

RESEARCH / INVESTIGACIÓN

Exploración de la actividad antibacteriana de Metformina frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*

Exploration of the antibacterial activity of Metformin against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*

Pool Marcos-Carbajal^{1,2}, Christian Allca-Muñoz^{2,3}, Ángel Urbano-Niño², Alberto Salazar-Granara^{2,4}

DOI. 10.21931/RB/2020.05.04.9

Resumen: El objetivo del estudio es determinar la actividad antibacteriana de Metformina frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se evaluó la actividad antibacteriana mediante la técnica de Kirby Bauer. Se utilizó cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), las cuales se expusieron a Metformina en concentraciones de 250 mg y 500 mg, Ciprofloxacino (CIP) 5 µg, Imipenem (IPM) 10 µg, y Cefoxitin (FOX) 30 µg. Frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* se presentó un halo de inhibición de 6 mm. para Metformina 250 mg, 6 mm. para Metformina 500 mg, y un halo de inhibición >25 mm. con el uso de Ciprofloxacino 5 µg, Cefoxitin 30 µg, e Imipenem 10 µg respectivamente. En conclusión, *In vitro* Metformina a dosis de 250 y 500 mg, no presentó efecto antibacteriano frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Palabras clave: Antibacterianos, Metformina, prueba de sensibilidad microbiana.

Abstract: The aim of this study was to determine the antibacterial activity of Metformin against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Antibacterial activity was evaluated using the Kirby Bauer technique. Strains of *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) were used, which were exposed to Metformin at a concentration of 250 mg and 500 mg, Ciprofloxacin (CIP) 5 µg, Imipenem (IPM) 10 µg, and Cefoxitin (FOX) 30 µg. Regarding *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*, an inhibition halo of 6 mm was presented for Metformin 250 mg, 6 mm. for Metformin 500 mg, and an inhibition halo > 25 mm. with the use of Ciprofloxacin 5 µg, Cefoxitin 30 µg, and Imipenem 10 µg respectively. In conclusion, *in vitro*, Metformin at doses of 250 and 500 mg had no antibacterial effect against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words: Antibacterial, metformin, microbial sensitivity test.

Introducción

Uno de los grandes descubrimientos del siglo XIX fue la terapia antibacteriana descubierta por Alexander Fleming en el año 1928¹. Así es como se iniciaría su uso en la clínica para diferentes intervenciones importantes para evitar enfermedades infecciosas. Sin embargo, aún en el siglo XXI muchas de estas enfermedades infecciosas siguen siendo causa de muerte en el mundo². Para el 2016 se identificó que las enfermedades infecciosas respiratorias encabezan la lista como la enfermedad transmisible con mayor letalidad en el mundo, seguida por enfermedades diarreicas³.

En el campo de los antibióticos, con la aparición de la resistencia a la actualidad, este representa un problema clínico considerable, debido a que las bacterias desarrollan la capacidad para sobrevivir en concentraciones de antibiótico que inhiben/matan a otras de la misma especie⁴. Capacidades como la resistencia a β-lactámicos en las bacterias Gram-negativas por la producción de β-lactamasas, y Gram-positivos desarrollaron resistencia por medio de modificaciones al sitio de acción de Proteínas Fijadoras de Penicilina (PBP)⁵.

Hoy en día una gran mayoría de cepas de *Staphylococcus aureus* han desarrollado resistencia a la Metilina, en España cerca del 25% de los aislamientos de hemocultivos presentan resistencia. Asimismo, *Pseudomonas aeruginosa* ha adquirido resistencia a una amplia gama de antibióticos como Piperacilina, Tazobactam, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, entre otros⁶.

Para el año 2017 patógenos como *Enterobacterias* y *Pseudomonas aeruginosa* fueron clasificadas en el nivel de prioridad crítico para la búsqueda de nuevas drogas antibacterianas, al igual con *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter*, *Salmonella* y *Neisseria gonorrhoeae* con un nivel de prioridad alto⁷.

Todo esto resulta un grave problema, debido a que las industrias farmacéuticas poco a poco van dejando los proyectos propuestos como el desarrollo de nuevos fármacos contra bacterias resistentes o le dedican una escasa cantidad de recursos a la investigación de nuevos antibióticos. Esto se debe a que existe una baja rentabilidad de estos fármacos en comparación con otros fármacos que atacan enfermedades de mayor índice mundial como la diabetes⁸.

Actualmente, solo 5 laboratorios se dedican al estudio de nuevos fármacos antibacterianos⁹. En 1998 había en el mercado mundial de 20 nuevos antibióticos y en el 2011 había únicamente 4, es decir una disminución de un 75% en la disponibilidad de nuevos antibióticos¹⁰. Sin embargo, la resistencia a cada antibiótico utilizado en la práctica clínica se ha incrementado, con independencia de la clase química molecular de la droga¹¹.

Una estrategia para la búsqueda de nuevos antibióticos, es buscar el efecto pleiotrópico de drogas conocidas y en actual uso clínico terapéutico. Es el caso de la Metformina, un medicamento común utilizado en primera línea en el tratamiento de

¹ Universidad Peruana Unión, Escuela Profesional de Medicina Humana, Laboratorio de Investigación en Biología Molecular, Perú.

² Universidad San Martín de Porres, Facultad de Medicina Humana, Centro de Investigación de Medicina Tradicional y Farmacología, Perú.

³ Universidad San Martín de Porres, Facultad de Medicina Humana, Centro de Investigación de Medicina Tradicional y Farmacología, Perú.

⁴ Sociedad Peruana de Farmacología y Terapéutica Experimental - SOPFARTEX.

Corresponding author: poolmarcos@upeu.edu.pe

la Diabetes Mellitus tipo II. Resulta interesante el antecedente de un estudio de medicina traslacional que prueba cómo la Metformina actúa inhibiendo un factor de resistencia de *Mycobacterium tuberculosis*, proponiéndose un potencial efecto contra este patógeno^{12,13}.

El propósito del presente trabajo fue investigar la actividad antibacteriana de la Metformina sobre cepas ATCC de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Materiales y métodos

Diseño y población de estudio

Estudio es de tipo experimental *in vitro*. El Estándar de clorhidrato de Metformina (material de referencia certificado) fue adquirido por la empresa Sigma-Aldrich con certificado de análisis (Producto número: PHR 1084) y proporcionado por el Centro de Investigación en Medicina Tradicional y Farmacología). La parte microbiología fue realizada en los Laboratorios de Investigación en Biología Molecular de la Escuela Profesional de Medicina Humana de la Universidad Peruana Unión. Se utilizaron cepas bacterianas ATCC (American Type Culture Collection, Microbiologics, St. Cloud, Minnesota USA) *Escherichia coli* 25922, *Staphylococcus aureus* 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* 27853. Se utilizó los siguientes discos de antibióticos (Bioanalyse, İvedik Osb/Yenimahalle, Turquía), Ciprofloxacino (CIP) 5 µg, Imipenem (IPM) 10 µg y Cefoxitin (FOX) 30 µg.

Resuspensión del Estándar de Metformina

Se pesó con precisión 12.5 mg y 25 mg de Metformina (fármaco crudo) y se disolvieron en 0,5 ml de metanol para obtener la concentración de 250 µg / 10 µl y 500 µg / 10 µl.

Fase microbiológica

Se verificó la viabilidad de cada uno de los microorganismos a ensayar, para la preparación del inóculo se partió de un cultivo de 18 a 24 h en ATS (Agar Trypticase Soya) para bacterias a 37°C. A partir de estos cultivos en crecimiento activo, se tocan tres a cinco colonias y se resuspenden en 5 mL de solución salina estéril (NaCl 0,85%). El resultado de la suspensión se homogeneizó durante 15 segundos y su turbidez se ajustó a 0,5 de la escala Mc Farland (1.5 x 10⁸ ufc/ml). La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer *et al.*¹⁴. Se procedió a impregnar cada papel-disco estéril de 6 mm de diámetro (papel filtro Whatman #4) con 10 µL de cada concentración de 250 µg y 500 µg de Metformina. El estándar de Metformina y se dejó secar el papel-disco para permitir su evaporación.

Se sembraron en placas de Petri con Agar Müller-Hinton (AMH) sobre la superficie de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922 respectivamente. Se hisoparon uniformemente y se incubaron en una estufa a 37 °C de temperatura durante 24 horas. Además, se colocó como control negativo un disco de papel Whatman #4 con 10 µL de agua destilada y como control positivo se usó imipenem en concentración de 10 mcg, cefoxitina en concentración de 10 mcg y ciprofloxacino en concentración de 5 mcg¹².

Al final del período, las zonas de inhibición formadas se midieron en milímetros usando el vernier. Las zonas de inhibición de menos de 12 mm de diámetro no se consideraron para el análisis de la actividad antibacteriana. Para cada concentración, se realizaron 6 réplicas.

Análisis estadísticos

Se presenta los resultados mediante gráficos de barras, expresados mediante valores absolutos. Se empleó como soporte informático el programa Microsoft Excel Versión 2010.

Resultados

En este estudio se utilizó como parámetro de medición el diámetro de la zona de inhibición (mm) para evaluar la propiedad antimicrobiana del medicamento Metformina. La dilución del estándar de Metformina fue enfrentada contra *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. La zona de inhibición fue de 6 mm (resistente) para todas cepas bacterianas y para el control negativo. También se utilizaron controles positivos que produjeron un halo de inhibición de > 25 mm (sensible) para cada ensayo con 6 repeticiones de cada uno de ellos (Ver Figuras 1, 2, 3). El fármaco Metformina no mostró actividad antimicrobiana a 250 µg/ µL y 500 µg/ µL.

Discusión

Entre los principales patógenos que destaca la OMS para la investigación de nuevos antibióticos para combatir esta enfermedad, están la *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y enterobacterias multidrogaresistentes⁷. Hoy en día existen laboratorios aun investigando nuevos antibióticos, pero solo dos de estos presentan una actividad frente a bacterias Gramnegativas multiresistentes y otras se encuentran aún en la fase clínica uno, categorizada como "posible agente activo"¹⁵. Después de la aparición de estos patógenos resistentes a múltiples drogas, la investigación de nuevas alternativas de antibioticoterapia ha llevado al reconocimiento del potencial de drogas antibacterianas conocidas como por ejemplo para el tratamiento de pacientes con diabetes que es la Metformina^{12,16}.

Es así como surge evidencia científica que logra demostrar que la Metformina podría presentar un efecto sobre el desarrollo de una mejoría en la inmunidad innata¹⁷. Diferentes tipos de bacterias afectan las vías respiratorias, sin embargo, el uso de Metformina logró disminuir la hiperglucemia inducida por *Pseudomonas aeruginosa*¹⁸. Aumentando la resistencia eléctrica transepitelial, es otro mecanismo como la Metformina logra disminuir la hiperglucemia inducida por *Staphylococcus aureus*, ya que esta como principal función tiende a disminuir la resistencia eléctrica transepitelial para lograr el flujo de glucosa paracelular¹⁹.

Por otra parte, diferentes estudios demostraron que el uso de Metformina en dosis de 250 mg, 300 mg, 400 mg y 500 mg reveló tener un efecto contra las diferentes cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger*²⁰⁻²² (Tabla 1).

Estudios adicionales han demostrado también lograr una inhibición del crecimiento bacteriano induciendo la inactivación de receptores como LasR y rhlR que desencadenan a la producción de piciocianina, hemolisina, proteasas y elastasas que confieren a la *Pseudomonas aeruginosa* su capacidad de motilidad y resistencia frente al estrés oxidativo²³. Incluso el uso de nanotubos de carbono en adición con metformina logró presentar una actividad inhibitoria frente a *Escherichia coli*²⁴.

Sin embargo, los resultados del presente estudio demostraron que el estándar de Metformina en concentraciones de 250 µg y 500 µg no mostró una actividad antibacteriana con-

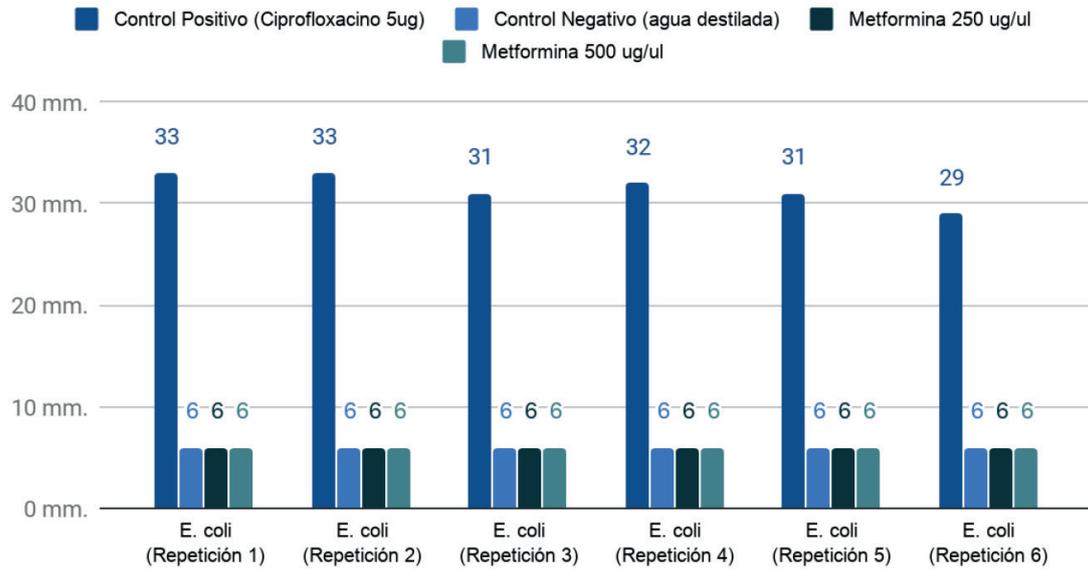


Figura 1. Actividad antibacteriana obtenida de estándar de Metformina frente a cepa de *Escherichia coli* ATCC25922.

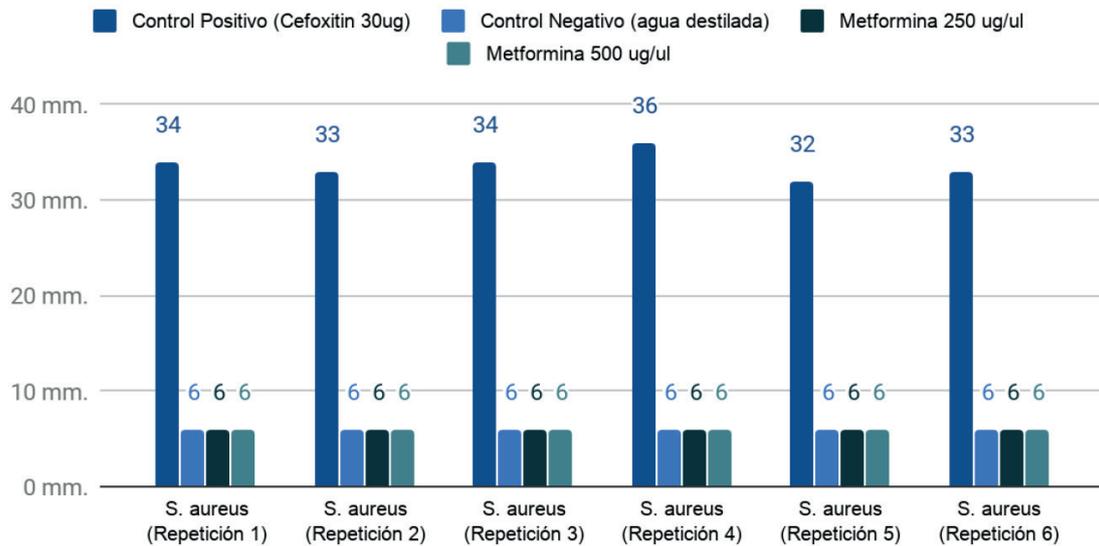


Figura 2. Actividad antibacteriana obtenida de estándar de Metformina frente a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC25923.

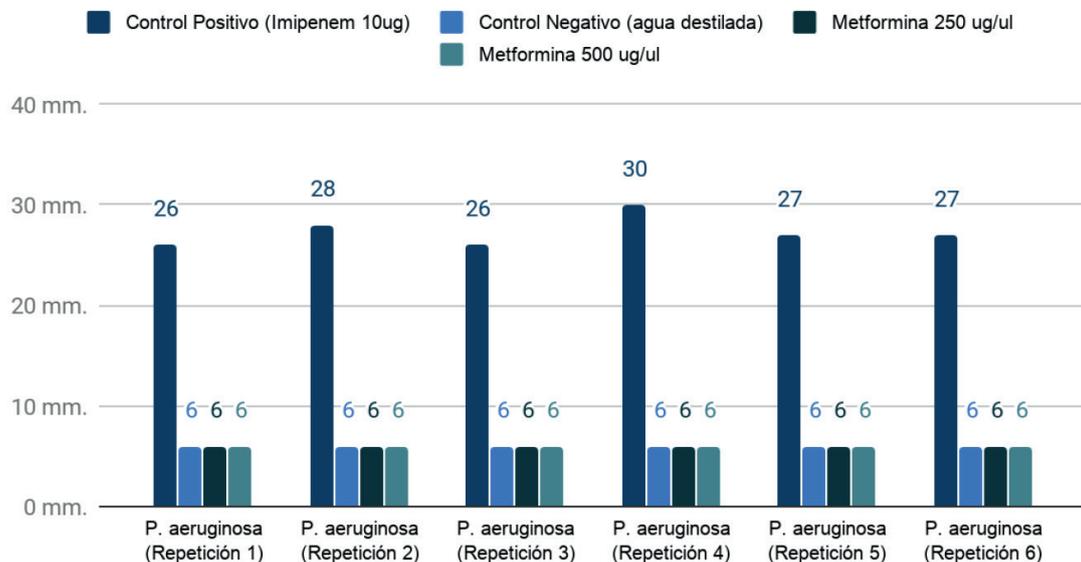


Figura 3. Actividad antibacteriana obtenida de estándar de Metformina frente a cepa de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853.

Metformina	En este estudio		Nasrin et al. ²⁰		Meherumisa et al. ²¹		Dash et al. ²²	
	250mg	500mg	250mg	500mg	250mg	500mg	300mg	400mg
<i>Escherichia coli</i>	6 mm.	6 mm.	13 mm.	15 mm.	13 mm.	15 mm.	5 mm.	11 mm.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 mm.	6 mm.	11 mm.	13 mm.	11 mm.	13 mm.	9 mm.	12 mm.
<i>Staphylococcus aureus</i>	6 mm.	6 mm.	9 mm.	12 mm.	9 mm.	12 mm.	6 mm.	7 mm.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	11 mm.	13 mm.	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	12 mm.	14 mm.	12 mm.	14 mm.	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	14 mm.	17 mm.	14 mm.	17 mm.	-	-

Tabla 1. Actividad antibacteriana de Metformina frente a diferentes patógenos.

tra las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y por lo tanto no tendría acción inhibitoria contra diferentes organismos que se sabe que son resistentes a múltiples fármacos.

Los estudios citados arriba no describen el uso de cepas ATCC (solo se mencionan nombre de especies bacterianas y fúngicas) en sus procedimientos de trabajo. Es posible que los resultados obtenidos en nuestro estudio difieren con tales publicaciones por el uso de cepas no catalogadas como cepas ATCC.

Estos hallazgos son importantes, porque categóricamente se descarta el efecto bactericida de la Metformina, y aunque los antecedentes son favorables para un potencial efecto antibacteriano, ante la evidencia, puede ser más sensato el dilucidar su uso como un fármaco coadyuvante con la terapia antibiótica. Los efectos pleiotrópicos de Metformina al modular la inmunidad (estimulación)^{25,26}, y la actividad antiinflamatoria^{25,27}, ambos mecanismos (inmunosupresión e inflamación) son fisiopatológicamente favorables para la progresión de la patogenicidad de las bacterias como, *Trichinella spiralis*²⁸, *Caenorhabditis elegans*^{29,30}, *hepatitis B virus*³¹, *hepatitis C virus*^{32,33}, *M. tuberculosis*^{13,34}. Por ello una gran iniciativa es contribuir aún más en la investigación de drogas de segundo uso o la elaboración de nuevos fármacos que puedan tener la capacidad de inhibir o destruir las bacterias que cuentan con una mayor tasa de resistencia y lograr reducir la letalidad a nivel mundial.

Limitaciones

Entre las limitaciones del estudio está solo la exposición a las 3 bacterias ATCC ensayadas, no incluyendo a otras bacterias y hongos no ATCC, siendo este estudio como base para investigaciones posteriores que utilicen cepas bacterianas resistentes hospitalarias. También el tipo de procedimiento no detallado usado por diversos autores para obtener el estándar de metformina.

Conclusiones

En la presente investigación, se demuestra que Metformina en concentraciones de 250 mg y 500 mg no presentó efecto bactericida frente a *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

Agradecimientos

Los autores agradecen al Centro de Investigación en Medicina Tradicional y Farmacología (CIMTFAR) de la Facultad de Medicina Humana Universidad San Martín de Porres (USMP) por proporcionar el estándar de Metformina. Al Laboratorio de Investigación en Biología Molecular (LIBM) de la Es-

cuela Profesional de Medicina Humana la Universidad Peruana Unión (UPeU) por permitir la parte experimental con la metodología de Kirby Bauer con las cepas bacterianas ATCC. A las autoridades de ambas instituciones Dr. Frank Lizaraso Caparó y Dr. Roger Albornoz Esteban por el apoyo y licencias para el desarrollo de la investigación.

Contribuciones de autoría

P. Marcos, A. Salazar han participado en la concepción y diseño del artículo. Los procedimientos y resultados fueron realizados por P. Marcos y A. Urbano. Los análisis y discusiones fueron realizados por P. Marcos, Allca C., A. Salazar. La redacción del artículo estuvo a P. Marcos, A. Salazar. La revisión crítica la realizó A. Salazar. La versión final estuvo a cargo de P. Marcos, A. Salazar.

Fuentes de financiamiento

Facultad de Medicina Humana de la Universidad San Martín de Porres (USMP) / Escuela Profesional de Medicina Humana de la Universidad Peruana Unión (UPeU).

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Referencias bibliográficas

1. Acuña L Guillermo. Evolución de la terapia antimicrobiana: lo que era, lo que es y lo que será. Rev. chil. infectol. [Internet]. 2003 [citado 2020 Mayo 19]; 20(Suppl 1): 7-10. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182003020100001&lng=es.
2. Basak S, Kumar K, Ramalingam M. Design and release characteristics of sustained release tablet containing metformin HCl. Revista Brasileira de Ciências Farmacéuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2008. vol. 44, n. 3, jul./set.
3. OMS [internet]. USA: World Health of Organization; 24 de Mayo de 2018; [acceso 19 de Mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
4. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. J Antimicrob Chemother. 2001 Jul; 48 Suppl 1:5-16.
5. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. Microbiol Spectr. 2016 Apr;4(2):10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015. PMID: 27227291; PMCID: PMC4888801.
6. Katz M, Mueller L, Polyakov M, Weinstock S. Where have all the antibiotic patents gone? 2006. Nature Biotechnology volume 24 number 12 december
7. WHO [internet]. GENEVA: World Health of Organization; 27 de febrero 2017; [acceso 19 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

8. Huacuja F, Gomez M, Ortiz J, Soberanes B, Arevalo V, Morales E, Sanchez-Reyes L, Fanghanell G. Efecto de las estatinas más allá del colesterol. *Revista de Endocrinología y Nutrición*. 2006. Vol. 14, No. 2 abril-Junio pp 73-88
9. Ragnar S, Nord CE, Finch R. Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. *Lancet Infect Dis*. 2005; 5: 115-119
10. Moncayo A. La resistencia a los antibióticos y la falta de interés de la industria farmacéutica. *Infectio*. 2014. 18(2): 35-36
11. Keiser M, Setola V, Irwin J, Laggner C, Abbas A, Hufeisen S, Jensen N, Kuijter M, Matos R, Tran T, Whaley R, Glennon R, Hert J, Kelan, Thomas K, Edwards D, Shoichet B. and Roth B. Predicting new molecular targets for known drugs. *Nature*. 2009 November 12; 462(7270): 175-181. doi: 10.1038/nature08506.
12. Vashisht R and Brahmachari K. Metformin as a potential combination therapy with existing front-line antibiotics for Tuberculosis. *Journal of Translational Medicine* 2015;13:83 DOI: 10.1186/s12967-015-0443-y
13. Restrepo BI. Metformin: Candidate host-directed therapy for tuberculosis in diabetes and non-diabetes patients. *Tuberculosis (Edinb)*. 2016 Dec;101S:S69-S72.
14. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. <http://clsi.org/blog/2015/01/08/clsi-publishes-new-antimicrobial-susceptibility-testing-standards/>
15. WHO. Antibacterial Agents in Clinical Development. [internet]. 2017.11. Geneva. September 2017; [acceso 19 de mayo 2020]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/10665/258965/1/WHO-EMP-IAU-2017.11-eng.pdf?ua=1>
16. Yew WW, Chang KC, Chan DP, Zhang Y. Metformin as a host-directed therapeutic in tuberculosis: Is there a promise? *Tuberculosis (Edinb)*. 2019 Mar;115:76-80. doi: 10.1016/j.tube.2019.02.004. Epub 2019 Feb 13. PMID: 30948180.
17. Xiao Y, Liu F, Li S, et al. Metformin promotes innate immunity through a conserved PMK-1/p38 MAPK pathway. *Virulence*. 2020;11(1):39-48. doi:10.1080/21505594.2019.1706305
18. Patke WR, Carr G, Baker EH, Baines DL, Garnett JP. Metformin prevents the effects of *Pseudomonas aeruginosa* on airway epithelial tight junctions and restricts hyperglycaemia-induced bacterial growth. *J Cell Mol Med*. 2016;20(4):758-764. doi:10.1111/jcmm.12784
19. Garnett JP, Baker EH, Naik S, et al. Metformin reduces airway glucose permeability and hyperglycaemia-induced *Staphylococcus aureus* load independently of effects on blood glucose. *Thorax*. 2013;68(9):835-845. doi:10.1136/thorax-jnl-2012-203178
20. Nasrin F; et al. Study of Antimicrobial and Antioxidant potentiality of Anti-diabetic drug Metformin. 2014 Vol: 2 Issue:3 Page:220-224
21. Meherunisa; Sapna J; Vikas S. Study of Metformin Effect on Antimicrobial Property. *International Archives of BioMedical And Clinical Research*. 2018 Vol 4.Issue 3.July
22. Dash, Arun & Pattanaik, BirendraKumar & Behera, SangeetaRani & Palo, AmiteshKumar. (2011). Study of antimicrobial property of some hypoglycemic drugs. *Chronicles of Young Scientists*. 2. 219.
23. Abbas HA, Elsherbini AM, Shaldam MA. Repurposing metformin as a quorum sensing inhibitor in *Pseudomonas aeruginosa*. *Afr Health Sci*. 2017 Sep;17(3):808-819.
24. Azizian J; Hekmati M. Functionalization of multi-wall carbon nanotubes with Metformin derivatives and study of their antibacterial activities against *E-Coli* and *S. aureus*. *Journal of Nanoanalysis* No. 03, Issue 03 (2016) 76-85
25. Cameron AR, Morrison VL, Levin D, et al. Anti-Inflammatory Effects of Metformin Irrespective of Diabetes Status. *Circ Res*. 2016;119(5):652-665. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.308445
26. Cha JH, Yang WH, Xia W, et al. Metformin Promotes Antitumor Immunity via Endoplasmic-Reticulum-Associated Degradation of PD-L1. *Mol Cell*. 2018;71(4):606-620.e7. doi:10.1016/j.molcel.2018.07.030
27. Joseph Sánchez-Gavidia, Carlos Pante-Medina, Elmer Lujan-Carpio, Alberto Salazar-Granara. Efecto antinociceptivo y antiinflamatorio de la metformina en modelos experimentales en ratón. *Horiz. Med.* [Internet]. 2019 Jul [citado 2020 Jul 06];19(3):49-57. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-558X2019000300008&lng=es.
28. Othman AA, Abou Rayia DM, Ashour DS, et al. Atorvastatin and metformin administration modulates experimental *Trichinella spiralis* infection. *Parasitol Int*. 2016;65:105-112.
29. Onken B, Driscoll M. Metformin induces a dietary restriction-like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* Healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. *PLoS One*. 2010;5:e8758
30. Chen J, Ou Y, Li Y, et al. Metformin extends *C. elegans* lifespan through lysosomal pathway. *eLife*. 2017;6:e31268.
31. Xun YH, Zhang YJ, Pan QC, et al. Metformin inhibits hepatitis B virus protein production and replication in human hepatoma cells. *J Viral Hepat*. 2014;21:597-603
32. Yu JW, Sun LJ, Liu W, et al. Hepatitis C virus core protein induces hepatic metabolism disorders through down-regulation of the SIRT1-AMPK signaling pathway. *Int J Infect Dis*. 2013;17:e539-45.
33. Hsu CS, Hsu SJ, Lin HH, et al. A pilot study of add-on oral hypoglycemic agents in treatment-naïve genotype-1 chronic hepatitis C patients receiving peginterferon alfa-2b plus ribavirin. *J Formos Med Assoc*. 2014;113:716-721.
34. Zhang M, He JQ. Impacts of metformin on tuberculosis incidence and clinical outcomes in patients with diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Pharmacol*. 2020 Feb;76(2):149-159.

Received: 10 agosto 2020

Accepted: 20 septiembre 2020