hasta un 53,9% de reducción en el grupo con 50 mg/Kg de metformina, aunque no se encontró relación entre la dosis y el efecto. Se evidenció un efecto analgésico calculado por el aumento del tiempo de reacción a la placa caliente, que se incremento hasta en un 56,2% en el grupo tratado con 250 mg/Kg de metformina.

Conclusión: Este estudio preclínico evidencia un efecto antiinflamatorio y analgésico en el cuadro agudo inducido de manera experimental que puede servir de precedente para posteriores estudios en animales superiores y clínicos que orienten a definir nuevas utilidades terapéuticas de la metformina.

ABSTRACT

Objective: To study the anti-inflammatory and analgesic activity of metformin in an acute event of inflammation and pain induced rodent.

Material and Methods: experimental, pre-clinical, double-blind, randomized prospective quantitative approach. 124 albino female mice were used. The effect on inflammation by testing carrageenan induced edema in 64 mice divided into 3 groups diclofenac control, distilled water and gets nothing, and five experimental groups with metformin at doses of 50 was evaluated, 100 , 150, 200 and 250 mg / Kg respectively. The hot plate test using 64 mice divided in the same manner that the first case was used to evaluate the effect on pain. ANOVA one-tailed Student t Tukey, Shapiro-Wilk and Pearson Correlation: For analysis of the variables the following tests were used.

Results: an anti-inflammatory effect was demonstrated by calculating the percent inhibition of edema, yielding up to 53.9% reduction in the group with 50 mg / kg of metformin, although no relationship between dose and effect was found. Calculated an analgesic effect by increasing the reaction time to the hot plate, which increased to 56.2% in the group treated with 250 mg / kg of metformin was demonstrated.

Conclusion: This study demonstrates a pre-clinical anti-inflammatory and analgesic effect in acute disease induced experimentally that may serve as a precedent for further studies in higher animals and clinical guide defining new therapeutic uses of metformin.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

La investigación y desarrollo de fármacos va en aumento, pero, el número anual de nuevos medicamentos aprobados por la Food and Drug Administration (FDA) es bajo debido a que las tasas de deserción en los procesos de investigación es alta o los resultados no son definitivos (1).

Para poder comercializar un medicamento para el uso humano se requiere superar de forma secuencial una serie de etapas que finalizan con la aprobación del fármaco por parte de las autoridades competentes. Sin embargo, este proceso es largo, muy costoso y entre miles de compuestos estudiados solo uno llegará finalmente a comercializarse, lo que desmotiva el negocio de investigación farmacéutica y por ello se buscan nuevas alternativas (2).

Una de estas alternativas se centra en buscar nuevas aplicaciones terapéuticas de fármacos ya conocidos (3). Esto reduce costos, ya que el compuesto es rápidamente introducido en los ensayos clínicos, de manera que en un espacio de tiempo relativamente corto el “nuevo medicamento” sale a la luz con las nuevas aplicaciones terapéuticas como ocurrió con la del ácido acetilsalicílico al que luego de su efecto antiinflamatorio, analgésico y antipirético se descubrieron sus efectos antiagregantes plaquetarios.(4)

La Metformina es un fármaco hipoglucemiante con gran potencial pleiotrópico, al que se le atribuye posibles efectos “off-label” o fuera de indicación, actualmente es el antihiperoglucemiante oral más recetado en todo el mundo. (5)

Recientemente, estudios clínicos han reportado que este fármaco mejora la función endotelial (6), disminuye la mortalidad y las complicaciones cardiovasculares de la DM tipo 2, como la aterosclerosis (7), y algunos datos preclínicos señalan una acción anticancerígena. (8)

Además existen numerosos estudios que evidencia una acción antiinflamatoria de la Metformina al ser capaz de disminuir diferentes mediadores como son: moléculas de adhesión, citocinas (TNF, IL-6, IL-1), factores de migración de macrófagos, proteína C reactiva, entre otros. (9)

Series de casos de síndrome de ovario poliquístico sugieren que la Metformina tendría efecto antiinflamatorio, determinado por una disminución

estadísticamente significativa de algunos marcadores plasmáticos de inflamación, incluyendo la molécula de adhesión intercelular, molécula 1 de adhesión celular vascular, factor inhibitorio de la migración de macrófagos, y la proteína C reactiva (PCR). (9)

En otros pacientes con aterosclerosis por diabetes, se ha demostrado que la Metformina inhibe la activación de factor nuclear de transcripción κ B (NF- κ B) en las células endoteliales humanas, lo cual generó una disminución significativa de la producción de las citocinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- α . (10)

A pesar de que estos análisis han sido realizados *in vitro* y avocados a procesos crónicos, es posible plantear que la Metformina también tenga una acción antiinflamatoria en un evento agudo.

El principal beneficio de comprobar este hecho, es generar una nueva posibilidad terapéutica para la inflamación y, de manera indirecta, para la analgesia. Ya que por la poca toxicidad y los nulos efectos hipoglicemiantes, en personas sanas de la Metformina, podría constituir una opción prometedora para tratar la inflamación tanto crónica como aguda.

Creo que es importante determinar si realmente la Metformina posee propiedades analgésicas y antiinflamatorios en procesos agudos, ya que de ser así sería de gran beneficio tanto para la comunidad médica como para las personas en general, pues se tendría en el mercado un medicamento seguro (con respecto a su toxicidad y farmacocinética) y con mayores propiedades terapéuticas (hipoglucemiante, cardioprotector, anticancerígeno, antiinflamatorio y/o analgésico). Es decir la Metformina podría ser considerada como un medicamento más elaborado y efectivo.

Por otra parte, existen estudios en roedores que permiten explorar el efecto analgésico y antiinflamatorio agudo en el roedor, como lo son la prueba de la placa caliente (hot plate test), y la prueba del edema plantar por carragenina (paw oedema carragenan test), que respectivamente, son ensayos pre-clínicos estandarizados y recomendados para los fines explícitos. (34)

Por todo lo antes expuesto, esta investigación se centró en explorar la actividad antiinflamatoria y analgésica de la Metformina en un evento agudo de inflamación y dolor en roedor. Asimismo, se busco Establecer la dosis óptima

de la Metformina para obtener un efecto antiinflamatorio y analgésico agudo, y se comparó estas respuestas frente a un AINE aceptado.



CAPITULO II. MATERIALES Y MÉTODO

TIPO DE INVESTIGACIÓN

DESCRIPCIÓN DEL DISEÑO

Experimental con randomización de tipo probabilístico simple al azar, haciendo uso de una tabla de números aleatorios. Previa enumeración de la muestra. Este estudio es cuantitativo como parte del modelo experimental donde se trabajan con variables que deben ser objetivables en cuantía.

Se llegó a definir el diseño experimental debido a que busco encontrar otras propiedades farmacológicas de la Metformina como parte de un estudio preliminar a la experimentación en seres humanos utilizando los controles ideales para ubicar estas nuevas propiedades en ratones.

TIPO – NIVEL

Es un trabajo exploratorio porque se buscó comprobar una aplicación poco conocida de la Metformina, un fármaco con actividad hipoglucemiante demostrada, y aprobado por diversas instituciones y laboratorios en el mundo, sin embargo, en los últimos años se le está atribuyendo propiedades alternativas.

ENFOQUE

El enfoque de la investigación es Cuantitativo, puesto que se trabajó con valores numéricos, tanto con la dosis de Metformina como con el volumen de la pata del roedor y el periodo de latencia tras la lamida de las patas del roedor.

POBLACIÓN Y MUESTRA

POBLACIÓN:

Ratones blancos especie *mus musculos*

MUESTRA:

Fueron 100 ratonas albinas hembras (*mus musculos*), cuyos pesos oscilarán entre 20 a 40 gramos. Estas se adquirirán en el Instituto Nacional de Salud (INS - Bioterio Chorrillos Lima – Perú), y serán acondicionadas en las instalaciones del Bioterio de la Facultad de Medicina Humana de la USMP, a una Temperatura de 22°C (+/-3) con una humedad promedio de 30 – 70%, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y niveles de ruido menores a 70 decibeles.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Hembras.
- Especie: *mus musculus*
- Pesos oscilarán entre 20 a 40 gramos.
- Sanas: no evidencian signos físicos ni conductuales de enfermedad.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Disminución ó aumento de peso de los ratones
- Presencia de alguna lesión física de los ratones antes de la experimentación o durante su permanencia en el bioterio.
- Dificultad en la aclimatación de los ratones por varios días.
- Ratones que adquirieran o desarrollaran alguna enfermedad o lesión que no sea inherente al estudio.
- Ratones que mueran durante el estudio.

TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

DESCRIPCIÓN DE LOS INSTRUMENTOS.

Test de Carragenina:

Consiste en la administración subcutanea de una pseudosolución de Lambda carragenina, un mucopolisacarido sulfatado extraido del alga marina Chondrus

crispus a nivel de la aponeurosis plantar de la rata o ratón, provocando una reacción de carácter inflamatorio, mediada por la liberación de diversos autacoides.

Las reacciones con compuestos de referencia o controles positivos se colocan antes de la inyección de carragenina. La pata de los ratones son sumergidas en el pletismometro digital conteniendo agua exactamente hasta la marca de tinta en la piel sobre el maléolo lateral varias horas después de la inyección de carragenina. Se registran los volúmenes obtenidos de la pata trascurrido un tiempo de registro. En este caso se registró el volumen cada hora durante 5 horas. El porcentaje de inhibición de edema es controlado para cada grupo de animales en comparación con el grupo control. (31)

Test de la placa caliente (Hot plate test)

Consiste en la introducción de una rata o ratón en un cilindro abierto colocado sobre un suelo metálico calentado a una temperatura constante. Se mide el tiempo de latencia hasta la expresión de dos respuestas conductuales, el lamido de las patas traseras y el salto. En ocasiones se toma en cuenta sólo la primera que se produzca. Ambas respuestas son integradas a nivel supraespinal.

El lamido de la pata es sensible solo a agonistas opioides, mientras la segunda respuesta puede también verse afectada por AINE. Es un test muy sensible al aprendizaje, de tal forma que no es recomendable su repetición. (38)

En este estudio se registró el parámetro de tiempo de reacción (en segundos) frente al estímulo térmico. Primero se relajó la medición del basal correspondiente para todos los grupos experimentales sin tratamiento. Luego se realizó la medición y registro de los tiempos de reacción de los ratones frente al estímulo térmico a partir de la primera hasta la cuarta hora. Dicha medición y registro se realizó sin conocer a qué grupo correspondía cada ratón evaluado.

En el análisis final, debe tenerse en cuenta que esta prueba consiste en la estimulación de las cuatro extremidades y hasta la cola del animal de forma simultánea (Knoll et al., 1955). Estímulos que implican grandes áreas del cuerpo, sin duda, activan controles inhibitorios difusos que puedan alterar las respuestas observadas.

Pilotos y entrenamiento

Durante la preparación y la ejecución de los experimentos se procuró mantener las condiciones de ruido y temperatura controlados, asimismo se realizó la calibración de los instrumentos utilizados, pero vale mencionar que la realización del test del edema inducido por Carragenina amerita la colocación precisa de la pata de cada roedor en el recipiente del pletismometro y para disminuir el sesgo se realizaron ejercicios previos para adquirir la destreza adecuada previamente al registro de las mediciones.

Control de sesgos

Para reducir el sesgo se eligieron los grupos por sorteo y se les colocó un rotulo con un código a la jaula que contenía cada ratón para diferenciarlos. Asimismo se administraron las soluciones y el placebo sin reconocerlas ni al grupo de estudio al que pertenecía el ratón.

Grupos experimentales

Grupos para el Test de Carragenina

Son 8 grupos experimentales de 8 ratones cada uno

Grupo N° 01: será el control positivo al cual se le administrará Diclofenaco (antiinflamatorio no esteroideo), por vía oral, a dosis de 8 mg/kg.

Grupo N° 02: será el control negativo, al cual solo será expuesto al agente inflamatorio. Se administrara 0.5 ml de una solución al 2 %, en la región subplantar de la pata trasera del roedor.

Grupo N° 03: recibirá agua destilada como placebo a dosis de 0.2 ml/100 g, a través de la vía oral.

Grupo N° 04: se le administrará Metformina por vía oral, a dosis de 50mg/Kg.

Grupo N° 05: se le administrará Metformina por vía oral, a dosis de 100mg/Kg

Grupo N° 06: se le administrará Metformina por vía oral, a dosis de 150mg/Kg

Grupo N° 07: se le administrará Metformina por vía oral, a dosis de 200mg/Kg

Grupo N° 08: se le administrará Metformina por vía oral, a dosis de 250mg/Kg

Grupos para el Test de la Placa Caliente

Son 8 grupos experimentales de 8 ratones cada grupo

Grupo N° 01: será el control positivo al cual se le administrará Diclofenaco (antiinflamatorio no esteroideo), por vía oral, a dosis de 8 mg/kg.

Grupo N° 02: será el control negativo, al cual solo será expuesto al agente alrogénico (calor) por un periodo no mayor a 30 segundos.

Grupo N° 03: recibirá agua destilada como placebo a dosis de 0.2 ml/100 g, a través de la vía oral.

Grupo N° 04: se le administrará Metformina por vía oral, a dosis de 50mg/Kg.

Grupo N° 05: se le administrará Metformina por vía oral, a dosis de 100mg/Kg

Grupo N° 06: se le administrará Metformina por vía oral, a dosis de 150mg/Kg

Grupo N° 07: se le administrará Metformina por vía oral, a dosis de 200mg/Kg

Grupo N° 08: se le administrará Metformina por vía oral, a dosis de 250mg/Kg

Validez y confiabilidad de los instrumentos.

Los pasos obtenidos del test de carragenina y de la placa caliente (hot plate) fueron obtenidos del Current Protocols in Pharmacology, el cual fue desarrollado por expertos de la industria en las aéreas de descubrimiento de fármacos y farmacología de seguridad. De tal forma, que siguiendo las indicaciones del Current Protocols in Pharmacology nos permitirá ejecutar proyecto exitoso de investigación con un máximo de eficiencia.

Técnicas para el procesamiento de la información

Los datos obtenidos son expresados en medias, desviación estándar, valor máximo, mínimo, absolutos, y relativos. Además se utilizó el test de análisis de varianza (ANOVA) de una vía para comparar los análisis grupales, la prueba de análisis de varianza de una cola para determinar la distribución de la población y la prueba de estadísticas de columnas para comparar por pares los grupos experimentales, medias, desviación estándar y error estándar, con un intervalo de confianza al 95%. Cuando se observaron diferencias significativas en la fase I, el procedimiento de comparaciones T de Student se utilizó para buscar la correlación entre los grupos. Para todo esto, se usó como soporte informático la aplicación ofimática Microsoft Office Excel 2010 y el programa estadístico GraphPad Prism Demo Versión 5.03.

Aspectos éticos

En el presente trabajo se seguirá los principios del International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animal (1985) y las recomendaciones internacionales de 41ª Asamblea Médica Mundial de Hong Kong (35). Los cuales recalcan el cuidado, la utilización apropiada y el trato humanitario de animales empleados en investigación, los cuales permiten en el ámbito de las ciencias biomédicas, la evaluación de medicamentos para el tratamiento y prevención de diversas enfermedades. Para este estudio se obtuvo un conocimiento adecuado de los ambientes y procedimientos (cantidades de dosis administradas) relacionados con su uso y cuidado, así como un adecuado control sanitario para protegerlos de microorganismos no definidos como parte de su condición. También, se tomará en cuenta el denominado “punto final”, en el cual se reduce o termina el dolor o el distrés del animal mediante la finalización del procedimiento, la administración de un tratamiento analgésico o la aplicación de la eutanasia.

Es importante mencionar que estos animales serán adquiridos de una fuente confiable y especializada, el Instituto Nacional de Salud (INS), lo cual nos garantiza el cuidado adecuado de éstos.

Finalmente, el presente estudio fue aprobado para su ejecución por el Instituto de Investigación de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de san Martín de Porres

CAPITULO III RESULTADOS

Resultados para la Prueba del Edema Plantar Inducido por Carragenina

Para el análisis de los resultados de la prueba del edema plantar inducido por carragenina, se realizó a partir de los volúmenes medidos, el cálculo del porcentaje de inhibición mediante la siguiente fórmula: $(V_c - V_t)/V_c \times 100$, donde V_c es la diferencia de volumen control y V_t es la diferencia de volumen tratado en el mismo tiempo determinado. Asimismo se realizó el cálculo del porcentaje de inflamación mediante la siguiente fórmula: $(V_t - V_i)/V_i \times 100$, donde V_t es el volumen al tiempo t y V_i es el volumen inicial a tiempo 0. Las comparaciones entre tratamientos se evaluaron mediante un análisis de ANOVA de dos vías (por tratamiento y tiempo) y se consideró un nivel de significancia de $p < 0,05$. El análisis se efectuó con el programa Graph Pad Prism v 4.0.

Para la prueba del edema plantar inducido por carragenina, en las condiciones de tratamiento con diclofenaco, se calculó el porcentaje de inhibición del edema, a partir de los valores medios de volumen desplazado comparado con la condición no tratada y placebo, observándose que el Metformina generó mayor inhibición del edema que Diclofenaco. (Ver Grafico 1)

El análisis estadístico de ANOVA de una vía muestra que los tratamientos evolucionaron similarmente en el tiempo, pero hay alguna diferencia entre ellos.

La aplicación a posteriori del test del t de Student mostró que la dosis de Metformina de 50 mg/kg a la segunda y tercera hora redujeron significativamente el edema plantar ($p < 0,05$ y $p < 0,01$ respectivamente), mientras que la dosis de 150 mg/Kg, lo hizo a la segunda hora ($p < 0,05$), aunque todos los tratamientos mostraron una tendencia a la reducción del edema comparados con la condición no tratada y placebo. El análisis comparativo de Correlación de Pearson, no mostró relación entre la dosis y el efecto alcanzado.

El control positivo con Diclofenaco mostró como se esperaba reducción significativa del edema en la tercera hora comparado con el grupo no tratado ($p < 0,05$).

Los porcentajes de inhibición del edema plantar de distintas concentraciones de Metformina y Diclofenaco por cada hora se muestran en la Tabla N°1, mientras que el cálculo de la inflamación se muestra en la Tabla N°2.

Tabla 1. Porcentajes de Inhibición del Edema Plantar por cada hora según la dosis

| | Metformina 50 mg/kg | | Metformina 100 mg/Kg | | Metformina 150 mg/Kg | | Metformina 200 mg/KG | | Metformina 250 mg/Kg | | Diclofenaco 8 mg/Kg | |
|-----------|------------------------|------|-------------------------|------|-------------------------|------|-------------------------|------|-------------------------|-------|------------------------|------|
| | %iN | %iP | %iN | %iP | %iN | %iP | %iN | %iP | %iN | %iP | %iN | %iP |
| 1h | 21,8 | 30,6 | 19,7 | 28,7 | 36,6 | 43,7 | 14,78 | 24,4 | 19 | 28,1 | 18,3 | 27,5 |
| 2h | 53,9** | 48 | 9 | -2,4 | 41* | 33 | 27,7 | 18,4 | 36,2 | 28 | 64 | 41 |
| 3h | 46* | 44,8 | 42,9 | 34 | 21,3 | 20,6 | 33,1 | 22,7 | 27,6 | 16,3 | 42,3* | 33,3 |
| 4h | 29,3 | 33,6 | 10 | 24,3 | 42,4 | 46,7 | -7 | 0,9 | -27,3 | -17,7 | 17,2 | 23,4 |
| 5h | 20,5 | 22,4 | 24,5 | 26,4 | 19,7 | 21,6 | 5,9 | 9,6 | -2,5 | 0 | 10,6 | 28,8 |

Porcentajes de inhibición del edema plantar de distintas concentraciones de metformina y diclofenaco. Los valores representan los porcentajes de reducción de este respecto a los grupos controles con la condición no tratada (%iN) y porcentaje de reducción del edema plantar respecto a los grupos controles con placebo (%iA). Test "t" de Student: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; $n = 8$.

Tabla 2. Porcentajes de Inflamación del Edema Plantar Por Cada Hora Según la Dosis

| | Metformina 50 mg/Kg | Metformina 100 mg/Kg | Metformina 150 mg/Kg | Metformina 200 mg/Kg | Metformina 250 mg/Kg | Diclofenaco 8 mg/Kg | Blanco | Placebo |
|-----------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|--------|---------|
| | %infla | %infla | %infla | %infla | %infla | %infla | %infla | %infla |
| 1h | 88,8 | 103,6 | 93,7 | 112 | 95 | 89,9 | 127,9 | 109,5 |
| 2h | 52 | 116 | 86 | 94 | 74 | 64 | 127 | 85 |
| 3h | 70,4 | 84,5 | 116,6 | 100,9 | 97,5 | 72,8 | 146,8 | 96,6 |
| 4h | 56 | 73,6 | 59,4 | 98,1 | 104,1 | 63,5 | 89,2 | 73,3 |
| 5h | 77,6 | 83,6 | 102 | 104,6 | 103,3 | 84,5 | 109,9 | 85,6 |

Porcentajes de Inflamación de las diferentes concentraciones de metformina, diclofenaco y controles (blanco y placebo).

Para una mejor visualización en la Figura 1 se grafican los porcentajes máximos de inhibición de la inflamación inducida por carragenina en los grupos tratados con diferentes dosis de metformina y diclofenaco. Puede apreciarse reducción significativa con diclofenaco y de metformina a distintas dosis

alcanzándose el porcentaje máximo de inhibición con Metformina a dosis de 50 mg/kg.

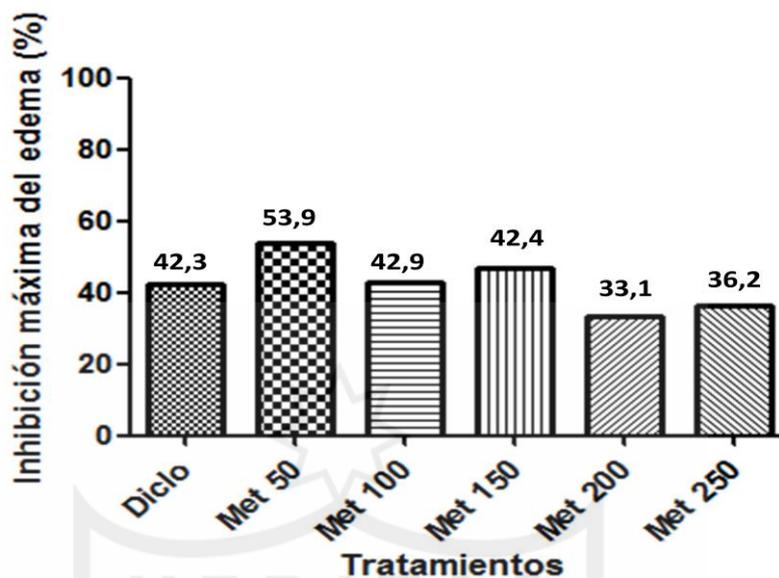


Figura 1. Porcentajes máximos de inhibición del edema según las dosis administradas.

Resultados para la Prueba de la Placa Caliente (Hot Plate Test)

En el análisis de la prueba de la placa caliente (hot plate test) se compararon los tiempos de reacción al estímulo térmico medidos. Las comparaciones entre tratamientos se evaluaron mediante un análisis de ANOVA de una vía (por tratamiento y tiempo) y se consideró un nivel de significancia de $p < 0,05$. El análisis se efectuó con el programa Graph Pad Prism v 4.0.

Para la prueba de la placa caliente, en las condiciones con metformina y con diclofenaco se compararon los tiempos de reacción transcurridos luego del estímulo térmico frente al grupo no tratado y placebo. El análisis estadístico de ANOVA de una vía muestra que evolucionaron similarmente en el tiempo, pero hay alguna diferencia entre ellos.

Posteriormente se aplicó el test de la t de Student mostrando un aumento significativo de la resistencia al estímulo doloroso térmico en los grupos tratados con Metformina, cuando se les comparó con los grupos blanco y placebo, encontrándose aumento del tiempo de reacción en el grupo con Metformina de 100 mg/Kg a la segunda hora ($p < 0,01$) y a la cuarta

hora ($p < 0,05$); el grupo de Metformina de 200 mg/Kg y Metformina 250 mg a la segunda hora ($p < 0,01$), aunque todos los tratamientos mostraron una tendencia al aumento de dicha resistencia comparados con la condición no tratada y placebo; asimismo se encontró un incremento de la resistencia cuando se utilizó Diclofenaco 8 mg/Kg a la cuarta hora ($p < 0,05$).

Para mayor claridad, en la tabla 3, se muestran los datos promedios de los tiempos de resistencia frente al estímulo térmico obtenidos por cada hora según las dosis administradas.

Tabla 3. Tiempos de Reacción en el Hot Plate Test Por Cada Hora Según la Dosis

| | Metformina 50 mg/Kg | Metformina 100 mg/Kg | Metformina 150 mg/Kg | Metformina 200 mg/Kg | Metformina 250 mg/Kg | Diclofenaco 8 mg/Kg | Blanco | Placebo |
|-----------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|--------|---------|
| | TR | TR | TR | TR | TR | TR | TR | TR |
| 1h | 13,4 | 17 | 13,8 | 14,8 | 21,2 | 14 | 17,5 | 12,9 |
| 2h | 12,4 | 13** | 18,4 | 21,6** | 26,5** | 19,5 | 11,4 | 14,6 |
| 3h | 18,8 | 16,3 | 17 | 19,1 | 18,8 | 24,3 | 17 | 19,4 |
| 4h | 14,4 | 17* | 17,6 | 23,6 | 24,3 | 20,1* | 11,6 | 10 |

Valores promedios de los tiempos de reacción (TR) frente al estímulo térmico en la prueba de la placa caliente. Se muestra aumento significativo del tiempo de reacción con metformina a dosis de 200 y 250 mg/Kg comparados con el grupo blanco y placebo. Test "t" de Student: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; $n = 8$.

El tiempo de reacción para el caso de la metformina se logró incrementar hasta en un 56,2% para la dosis de 250 mg/kg. Asimismo se evidenció el aumento significativo del tiempo de resistencia al estímulo térmico en los ratones del control positivo tratados con diclofenaco ($p < 0,05$).

La figura N°2 muestra las diferencias entre los tiempos promedios de reacción de los grupos tratados y controles.

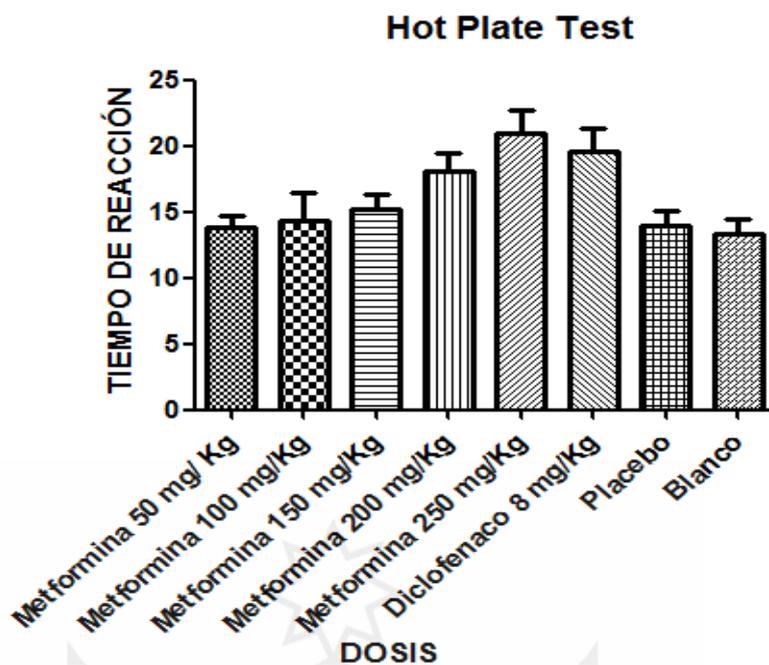


Figura N°2. Comparación entre tiempos de reacción y dosis en el Test de la Placa Caliente



CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Discusión

Se estableció el poder antiinflamatorio de Metformina en diversas concentraciones, mediante el test del edema inducido por carragenina. Este test es el más usado como modelo experimental de inflamación aguda para determinar el potencial antiinflamatorio (34).

La inflamación producida por carragenina se atribuye a la liberación de varios mediadores y se han descrito dos fases. La fase inicial se debe a la liberación de histamina, serotonina y citoquinas, en la primer hora luego de aplicada la inyección de carragenina. La segunda fase es atribuida a la liberación de bradiquininas, proteasas, prostaglandinas y lisosomas. Esta última fase es la más sensible a la mayoría de los agentes antiinflamatorios usados clínicamente. (35)

Si bien solo en dos momentos del tratamiento, la Metformina mostró diferencias significativas, puede apreciarse la reducción del edema como tendencia a todos los tiempos. La dispersión propia de los estudios *in vivo* fue comparable a la obtenida en otros trabajos con la misma metodología. (36) Teniendo en cuenta los tiempos de la segunda y tercera hora en el que se desarrolló la mayor inhibición del edema, podría postularse un efecto inhibitor de la segunda fase del edema, atribuible a la liberación prostaglandinas, citoquinas y acción lisosomal.

El Diclofenaco que se utilizó como testigo a comparar es un antiinflamatorio ampliamente utilizado en clínica para tratamiento de dolor e inflamación y puede ser usado como referencia en este tipo de estudios. (36) Este muestra una marcada actividad cuando se administra de manera sistémica; por ejemplo, en la dosis administrada para este estudio de 8 mg/Kg ha producido una inhibición de la inflamación de un 42,3% del edema inducido por carragenina. Su mecanismo inhibitor de la síntesis de prostaglandinas le da efectividad en la segunda fase del edema inducido por carragenina. (35)

Luego del análisis no se evidenció una correlación entre la dosis administrada y el efecto inhibitor del edema. Esto puede significar una variedad de factores

implicados farmacocinéticos y farmacodinámicos como la expresión de receptores diana, la sensibilidad, saturación, metabolismo y otros relacionados, como ocurre en el caso de múltiples fármacos utilizados en la terapéutica. (37)

En este experimento se estableció el efecto analgésico de la Metformina a diferentes dosis administradas, mediante el modelo del test de la placa caliente. Este test es un modelo experimental usado para evaluar el efecto analgésico en el cuadro agudo. (38) La percepción del estímulo térmico ocurre mediada por los receptores nerviosos térmicos de la piel, que responden ante los aumentos de temperatura. Luego de un tiempo determinado la sensación térmica se percibe como dolor, que mediante un arco reflejo ocasiona el alejamiento de la pata del objeto emisor de calor y la consecuente reacción de alivio por parte del roedor al lamerse. (38)

Después de la administración de Metformina se evidenció el incremento del tiempo de reacción significativo comparado con los controles de hasta un 56,2%. El mecanismo probable según el modelo experimental utilizado, puede no encontrarse relacionado al aumento de la sensibilidad de los nociceptores mediada por prostaglandinas, sino podría estar orientado a un mecanismo central o aún desconocido, sin embargo, trabajos de investigación similares no han evidenciado efectos significativos de actividad analgésica de la Metformina, por lo que valdría tomar en cuenta dicha información y contrastarla en estudios posteriores. (39)

Este estudio farmacológico preclínico comprueba la utilidad terapéutica de la Metformina sobre la inflamación y dolor agudo.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

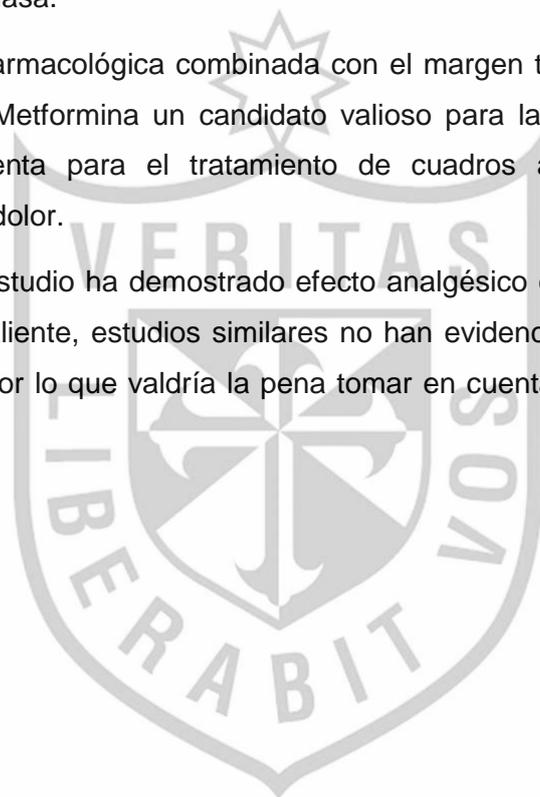
Conclusiones

En el presente estudio se ha demostrado un efecto inhibitorio de la inflamación del modelo del edema plantar inducido por Carragenina en el roedor del roedor.

El inicio y la duración del efecto antiinflamatorio sugieren que la Metformina actuó sobre la inhibición de la síntesis de prostaglandina mediada por la vía de la ciclo oxigenasa.

La actividad farmacológica combinada con el margen terapéutico y seguridad, vuelven a la Metformina un candidato valioso para la investigación adicional como un agente para el tratamiento de cuadros agudos asociados con inflamación y dolor.

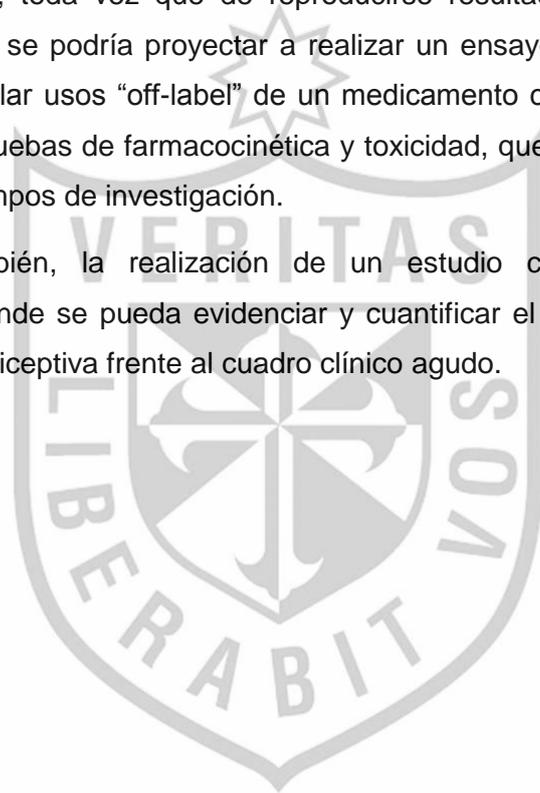
Si bien este estudio ha demostrado efecto analgésico cuando se utilizó el test de la placa caliente, estudios similares no han evidenciado que tal efecto sea significativo, por lo que valdría la pena tomar en cuenta esta información para su contraste.



Recomendaciones

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, la principal recomendación sería la complementación con otros modelos experimentales específicos para dolor e inflamación, con la posible inclusión de animales mayores de experimentación de tal manera que pueda ser corroborados los efectos y la eficacia de la Metformina como agente antiinflamatorio en un evento agudo; toda vez que de reproducirse resultados similares, en otros experimentos, se podría proyectar a realizar un ensayo clínico, puesto que la ventaja de hallar usos “off-label” de un medicamento conocido es que existen numerosas pruebas de farmacocinética y toxicidad, que nos permitirían acortar mucho los tiempos de investigación.

Sugiero, también, la realización de un estudio clínico observacional y descriptivo donde se pueda evidenciar y cuantificar el grado de inflamación y sensación nociceptiva frente al cuadro clínico agudo.



BIBLIOGRAFÍA

- 1 Paul, S. M. et al. How to improve R.&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nature Rev. Drug Discov* 2010; 9, 203–214.
- 2 Munos, B. Lessons for 60 years of pharmaceutical innovation. *Nature Rev. Drug Discov* 2009; 8, 959–968.
- 3 Shoichet, B.; Roth B.; Keiser, M.; Setola V. Predicting new molecular targets for known drugs. *Nature Chemical Biology* 2009; 462, 175-182.
- 4 Wolff T, Miller T, Ko S. Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events: an update of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med.* 2009;150(6):405-410.
- 5 Sirven, Joseph I. New Uses for Older Drugs: The Tales of Aspirin, Thalidomide, and Gabapentin. *Mayo Clinic Proceedings* 2010; 85(6):508-511.
- 6 Hattori Y, Suzuki K, Hattori S, and Kasai K Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor kappaB activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells. *Hypertension* 2006 47: 1183-1188.
- 7 Behzad Molavi, Negah Rassouli, Suveer Bagwe, Neda Rasouli. A review of thiazolidinediones and metformina in the treatment of type 2 diabetes with focus on cardiovascular complications. *Vascular Health and Risk Management* 2007;3(6) 967–973
- 8 Guppy A, Jamal-Hanjani M, Pickering L. Anticancer effects of metformin and its potential use as a therapeutic agent for breast cancer. Future Oncol. 2011 Jun;7(6):727-36
- 9 Caballero AE, Delgado A, Aguilar-Salinas CA, Herrera AN, Castillo JL, Cabrera T, Gomez-Perez FJ, Rull JA. The differential effects of metformin on markers of endothelial activation and inflammation in subjects with impaired glucose tolerance: a placebo-controlled, randomized clinical trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:3943–3948.

10 Masatoku Arai, Mitsuhiro Uchiba, Hidefumi Komura, Yuichiro Mizuochi, Naoaki Harada, Kenji Okajima. Metformin, an anti-diabetic agent, suppresses the production of tumor necrosis factor and tissue factor by inhibiting early growth response factor-1 expression in human monocytes *in vitro*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 2010 April (10)1124.

11 Violante Ortíz, Rafael. Uso de metformina en diabetes tipo 2, Secretaría de salud ISSA, 2002:21-24.

12 Pastor, Luna, Pastelín Gustavo, Martínez Martín, La diabetes mellitus y la cardioprotección, Revista Mexicana de Anestesiología, Vol. 34. No. 2, 2011: 111-125.

13 Calvert JW, Gundewar S, Jha S, Greer JJ, Bestermann WH, Tian R, Lefer DJ. Acute metformin therapy confers cardioprotection against myocardial infarction via AMPK-eNOS-mediated signaling. Diabetes 2008;57:696–705.

14 Belda-Iniesta C, Pernía O, Simó R. Metformin: a new option in cancer treatment. Clin Transl Oncol. 2011 Jun;13(6):363-7.

15 Córdova Villalobos, José; Lee , Gabriel; Hernández Ávila, Mauricio, et al. Plan de Prevención Clínica de las Enfermedades Crónicas, Rev Mex Cardiol 2009; 20 (1): 42-45.

16 Caballero E, Delgado A, Aguilar-Salinas C, et al. The differential effects of metformin on markers of endothelial activation and inflammation in subjects with impaired glucose tolerance: a placebo-controlled, randomized clinical trial. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89:3943–3948.

17 MORIN-PAPUNEN L, RAUTIO K, RUOKONEN A, et al. Metformin reduces serum C-reactive protein levels in women with polycystic ovary syndrome. J Clin Endocrinol Metab. 2003; 88:4649–4654.

18 DANDONA P, ALJADA A, GHANIM H, et al. Increased plasma concentration of macrophage migration inhibitory factor (MIF) and MIF mRNA in mononuclear

cells in the obese and the suppressive action of metformin. *J Clin Endocrinol Metab.*2004;89:5043–5047.

19 Kikuo Isoda, James L. Young, Andreas Zirlik, Lindsey A. MacFarlane, Naotake Tsuboi, Norbert Gerdes, Uwe Schönbeck, Peter Libby. Metformin Inhibits Proinflammatory Responses and Nuclear Factor- κ B in Human Vascular Wall Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:611-617.

20 Nan-Lan Huang , Shu-Hui Chiang, Chia-Hsiang Hsueh, et al. Metformin inhibits TNF- α -induced I κ B kinase phosphorylation, I κ B- α degradation and IL-6 production in endothelial cells through PI3K-dependent AMPK phosphorylation, *International Journal of Cardiology*, Vol 134, Issue 2 , 2009: 169-175.

21 Linley, J.; Rose, K.; Ooi, L.; Gamper, N. Understanding inflammatory pain: ion channels contributing to acute and chronic nociception *J Physiol* . 2010 459:657–669

22 Deans KA, Sattar N. “Anti-Inflammatory” drugs and their effects on type 2 diabetes. *Diabetes Technol Ther.*2006 Feb;8(1):18-27.

23 The Diabetes Prevention Program Research Group: Intensive lifestyle intervention or metformin on inflammation and coagulation in participants with impaired glucose tolerance. *Diabetes* 2005; 54:1566–1572.

24 Anand P, Sunita J. Papel de la metformina en una enfermedad inflamatoria intestinal inducida experimentalmente. *Ars Pharm* 2008; 49 (4): 267-281.

25 Gómez-GarcíaA, Martínez G, Ortega-PierresLuz, Rodríguez-AyalaE y Álvarez-Aguilar C. Rosuvastatina y metformina reducen la inflamación y el estrés oxidativo en pacientes con hipertensión y dislipidemia. *RevEsp Cardiol.*2007 Dic; 60(12):1242-9

26 Masatoku Arai, Mitsuhiro Uchiba, Hidefumi Komura, Yuichiro Mizuochi, Naoaki Harada, Kenji Okajima. Metformin, an anti-diabetic agent, suppresses the production of tumor necrosis factor and tissue factor by inhibiting early growth response factor-1 expression in human monocytes *in vitro*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2010 April (10)1124.

- 27 Capitulo 2, Inflamación aguda y crónica. Robbins. Patología humana. 8° edición: Elseiver; 2008. p. 33-61
- 28 Crespo Herrera, Sonia. Metformin, 50 years of use: Effectiveness, tolerance, security and new indications. *Rev CientCienc Med* 2009;12(2):23-5.
- 29 Ripudaman S. Hundal¹ and Silvio E. Inzucchi². Metformin: New Understandings, New Uses. *Drugs* 2003; 63 (18): 1879-1894
- 30 Evanthia Diamanti-Kandarakis, Charikleia D Christakou, Eleni Kandarakis, Frangiskos N Economou. Metformin: an old medication of new fashion: evolving new molecular mechanisms and clinical implications in polycystic ovary syndrome. *European Journal of Endocrinology* (2010) 162 193–212
- 31 Winter. et al. Carragenin induced edema hind paw of the rat as an assay for anti inflammatory drugs. (1962). *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* 3:544-550.
- 32 Pires Oscar César, Ashmawi Hazem Adel, Constantino Elton, Pelogia Naira Correa Cusma, Posso Irimar de Paula. Antagonistas serotoninérgico y noradrenérgico, por la vía subaracnoidea que aumentan la respuesta algica en ratones. *Rev. Bras. Anesthesiol.* [serial on the Internet]. 2011 Apr [cited 2011 July 07]; 61(2): 206-210. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003470942011000200009&lng=en. doi: 10.1590/S0034-70942011000200009.
- 33 Ángel R. Concepción Alfonso*, R. de la Peña Pino** y J. García Capote. Acercamiento al accionar ético-moral del científico que trabaja con animales de experimentación. Disponible en: <http://www.paho.org/Spanish/BIO/acta15.pdf>
- 34 Whitely, P.E., and Dalrymple, S.A., (1998) Unit 5.4.1: Models of inflammation: Carrageenan-induced paw edema in the rat, *Current Protocols in Pharmacology*, John Wiley & Sons, Somerset N.J.
- 35 Sinha, S., T. Murugesan, K. Maiti, J. Rahaman Gayen, M. Pal & B.P. Saha (2001) *J. Pharm. Pharmacol.* **53**: 193-6.

36 Carlos f. Chiclana, Andrea Enrique & Alicia E. Consolini (2009) *lat. am. j. pharm.* **28** (2): 275-8

37 Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica 12 Edición Pag. 48-49

38 Whitely, P.E., and Dalrymple, S.A., (1998) Unit 5.4.1: Models of Pain: Hot Plate test in the rat, *Current Protocols in Pharmacology*, John Wiley & Sons, Somerset N.J.

39 Ortiz MI, Ramírez-Montiel ML, González-García MP, Ponce-Monter HA, Castañeda-Hernández G, Cariño-Cortés R. The combination of naproxen and citral reduces nociception and gastric damage in rats. *Arch Pharm Res.* 2010 Oct;33(10):1691-7. ISSN 0253-6269

