

Análisis de la actividad antiinflamatoria y analgésica aguda de la metformina mediante el Test de Formalina.

Analysis of the Anti-Inflammatory and Acute Analgesic Activity of Metformin Through the Formalin Test.

José Montes^{1,2}, Kevin Pacheco¹, José Figueroa¹, Vanessa Inga¹, Yanina Ortega¹, Caterin Flores¹, Eleana Acosta¹, Vanessa Torres¹, Alberto Salazar^{2,3}.

RESUMEN

Objetivo: Determinar la actividad antiinflamatoria de la Metformina, así como la dosis óptima, en un evento agudo de inflamación, en roedores.

Material y Métodos: Se emplearon 42 ratas albinas hembras (Wistar), de peso promedio 250 gr. distribuidas aleatoriamente en seis grupos (n = 7), se empleó la prueba de formalina. Los animales recibieron Metformina (100, 200 o 300 mg/kg), Diclofenaco, agua destilada y formalina. Se aplicó la prueba de ANOVA de una vía, se utilizó el programa IBM SPSS Statistics v.20.

Resultados: No se presentó efecto de la Metformina sobre el dolor neurogénico. En la fase II de dolor inflamatorio, la Metformina a dosis de 100 y 300 mg/Kg, presentó tiempos de latencia de 22,40 y 47,10 seg., frente a 2,21 seg. con formalina (p<0.05). La Metformina a dosis de 300 y 100 mg/kg, presentó un tiempo de lamidas de 130,47 y 148,71 seg., frente a 283,36 seg. con formalina (p<0.05). La dosis de Metformina 300 mg/kg fue la que mayor efecto antiinflamatorio presentó, seguido de la dosis de 100mg/Kg.

Conclusiones: Se confirmó la acción antiinflamatoria aguda de la Metformina a dosis de 100 y 300 mg/kg, en roedor, mediante el test de formalina. La mayor eficacia anti-inflamatoria fue obtenida con dosis de 300 mg/kg.

(Rev Horiz Med 2012; 12(2): 35-40)

PALABRAS CLAVE: Metformina, antiinflamación, Diclofenaco, test de formalina, dolor, ratas.

ABSTRACT

Objectives: To determine the antiinflammatory activity of metformin and the optimal dose in an acute event of inflammation in rodents.

Material and Methods: We used 42 female albino rats (Wistar), average weight 250 gr. randomized into six groups (n = 7), and applied the formalin test. The animals received Metformin (100, 200 or 300 mg/kg), diclofenac, distilled water and formalin. Statistical analysis with one-way ANOVA, we used the IBM SPSS Statistics v.20 program.

Results: No effect of Metformin over neurogenic pain occurred. In phase II Metformin at doses of 100 and 300 mg/kg, had latencies of 22,40 and 47,10 sec. compared to 1.48 sec. with formalin (p<0.05). Metformin in doses of 300 and 100 mg/kg, had a time of 130,47 and 148,71 sec of licking compared to 283,36 sec. with formalin (p<0.05). The 300 mg/kg Metformin dose showed the greatest anti-inflammatory effect, followed by the 100mg/kg dose.

Conclusions: We confirmed the acute anti-inflammatory action of Metformin at doses of 100 and 300 mg / kg in mice through the formalin test. Most anti-inflammatory efficacy was obtained with the 300 mg/kg Metformin dose.

(Rev Horiz Med 2012; 12(2): 35-40)

KEYWORDS: Metformin, anti-inflammatory, diclofenac, formalin test, pain, rats.

¹ Estudiante de Medicina Humana en la Universidad de San Martín de Porres, Lima, Perú.

² Miembro de la Sociedad Científica de Estudiantes de Medicina de la Universidad de San Martín de Porres. SOCIEM-USMP

³ Médico Cirujano, Magister, Instituto de Investigación, CIMTFAR, FMH-USMP.

INTRODUCCIÓN

La inversión en investigación y desarrollo de fármacos, se ha incrementado sustancialmente en las últimas décadas, pero el número anual de nuevos medicamentos, innovadores, aprobado por la "Food and Drug Administration" de EE.UU. (FDA), no ha aumentado. Ya que las tasas de deserción en los procesos de investigación son muy altas y la relación eficiencia-eficacia en dichos procesos no es la esperada (1).

Es por ello que la industria y, en general, todo organismo que investiga y desarrolla nuevos compuestos, busca alternativas que permitan disminuir costos, debido a que no existe la necesidad de realizar demasiados estudios farmacocinéticos y de toxicidad, puesto que son conocidos, lo que permite acortar los tiempos. De esta manera, se busca nuevas aplicaciones terapéuticas de fármacos que están comercializados con otras indicaciones (2).

Uno de los ejemplos más conocidos de hallazgos de nuevos usos de un fármaco, es el Ácido Acetilsalicílico, el cual se empleó originalmente como antiinflamatorio, luego como analgésico, antipirético y, recientemente, se descubrieron sus efectos antiplaquetarios, como protección cardiovascular (3). Pero no es el único, el Dextrometorfano, el Metrotexato, la Gabapentina, la Talidomida, entre otros, son también fármacos que presentan efectos fuera de indicación ("off-label") comprobados (4).

La Metformina, una biguanida, tiene un gran potencial pleiotrópico, es muy utilizada como agente antidiabético oral, ya que probó ser segura y efectiva (5). Dicho efecto es producido por su acción sobre diferentes dianas moleculares.

Estudios clínicos a gran escala, han reportado que la Metformina mejora la función endotelial (6), disminuye la mortalidad y las complicaciones cardiovasculares de la DM tipo 2, como la aterosclerosis (7), incluso algunos datos preclínicos proponen 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).

A pesar de que estos estudios han sido realizados in vitro y avocados a procesos crónicos, es posible inferir que la Metformina también tenga una acción antiinflamatoria en un evento agudo, mediado posiblemente por la inhibición indirecta de NF- κ , el cual se activa por muchos de los factores que participan en la respuesta inflamatoria; como consecuencia, origina la expresión coordinada de diferentes genes que codifican proteínas, como citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión y enzimas implicadas en la iniciación y permanencia de la respuesta inflamatoria (10). El principal beneficio que habría al 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 de la Metformina en personas sanas, podría constituir una opción prometedora para tratar la inflamación tanto crónica como aguda.

Esta investigación, siguiendo el modelo experimental del test de formalina, determinó la actividad antiinflamatoria de la Metformina, así como la dosis óptima, en un evento agudo de inflamación en roedores.

MATERIAL Y MÉTODOS

DISEÑO DE ESTUDIO

El tipo de estudio fue exploratorio, analítico, cuasi-experimental de un ciego, realizado en el Centro de Investigación de Medicina Tradicional y Farmacología, de la Facultad de Medicina Humana, de la Universidad de San Martín de Porres (FMH-USMP); durante el periodo Julio a Noviembre del año 2011.

POBLACIÓN DE ESTUDIO

MUESTRA BIOLÓGICA: La población de estudio fueron 42 ratas albinas hembras (Wistar), cuyos pesos oscilaron entre 170 – 250 gramos. Estos se adquirieron en el Instituto Nacional de Salud (INS - Bioterio Chorrillos Lima – Perú), y haciendo uso del método de la moneda sesgada fueron distribuidos al azar en seis grupos de siete ratas cada uno, siendo rotuladas por medio de marcas de tinta en su respectivo grupo.

Fueron acondicionados en las instalaciones del Bioterio de la Facultad de Medicina Humana de la USMP, aislados en jaulas a una temperatura de 22°C (+/-3) con una humedad promedio de 45 – 70%, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas, con acceso libre a agua, y se les proporciono alimento balanceado, en cantidades de 5gr por ratón, 2 veces al día. El día previo al experimento, se les retiro el alimento, y quedaron con agua ad libitum.

MUESTRA QUÍMICA: Diclofenaco ampollas de 75mg/3ml, lote: 131109 con registro sanitario N° EG-4045 y con fecha de vencimiento 11/13; agua estéril para inyección de 5 ml, lote: 100903 con registro sanitario N° E-1192-G y con fecha de vencimiento 09/2013; Metformina tabletas de 500 mg lote 10765420 con registro sanitario NG-3918 y con fecha de vencimiento Julio del 2012, en solución acuosa al 10% y Formalina en solución al 5%.

PROCEDIMIENTOS

Para evaluar el posible efecto analgésico y antiinflamatorio agudo de la Metformina, se utilizó el modelo del Test de formalina (1). Para lo cual los grupos experimentales formados fueron los siguientes: Grupo N° 01: Control Positivo (Diclofenaco, 8 mg/kg, vía intraperitoneal), después de 30 minutos recibió 50 μ l de formalina al 5% vía subcutánea. Grupo N° 02: Control

Negativo (formalina al 5%, 50 μ l, vía subcutánea). Grupo N° 03: Placebo (agua destilada, 0.2 ml/100 g, vía oral). Además se le administro 50 μ l de formalina al 5% vía subcutánea. Grupo N° 04: Metformina (100mg/Kg, por vía oral) y luego de 30 minutos se le administro 50 μ l de formalina al 5% vía subcutánea. Grupo N° 05: Metformina (200mg/Kg, por vía oral) y luego de 30 minutos se le administro 50 μ l de formalina al 5% vía subcutánea. Grupo N° 06: Metformina (300mg/Kg, por vía oral), y luego de 30 minutos se le administro 50 μ l de formalina al 5% vía subcutánea.

En el test, se distinguen dos fases: Fase 1, indicativa de dolor neurogénico (primeros 5 min), y Fase 2, indicativa de dolor inflamatorio (15 a 30 min después de la administración de la formalina). El modelo se aplicó con un grupo experimental, a la vez, para lo cual se colocaron las ratas en contenedores de observación de vidrio de 20x30x20 cm con espejos de 30x30 cm adheridos a 3 de sus paredes con el fin de facilitar la observación, donde permanecían 30 minutos con el propósito de permitirles acostumbrarse al entorno.

Una vez transcurridos los 30 minutos, las ratas fueron removidas para la inyección subcutánea de 50 μ l de formalina (solución diluida de formaldehído al 5%) en la región dorsal de su pata trasera izquierda empleando una aguja No. 30, induciendo de esta forma el estímulo doloroso.

Después de la inyección de formalina, las ratas fueron colocadas, nuevamente, al interior de los contenedores, manifestándose en ellas, una conducta dolorosa o nociceptiva, expresada en forma de sacudidas de la pata izquierda acompañada de lamidas correspondientes a la Fase 1, y posteriormente se evidenciaría la Fase 2.

Para evaluar ambas fases, se realizó a un ciego, se designaron dos observadores por cada animal que registraron el tiempo y número de lamidas, haciendo uso de un cronómetro, así como también las observaciones particulares de cada animal que podrían haber alterado los resultados, todo esto señalado en fichas rotuladas para cada animal. Se monitoreó, en forma constante, la temperatura y humedad, haciendo uso de un instrumento, requiriéndose de calefactores para propiciar las condiciones adecuadas.

La metformina se administró a 3 grupos en dosis de 100, 200 y 300 mg/kg en solución acuosa al 10%, 60 minutos antes de la inyección de la formalina; se ajustaron estas dosis en base a recomendaciones recopiladas (12) y el grupo control placebo recibió 0.2 ml/100 g, ambas por vía oral con la ayuda de una cánula; mientras que al control positivo se le aplicó Diclofenaco 8 mg/kg por vía intraperitoneal 15 minutos antes de inyectarle la formalina y finalmente al control negativo se le administró sólo la formalina.

Los insumos fueron administrados a un ciego, disminuyéndose de esta forma el sesgo. El tiempo total de cada ensayo fue de 60

minutos y se realizaron entre las 9:00 y 16:00 horas. Para minimizar la variabilidad circadiana y también posibles variaciones en la sensibilidad al dolor por factores rítmicos endógenos, se trabajó siempre en el mismo intervalo horario. Cada rata fue utilizada solamente una vez y fueron sacrificadas mediante dislocación cervical.

ÉTICA E INVESTIGACIÓN

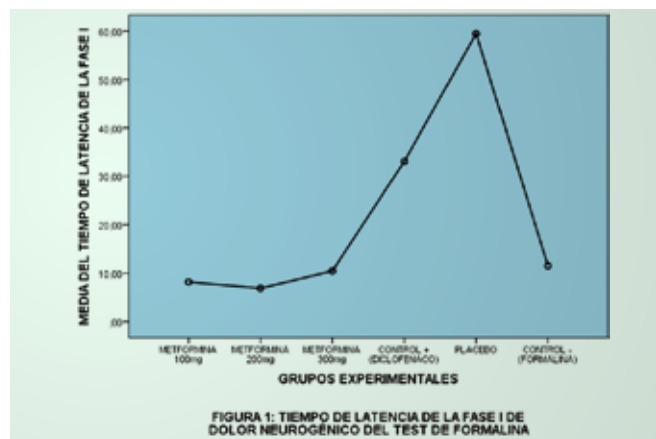
Seguimos los lineamientos del International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animal (1985) y de la Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals (IASP) (13), en las que se refiere que las investigaciones con modelos de dolor tienen que tener una adecuada planificación con la intención de minimizar el sufrimiento del animal, ya que el animal no es un objeto para explotar, sino un ser vivo. En tal sentido, se consideró que la investigación se debía ejecutar cuando los resultados fueran de utilidad para los humanos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos se han expresado como mediana \pm error estándar. Se determinó la relación entre los grupos mediante el test de ANOVA de una vía. Para todo esto, se usó como soporte informático los programas estadísticos IBM SPSS Statistics v.20 y GraphPad Prism Versión 5.01.

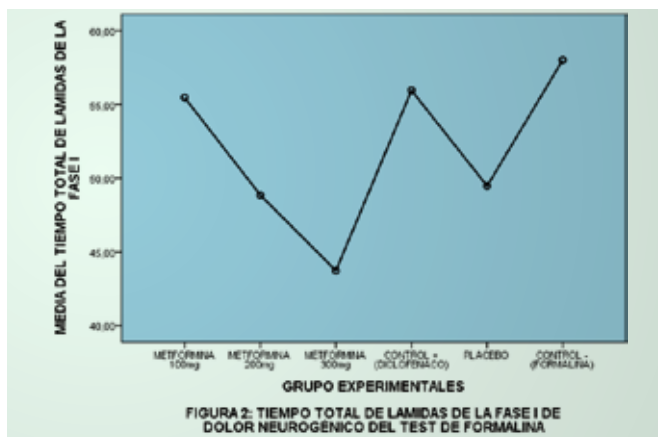
RESULTADOS

Efecto de la Metformina sobre el periodo de latencia en la fase I de dolor neurogénico del Test de Formalina.- La Metformina a dosis de 100, 200 y 300 mg/kg, generaron periodos de latencia de 8,16; 6,85 y 10,44 segundos, frente a 33,06 segundos de Diclofenaco (8mg/kg), 59,45 segundos con el placebo, y 11,52 segundos con formalina (control negativo). El test de ANOVA de una vía, reveló un valor $p > 0.05$ (0,25). (Figura 1)



Efecto de la Metformina sobre el tiempo de lamidas en la fase I de dolor neurogénico en el Test de Formalina.-

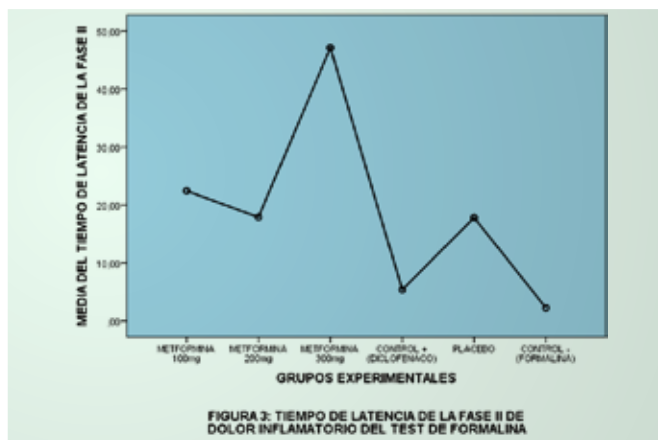
La Metformina a dosis de 100, 200, y 300 mg/Kg, produjo un tiempo de lamida de 55,46; 48,85 y 43,72 segundos, frente a 55,96 segundos de Diclofenaco (8mg/kg), 49,46 segundos con placebo (agua destilada), y 58,01 segundos con formalina (control negativo). El test de ANOVA de una vía reveló un valor $p > 0.05$ (0,96). **(Figura 2)**



Efecto de la Metformina sobre el tiempo de latencia en la fase II de dolor inflamatorio en el Test de Formalina.-

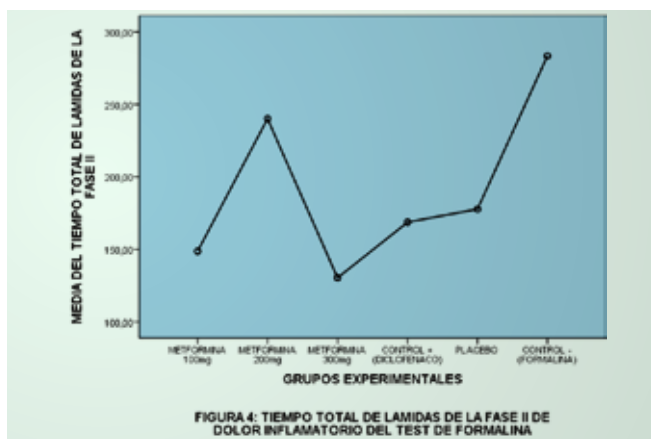
La Metformina a dosis de 100, 200, y 300 mg/Kg, presentaron 22,40; 17,88 y 47,10 segundos, frente a 5,37 segundos de Diclofenaco (8 mg/kg), 17,80 segundos el placebo (agua destilada), y 2,21 segundos con formalina (control negativo). El test de ANOVA de una vía reveló un valor $p=0,003$.

(Figura 3)



Efecto de la Metformina sobre el tiempo de lamidas en la fase II de dolor inflamatorio en el Test de Formalina.-

La Metformina a dosis de 100, 200, y 300 mg/kg, presentó un tiempo de lamidas de 148,71; 240,07 y 130,47 segundos, frente a 168,73 segundos de Diclofenaco (8 mg/Kg), 177,75 segundos con placebo (agua destilada), y 283,36 segundos con formalina (control negativo). El test de ANOVA de una vía reveló un valor $p=0.003$



DISCUSIÓN

En este estudio se evaluó a la metformina mediante el modelo experimental del test de formalina, el cual consta de dos fases, la primera indicativa de dolor neurogénico y la segunda, de dolor inflamatorio.

La primera fase es originada por la acción directa de la formalina sobre los nociceptores, con liberación inmediata, pero mínima, de mediadores químicos (14), al evaluar la metformina en esta situación, se comprobó la ausencia de efecto analgésico significativo. Hecho que es congruente con la nula evidencia científica encontrada en la bibliografía sobre el efecto a nivel periférico o central en la vía del dolor, de dicho fármaco.

Por otro lado la segunda fase es generada por eventos centrales y periféricos, en los cuales se vuelve más importante la liberación de mediadores inflamatorios como: prostaglandinas, leucotrienos, citocinas, moléculas de adhesión, entre otros, para iniciar y mantener el dolor inflamatorio (14).

En este último contexto se evidenció el efecto antiinflamatorio estadísticamente significativo de la Metformina, debido a la prolongación del periodo de latencia y disminución del tiempo de lamida, en comparación con los grupos controles (Figuras 3 y 4). Se evaluaron dosis de 100, 200 y 300mg/Kg siendo esta última la que mayor efecto antiinflamatorio presentó, con un menor tiempo de lamida (130,47 seg.) seguido de la dosis de 100mg/Kg (148,71 seg.).

Estos datos corroboran la propiedad antiinflamatoria demostrada en otro estudio (12), en el que mediante un modelo de enfermedad intestinal inflamatoria, hallaron una reducción significativa de la severidad de la inflamación en las ratas, expresado como la reducción de cambios en el peso del colon, el índice de daño macroscópico, la peroxidación lipídica, el óxido nítrico y la degranulación de mastocitos, con la consecuente disminución de mediadores inflamatorios. Cabe resaltar que este modelo

experimental evaluó a la Metformina en un evento crónico de inflamación, a diferencia del nuestro que se trató de una situación aguda.

Posiblemente el mecanismo molecular que explicaría este hecho, estaría basado en la inhibición de algunos factores de transcripción que regulan la síntesis de mediadores pro-inflamatorios. Dentro de los cuales se encontrarían el NF- κ B y el factor Egr-1.

Con respecto al primero, ya figuran en la bibliografía, estudios in vitro que demuestran que la Metformina interfiere con la activación del factor nuclear κ B (NF- κ B) posiblemente por secuestro citoplasmático, potenciando la acción del I κ B. De esta manera inhibe la síntesis de sVCAM, sICAM, vWF, IL-1, IL-6, IL-8 y TNF α (15,16,17,18).

Además, la vía del Egr-1, un potente modulador de la actividad transcripcional de genes proinflamatorios como la IL-2, TNF α y prostaglandinas en linfocitos T y macrófagos, también se encontraría inhibida (19). Lo interesante es que este factor de transcripción puede interactuar con otros como lo es el NF- κ B, para regular la expresión génica y mantener el estado inflamatorio (20), por lo que posiblemente se de una inhibición conjunta de ambos factores.

Cabe resaltar que de las dosis evaluadas, la de 300 mg/kg fue superior a la de 100 mg/kg, lo que nos sugiere una posible actividad antiinflamatoria tipo dosis/efecto. La dosis 200mg/Kg presentó una marcada elevación del tiempo de lamidas (240,07 seg.), pero no mayor que el control negativo (283,36 seg.) (Figura 4). Hecho que contradice a los resultados obtenidos por Anand et al. (12), donde se comprobó un efecto antiinflamatorio, haciendo uso de esta dosis, pero en un modelo experimental de inflamación crónica. Sin embargo, esta disociación es atribuida a una mala administración de la formalina a dos roedores de este grupo, hecho que quedó registrado en las cartillas de observación que fueron empleadas durante la experimentación.

En tal sentido, el efecto negativo que podríamos estar observando en este estudio, lo tomamos con pinzas, y lo dejamos en el ámbito de elucidación en el futuro, asumiendo la innata posibilidad de sesgos que pudiesen haber generado estos resultados.

Algo también interesante en este estudio, fue la inserción de un grupo placebo, al que se le administró agua destilada, que siendo una sustancia inerte, no debería tener efecto biológico analgésico o antiinflamatorio, sin embargo, ambas actividades, se evidenciaron.

Especialmente en la primera fase del test, en la cual el tiempo de latencia generado por el placebo fue mayor que el obtenido con el control positivo (Diclofenaco 8mg/Kg) (Figura 3), este efecto placebo en el dolor, es algo comprobado en humanos, y que siempre debe considerarse, para evitar interpretaciones erradas, acerca de la actividad antinociceptiva de una sustancia; lo cierto

es que la magnitud de este efecto en humanos es muy variable, y van de la mano de la implicancia de esferas emocionales y de expectativas, comandadas por el sistema límbico y su relación al sistema opioide endógeno (21).

Con los resultados obtenidos en esta investigación, planteamos la necesidad de realizar una mayor cantidad de estudios con otros modelos experimentales específicos de inflamación, para corroborar los efectos y eficacia de la metformina como agente antiinflamatorio en un evento agudo; toda vez que de reproducirse resultados similares al nuestro, en otros experimentos, podríamos proyectarnos 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.

Concluimos que la administración de Metformina a dosis de 100 mg/kg y 300 mg/kg, presenta efecto antiinflamatorio agudo en rata albina mediante el test de formalina.

Asimismo, la mayor eficacia antiinflamatoria fue obtenida con dosis de 300 mg/kg de Metformina.

Correspondencia:

José Montes Alvis

Dirección: Av. Morales Duarez 2829, Cercado de Lima.

Teléfono: (51 1) 451-9280

Correo electrónico: jfalcon92@hotmail.com

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. Shoichet, B.; Roth B.; Keiser, M.; Setola V. Predicting new molecular targets for known drugs. *Nature Chemical Biology* 2009; 462, 175–182.
3. 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.
4. Sirven, Joseph I. New Uses for Older Drugs: The Tales of Aspirin, Thalidomide, and Gabapentin. *Mayo Clinic Proceedings* 2010; 85(6):508-511.
5. Violante Ortiz, Rafael. Uso de metformina en diabetes tipo 2, Secretaría de salud ISSA, 2002:21-24.
6. Hattori Y, Suzuki K, Hattori S, and Kasai K (J) 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 metformin 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; 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. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *oncogene.* 2006; 25(51):6680-4.
11. Bannon, A. W. 2001. Models of Pain: Hot-Plate and Formalin Test in Rodents. *Current Protocols in Pharmacology.* 00:5.7.1–5.7.11.
12. Anand P, Sunita J. Papel de la metformina en una enfermedad inflamatoria intestinal inducida experimentalmente. *Ars Pharm* 2008; 49 (4): 267-281.
13. IASP. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 1980;16:109-10
14. Puig, S. and Sorokin, L.S. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain,* 1995. 64:345-355.
15. 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-kB in Human Vascular Wall Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:611-617.
16. Deans KA, Sattar N. "Anti-Inflammatory" drugs and their effects on type 2 diabetes. *Diabetes Technol Ther.* 2006 Feb;8(1):18-27.
17. 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.
18. Gómez-García A, Martínez G, Ortega-Pierres Luz, Rodríguez-Ayala E y Álvarez-Aguilar C. Rosuvastatina y metformina reducen la inflamación y el estrés oxidativo en pacientes con hipertensión y dislipidemia. *Rev Esp Cardiol.* 2007 Dic; 60(12):1242-9.
19. 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; (10)1124.
20. Bochkov VN, Mechtcheriakova D, et al. Oxidized phospholipids stimulate tissue factor expression in human endothelial cells via activation of ERK/EGR-1 and Ca⁺⁺/NFAT. *Blood* 99(1):199-206.
21. Zubieta, J. Stohler C. Neurobiological Mechanisms of Placebo Responses. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1156: 198-210.