ALEXANDRE ABILIO DE SOUZA TEIXEIRA

**Tratamento com metformina restaurou danos metabólicos causados
pela obesidade, mas induziu a resposta inflamatória hepática**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do grau de mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. José Cesar Rosa Neto

Versão corrigida. A versão eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertação da USP (BDTD).

São Paulo
2015

RESUMO

Teixeira ASS. Tratamento com metformina restaurou danos metabólicos causados pela obesidade, mas induziu a resposta inflamatória hepática. [Dissertação (mestrado em Biologia Celular e Tecidual)] – São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

A obesidade pode ser considerada uma doença imunometabólica, caracterizada por alterações metabólicas associadas a uma inflamação crônica de baixo grau, que está na gênese de outras co-morbidades associadas, como a doença do fígado gordo e a diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2). A metformina é uma droga hipoglicemiante utilizada como tratamento de primeira linha na DM2. Já, o fator de transcrição receptores ativados por proliferador de peroxissoma alfa (PPAR- α) tem um papel central no controle imunometabólico hepático. O objetivo do estudo foi avaliar os possíveis efeitos imunometabólicos da dieta rica em gordura (HFD), em camundongos C57BL6 (WT) e *knockout* para PPAR- α (KO) tratados com metformina. **Métodos:** Os animais foram submetidos a uma dieta balanceada (SD) ou a uma dieta hiperlipídica (HFD) durante 12 semanas e, faltando 10 dias para completar as 12 semanas de dieta, os animais foram tratados diariamente com metformina (M) ou PBS (gavagem - 300 mg/kg). Realizou-se o teste de tolerância à insulina (ITT) e teste de tolerância à glicose (GTT), cortes histológicos do fígado e corados por H&E, concentração de colesterol e triacilglicerol. Analisou-se a concentração da oxidação de palmitato no músculo esquelético. Além disso, verificou-se o conteúdo de citocinas por ELISA, no fígado, no tecido adiposo retroperitoneal, em hepatócitos e macrófagos intraperitoneal isolados. **Resultados:** A metformina foi capaz de diminuir o peso corporal e melhorar a tolerância à glicose dos animais WT submetidos a HFD. O tratamento com metformina aumentou a oxidação de palmitato no músculo esquelético, além de promover um efeito anti-inflamatório no tecido adiposo retroperitoneal e foi capaz de reverter a inflamação dos macrófagos intraperitoneais estimulados por LPS, porém no fígado e nos hepatócitos isolados, a metformina causou um efeito colateral, promovendo inflamação. **Conclusão:** Um curto tratamento com metformina restaurou as alterações metabólicas promovidas pela obesidade, independentemente do fenótipo. Contudo, a inflamação hepática foi induzida pelo tratamento, e o efeito principal se deve a um potencial aumento na inflamação induzida nos hepatócitos, já que os macrófagos intraperitoneais apresentaram uma resposta anti-inflamatória, assim como o tecido adiposo retroperitoneal.

Palavras-chave: Metformina. Imunometabolismo. NAFLD. Inflamação. PPAR- α . Metabolismo Celular.

ABSTRACT

Teixeira AAS. Metformin treatment restored metabolic damage caused by obesity, but induced liver inflammatory response. [Masters thesis (Cellular and Tissue Biology)] – São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2015.

The obesity is considered a immunometabolic disease, associated with a chronic low-grade inflammation, while it seems to be the genesis of other associated comorbidities, such as fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus (DM2). Metformin is a hypoglycemic drug used as first-line treatment in DM2. Since the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR- α) transcription factor plays a central role in controlling hepatic immunometabolic. Therefore, our objective was to evaluate the immunometabolic effects of high fat diet (HFD) in C57BL6 mice (WT) and PPAR- α knockout (KO) treated with metformin. **Methods:** The animals were submitted to a standard diet (SD) or a high fat diet (HFD) for 12 weeks, 10 days for lacking complete diet for 12 weeks, the animals were treated daily with metformin (M) or PBS (gavage - 300 mg / kg). It carried out the insulin tolerance test (ITT) and glucose tolerance test (GTT), histological sections of the liver and stained with H & E, cholesterol and triacylglycerol. It was analyzed the concentration of palmitate oxidation in skeletal muscle. Furthermore, it was found cytokine content by ELISA in liver, retroperitoneal adipose tissue, hepatocytes and intraperitoneal macrophages isolated. **Results:** Metformin was able to decrease body weight and to improvement in glucose tolerance the WT animals submitted to HFD. Treatment with metformin increased palmitate oxidation in skeletal muscle, in addition, metformin promoted an anti-inflammatory effect in the retroperitoneal adipose tissue and It was able to revert inflammation intraperitoneal macrophages stimulated by LPS, but in the liver and hepatocytes isolated, metformin caused a side effect, by lead to inflammation. **Conclusion:** A short treatment with metformin was able to promoted changes in immunometabolic response, we can emphasize that the treatment restored the metabolic alterations caused by obesity, regardless of phenotype. However, the hepatic inflammation was induced by the treatment, and the main effect is due to a potential increase in inflammation induced in the hepatocytes, since the intraperitoneal macrophages showed an anti-inflammatory response, as well as the retroperitoneal adipose tissue.

Keywords: Metformin. Immunometabolism. NAFLD. Inflammation. PPAR- α . Cell Metabolism.

1 INTRODUÇÃO

A obesidade representa um grave problema para a saúde pública e afeta não apenas os países de alta renda, como também países em desenvolvimento (WHO, 2013). Estudos epidemiológicos indicam que aproximadamente 69% da população dos Estados Unidos apresentam excesso de peso, sendo que 37% desses indivíduos são classificados na categoria sobrepeso ($25 \leq \text{IMC} \leq 30 \text{ kg/m}^2$), enquanto quase 32% são considerados obesos ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) (1). No Brasil, de 1974-1975 a 2008-2009, a prevalência de excesso de peso em adultos com mais de 20 anos aumentou em quase três vezes no gênero masculino, crescendo de 18,5% para 50,1% e em quase duas vezes no gênero feminino, de 28,7%, para 48,0%. No mesmo período, a prevalência de obesidade aumentou em mais de quatro vezes para homens, passando de 2,8% para 12,4% e em mais de duas vezes para mulheres, de 8,0% para 16,9% (2). Entre as crianças de 5 a 9 anos de idade, uma em cada três está acima do peso, sendo que 33,5% das crianças apresentavam excesso de peso, na qual 16,6% do total de meninos eram obesos e entre as meninas, a obesidade acomete 11,8% (2). Para os adolescentes entre 10 a 19 anos de idade, o excesso de peso atingiu 21,5%, sendo que nos últimos 34 anos decorrentes de 1974-1975 a 2008-2009 o excesso de peso para os meninos foi de 3,7% para 21,7%, o que representa um acréscimo de seis vezes. Já para as meninas, o excesso de peso triplicou nesses últimos 34 anos, passando de 7,6% para 19%. Quanto a obesidade, mostra-se menos intensa, mas também com tendência ascendente, passando de 0,4% para 5,9% entre meninos e de 0,7% para 4,0% no sexo feminino (2).

Estima-se que indivíduos obesos apresentem um risco aumentado de mortalidade, fato explicado pela associação entre o excesso de peso e as doenças crônicas não transmissíveis, como hipertensão arterial, dislipidemia, diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) e pelo aumento da inflamação sistêmica crônica. Essas doenças estão associadas diretamente no desenvolvimento e progressão da Doença do Fígado Gordo Não Alcoólico (NAFLD: do inglês “non-alcoholic fatty liver disease”) (3). A esteato hepatite não-alcoólica (NASH) refere-se a um estágio da NAFLD, caracterizado por inflamação e fibrose, e surge como uma das doenças de fígado mais comum, sendo sua progressão uma das principais causas de cirrose (4).

O aumento nos estoques de triacilglicerol no parênquima hepático induz a profunda alteração na homeostasia da glicose hepática. Há um prejuízo da sinalização da insulina nos hepatócitos, promovendo assim um aumento na produção de glicose endógena, pelo aumento da gliconeogênese e glicogenólise hepática (5).

Além das alterações no metabolismo da glicose, a obesidade e a resistência à insulina promovem diversas alterações nas funções hepáticas relacionadas ao metabolismo de ácidos graxos (AG), como aumento na captação e na síntese AG, inibição da β -oxidação mitocondrial e redução da liberação de VLDL (do inglês “very low density lipoprotein”). Esses efeitos aumentam os AG livres na circulação e a deposição ectópica de triacilglicerol no parênquima dos hepatócitos (6-7). Essas alterações hepáticas em indivíduos obesos representam um fator etiológico da inflamação crônica (8-9).

O termo imunometabolismo, surgiu em 2011, exatamente pelo aumento do entendimento da obesidade como uma doença que agregava alterações imunológicas e metabólicas, e muitas dessas alterações têm vias de sinalização comuns que se integram (10). Esta relação foi inicialmente observada quando o tecido adiposo se mostrou capaz em produzir quantidades significativas de TNF- α (11). Essa relação entre sistema imunitário e metabolismo se torna íntima no tecido adiposo, já que este tecido é caracterizado por um grande número de células inflamatórias (macrófagos, linfócitos, eosinófilos, basófilos e neutrófilos) que residem nesse tecido (12).

Outro ponto fundamental de ligação entre o sistema imunitário e o metabolismo se dá por um receptor inicialmente caracterizado para a ligação e reconhecimento de patógenos externos, classe de receptor da família Toll Like Receptor (TLR) (13). O TLR-4 é fundamental no reconhecimento de bactérias gram-negativas, principalmente através da sua alta afinidade aos lipopolissacarídeos. A ativação deste receptor apresenta o sinal de risco exógeno para célula, promovendo a produção e liberação de mediadores inflamatórios lipídicos e proteicos. Na obesidade há um aumento expressivo no conteúdo de LPS circulante proveniente do aumento da permeabilidade vascular intestinal, que leva a um aumento de LPS circulante proveniente das bactérias que compõem a nossa flora intestinal (14), promovendo assim um aumento da sinalização do TLR-4.

Também, um ativador desse receptor é o ácido graxo livre circulante, principalmente o mirístico, e o palmitato (15). Os indivíduos obesos apresentam um aumento expressivo no conteúdo de ácidos graxos livres circulantes, o que gera um aumento crônico da ativação da via do TLR-4, promovendo assim, a indução da resposta inflamatória crônica de baixo grau, com concentrações aumentadas de citocinas no soro, onde os indivíduos não apresentam alteração no número de células imunológicas circulantes, mas sim no seu potencial de ativação (15-16).

A resposta inicial ao excesso de ingestão de lipídeos se dá pelo armazenamento de lipídeos neutros no fígado. Este é um órgão central na regulação do metabolismo energético. Por isso, quando há um aumento constante na ingestão de lipídeos, o fígado, com o intuito de diminuir a lipotoxicidade, e consequente inflamação, estoca o excesso de lipídeos no seu interior (17). No entanto, se essa alta ingestão de lipídeos for crônica, ou se o indivíduo apresentar morbidades que promovam um aumento do estresse oxidativo, há um aumento da peroxidação lipídica, etapa inicial para o processo de desenvolvimento da doença do fígado gordo (17).

Diversos fármacos têm sido utilizados na tentativa de inibir o desenvolvimento da doença do fígado gordo não alcoólico e amenizar o processo inflamatório sistêmico crônico em indivíduos obesos. A metformina é um medicamento de primeira linha usado no tratamento do diabetes *mellitus* tipo 2 em todo o mundo, apresenta grande eficácia, baixo custo, e com baixo risco de desenvolvimento do quadro de hipoglicemia (18-19). Além desses efeitos benéficos sobre o quadro de resistência à insulina, estudos têm mostrado que a metformina está associada com a redução da inflamação, da fibrose e com a melhora da função hepática (20-21).

A metformina é um medicamento da família das biguanidinas que tem sido utilizada para a redução da glicemia, desde 1957 na Europa e desde 1995 nos EUA. No entanto, apesar de ser o tratamento hipoglicemiante mais prescrito em todo o mundo, seu mecanismo de ação permanece ainda obscuro. A metformina e a fentormina são derivados do extrato da planta *Galega officinalis* (lilás francês), guanidina isoamilo, também chamado galegine, usado durante séculos para o tratamento de diabetes *mellitus* (22). A Fentormina teve sua comercialização suspensa por efeitos colaterais severos, ao passo que as indicações clínicas para tratamento com metformina têm se expandido, sendo utilizada no tratamento da

diabetes *mellitus* tipo 2, para diabetes gestacional, síndrome dos ovários policísticos, síndrome metabólica e quadros de pré diabetes (23) .

A metformina reduz as concentrações de glicose circulantes e aumenta a sensibilidade à insulina. Além disso, a metformina apresenta efeitos pleiotrópicos, como diminuição da ingestão alimentar e o peso corporal, (24-25). Além disso, este medicamento pode influenciar positivamente em vários marcadores de risco cardiovascular, incluindo perfil lipídico, doença do fígado gordo não alcoólica, propriedades anti-inflamatórias, e, possivelmente, redução do risco de desenvolvimento de alguns tipos de tumores (24, 26-29).

A metformina não é metabolizada (30) e é excretada inalterada na urina com uma meia-vida de aproximadamente 5 horas (31). A média para a depuração renal em humanos é de 510 ± 120 ml/min. A droga é largamente distribuída nos tecidos, incluindo o intestino, o fígado e o rim por transportadores de cations orgânicos (31).

A absorção intestinal da metformina pode ser mediada principalmente pelo transportador da membrana plasmática monoamina (PMAT, codificada pelo gene SLC29A4), que é expressa no lado luminal dos enterócitos (32). No entanto, não existem atualmente dados *in vivo* sobre o papel do PMAT na disposição e efeito farmacológico da metformina. OCT3 (SLC22A3 gene) também é expresso sobre a borda em escova dos enterócitos e pode contribuir para a absorção de metformina (31, 33). Além disso, OCT1 (SLC22A1 gene), que é expresso sobre a membrana basolateral e no citoplasma dos enterócitos, pode facilitar a transferência de metformina para o fluido intersticial (Figura 1)(33).

A captação hepática da metformina é mediada principalmente pelo OCT1 (SLC22A1) e, possivelmente, pelo OCT3 (SLC22A3). Ambos os transportadores são expressos na membrana basolateral dos hepatócitos (31, 34-36). Em camundongos com deficiência do OCT1, a concentração de metformina no fígado é significativamente mais baixa do que em animais controle, sugerindo que OCT1 é essencial para a absorção de metformina hepática (37). Além disso, os efeitos da redução da glicose pela metformina foram completamente nulos em camundongos deficientes do OCT1. A metformina é também um bom substrato para a extrusão de múltiplos fármacos e toxinas 1 (MATE1, codificada pelo gene SLC47A1) e MATE2-K (SLC47A2) em humanos (34, 38-40). MATE1 (SLC47A1) é altamente expresso no fígado, rim, e músculo esquelético (41), e pode contribuir para a excreção renal e hepática da metformina. No entanto, o papel de MATE1 na secreção hepática tem

sido questionado, bem como a excreção biliar da metformina, que parece ser insignificante em seres humanos (31). Os dados de um estudo com camundongos *knockout* para MATE1 sugerem que, pelo menos em roedores, a excreção biliar da metformina ocorre (Figura 1) (42).

A absorção da metformina da circulação para as células epiteliais renais é facilitada primariamente pelo OCT2 (SLC22A2) (34), que é expresso predominantemente na membrana basolateral dos túbulos renais. A excreção renal da metformina a partir da célula para o lúmen dos túbulos renais é mediada através do MATE1 (SLC47A1) e MATE2-K (SLC47A2) (38-39, 43-44). MATE1 e MATE2-K estão expressos na membrana apical das células do túbulo proximal renal, e estudos em indivíduos saudáveis sugerem que MATE1 e MATE2-K contribuem para a excreção renal de metformina (45). OCT1 também parece ser expresso no domínio apical e subapical de ambas as extremidades proximal e distal dos túbulos no rim, e pode desempenhar um papel importante na reabsorção da metformina nos túbulos renais (46). PMAT (SLC29A4) é expresso na membrana apical das células epiteliais renais, e pode desempenhar um papel na reabsorção renal de metformina (47). Entretanto, não há dados *in vivo* para corroborar nesse mecanismo (Figura 1) (48).

Figura 1 - Farmacocinética da via da metformina (48).

Os mecanismos moleculares envolvidos na ação da metformina envolvem a ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), que por sua vez pode conduzir a efeitos farmacológicos diferentes, incluindo a inibição da síntese da glicose e lipídios (49-50). Os mecanismos de ativação da AMPK pela metformina, ainda não estão completamente elucidados, mas estudos indicam que o fármaco atravessa a membrana plasmática por difusão passiva e/ou se liga ao transportador OCT (*do inglês*: Organic Cation Transporter), estimulando a LKB-1/STK 11 (Serina/threonina quinase 11) com consequente ativação da AMPK (51).

Adicionalmente a esse mecanismo de ativação, a metformina é capaz de inibir o complexo I da cadeia respiratória, diminuindo assim a síntese de ATP, promovendo aumento da taxa AMP/ATP e ADP/ATP, e com isso, promovendo estímulo da AMPK (52).

Sabe-se que a ativação da AMPK pela metformina leva ao aumento na oxidação de ácidos graxos e inibição da lipogênese, processos regulados principalmente pela inativação da acetil-CoA carboxilase (ACC), e 3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG)-CoA redutase, concomitante ao aumento da atividade das enzimas carnitina palmitoil transferase (CPT) e malonil-CoA carboxilase, além de promover a inibição do fator de transcrição SREBP-1C, envolvido na síntese de ácidos graxos (Figura 2) (53).

Figura 2 - Mecanismo molecular da ação da metformina: Após a captação hepática através do OCT-1, a mitocôndria é o alvo principal da metformina que exerce uma inibição específica e independente da AMPK sobre o complexo da cadeia respiratória 1. A leve redução resultante no estado de energia leva à inibição aguda e transitória do consumo de energia via gliconeogênica. Além disso, através de pontos da regulação independentes e dependente da AMPK, a metformina pode conduzir à inibição da produção de glicose por interromper a expressão do gene da gluconeogênese. Em paralelo, a ativação dependente de LKB1 e AMPK desencadeada por depleção da ATP poderia reduzir a lipogênese hepática e exercer um efeito indireto sobre a sensibilidade à insulina hepática por controlar produção hepática da glicose (50).

A ativação da AMPK também está relacionada com a inibição da resposta inflamatória, ao passo que uma diminuição da atividade da AMPK está associada com o aumento da inflamação. Vários estudos têm demonstrado que a ativação de AMPK pela metformina ou pelo AICAR (O AICAR é um análogo sintético da AMP que ativa diretamente a AMPK) pode reduzir a inflamação sistêmica, diminuindo a concentração da proteína C-reativa e da IL-6 na síndrome metabólica (54). Muitas experiências *in vitro* têm demonstrado que o lipopolissacárido (LPS) induz a resposta inflamatória e pode ser inibida através da ativação da AMPK ativado por metformina ou AICAR (55-57). No entanto, algumas observações recentes implicam que o AICAR também pode inibir respostas inflamatórias através das vias independente da AMPK (58).

Vários estudos têm revelado uma relação estreita entre a atividade reduzida da AMPK e inflamação, por exemplo, no tecido adiposo e nos macrófagos (59-60). Steinberg et al. (61) observaram que o TNF- α suprimiu a atividade da AMPK por regulação positiva da expressão da proteína fosfatase 2C, que é um inibidor da sinalização da AMPK. (61).

A via de sinalização do NF- κ B está envolvida na ativação do sistema imune inato e adaptativo (62). Diversos estudos demonstram que a ativação da sinalização da AMPK regula negativamente a função da via do NF- κ B (55, 60, 63-66). AMPK tem vários alvos de fosforilação direta (67), mas parece que a AMPK suprime a sinalização do NF- κ B indiretamente através dos seus mediadores *downstream*, por exemplo, SIRT1, PGC-1 α e Foxo que podem subsequentemente suprimir a expressão de fatores inflamatórios (Figura 3)(68).

Figura 3 - Esquema ilustrativo da AMPK inibindo a via de sinalização do NF-κB e a supressão da inflamação. Setas verdes mostram as vias de ativação e setas vermelhas são as vias inibitórias. Metformina e AICAR ativam a AMPK. Em contraste, a obesidade e hiperglicemia inibem a expressão da AMPK. Downstream à AMPK, fatores que podem inibir a sinalização do NF-κB, como SIRT1, PGC-1α, e Foxo. AMPK inibe o aparecimento de estresse no RE e estresse oxidativo que podem provocar a sinalização do NF-κB. O NF-κB é o indutor chave das respostas inflamatórias que afetam o tempo de vida e o healthspan (adaptado de Salminen et al. (68)).

A ativação da AMPK pode também estar relacionada com o aumento da expressão e da ativação dos receptores ativados pelo proliferador de peroxissomos alfa (PPAR-α), pois ambos estão associados com a oxidação de ácidos graxos. Os PPARs são fatores de transcrição da família de receptores nucleares, induzem a expressão de genes envolvidos no metabolismo da glicose e lipídios (69), e são ativados por ligantes sintéticos ou endógenos (ligantes naturais de PPARs incluem AG e eicosanóides), denominados domínio de ligação ao ligante (LBD). Depois de ativados, os PPARs formam um heterodímero com os receptores do ácido retinóico X (RXR), outra classe de receptores nucleares, que, posteriormente, se liga aos elementos de respostas do proliferador de peroxissomos (PPRE), estimulando a expressão de genes-alvo (Figura 4)(70-71).

Figura 4 - Precursores ligantes de endógeno lipídicos sofrem conversão enzimática para lipídios ativos, levando a heterodimerização do PPAR/RXR, ligando-se aos genes-alvo e, posteriormente, recrutamento os complexos de coativação que ativam a transcrição desses genes alvo. PPAR – Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma; RXR – Receptores de Retinóide X (72).

Três isoformas de PPARs foram identificadas, PPAR- α , β/δ e γ , ~~ã~~os expressos em anfíbios, roedores, humanos, entre outros. ~~é~~ O PPAR predominantemente expresso no tecido adiposo e está relacionado com a síntese de lipídios. O PPAR- β/δ como o PPAR- α são regulares da atividade oxidativa (73-75).

O PPAR- α é predominantemente expresso em tecidos com alta capacidade oxidativa, tais como, fígado, coração, músculo esquelético e tecido adiposo marrom (76). No fígado o PPAR- α regula diretamente os genes envolvidos na captação e oxidação de ácidos graxos (77) (figura 5).

Figura 5 - Atividade molecular do PPAR-α no estado alimentado e jejum (77).

O PPAR-α também desempenha uma ação importante na redução da inflamação, sendo considerado atualmente um importante agente na interação imunometabólica. Os ligantes de PPAR-α reduzem significativamente as concentrações de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1β e TNF-α, além de inibirem a translocação da subunidade p65 do fator nuclearκB (NF-κB), envolvido na transcrição de genes pró-inflamatórios (Figura 6) (78).

Figura 6 - (A) Inibição da atividade de transcrição do NF-κB dependente PPRE. Após a ativação pelo ligando, PPAR-α liga-se ao DNA, e interage diretamente com p65 para abolir a sua ligação a um elemento de resposta do NF-κB (NRE). (B) PPAR-α interage diretamente com fatores de transcrição pró-inflamatória, cJun e p65 para regular negativamente os seus genes alvo por um mecanismo que é pensado para ser independente de PPRE (77).

Buler et al. (79) relatam que o PGC-1α (Coativador 1 alfa do Receptor Ativado por Proliferador do Peroxissoma) parece ser *upstream* na cascata de sinalização do PPAR-α, resultando na indução do receptor antagonista de IL-1 (IL-1ra). O PPAR-α é induzido e coativado por PGC-1α, sendo que camundongos *knockout* para PPAR-α, apresentam redução na atividade de PGC-1α e consequentemente diminui a expressão de IL-1ra, em hepatócitos. Estes dados indicam que a indução de IL-1ra por PGC-1α envolve PPAR-α. A figura a seguir (figura 7), adaptado de Buler et al. (79), mostra a via da metformina através da AMPK e supostas hipóteses do efeito anti-inflamatório dessa via.

Figura 7 - Adaptado de Buler et al: Modelo de Metformina, AMPK, PGC-1α e PPAR-α mediando a regulação da expressão de genes anti-inflamatórios (IL1ra) em hepatócitos. Metformina ativa a AMPK, que por vez, a AMPK fosforila PGC-1α e aumenta a sua atividade de transcrição de IL1ra, diminuindo o processo inflamatório. Além disso, há indícios que a Metformina e a AMPK regulam a expressão de IL1ra em um mecanismo independente da via do PGC-1α e do PPAR-α. IL-1ra - Receptor Antagonista de IL-1; PGC-1α – Coativador 1 alfa do Receptor Ativado por Proliferador do Peroxissoma; PPAR-α – Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma alfa (79)

O papel do PPAR-α na patologia do fígado gordo tornou-se evidente em camundongos *knockout* para PPAR-α. Estes camundongos são incapazes de regular o catabolismo de ácidos graxos no fígado e acabam desenvolvendo uma esteatose hepática (80).

Com base no exposto, temos como hipótese que a ativação da AMPK pela metformina poderá aumentar a expressão e ativação de PPAR-α. Assim, o nosso objetivo foi avaliar se os efeitos imunometabólicos da metformina em camundongos alimentados com dieta rica em gordura são mediados por PPAR-α.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, um curto período de tratamento com metformina, em animais WT e KO submetidos a uma HFD, foi capaz de melhorar a intolerância à glicose, aumentar as concentrações de insulina no soro e diminuir a esteatose hepática, promovendo aumento na oxidação de palmitato no músculo esquelético, aumento nas concentrações de adipocinas no tecido adiposo retroperitoneal e reverteu o efeito inflamatório causado pela LPS em macrófagos intraperitoneais, entretanto, como efeito colateral notamos um aumento na inflamação hepática induzida pelo tratamento.

REFERÊNCIAS¹

1. WHO. Obesity 2013.
2. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil Rio de Janeiro 2010.
3. Zivkovic AM, German JB, Sanyal AJ. Comparative review of diets for the metabolic syndrome: implications for nonalcoholic fatty liver disease. *Am J Clin Nutr.* 2007;86(2):285-300.
4. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med.* 1999;107(5):450-5.
5. Klover PJ, Mooney RA. Hepatocytes: critical for glucose homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(5):753-8.
6. Di Minno MN, Russolillo A, Lupoli R, Ambrosino P, Di Minno A, Tarantino G. Omega-3 fatty acids for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2012;18(41):5839-47.
7. Tilg H, Moschen AR. Insulin resistance, inflammation, and non-alcoholic fatty liver disease. *Trends Endocrinol Metab.* 2008;19(10):371-9.
8. Qatanani M, Lazar MA. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. *Genes Dev.* 2007;21(12):1443-55.
9. Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res.* 2005;96(9):939-49.

¹ De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals.[2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

10. Mathis D, Shoelson SE. Immunometabolism: an emerging frontier. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(2):81.
11. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science.* 1993;259(5091):87-91.
12. Exley MA, Hand L, O'Shea D, Lynch L. Interplay between the immune system and adipose tissue in obesity. *J Endocrinol.* 2014;223(2):R41-8.
13. Tall AR, Yvan-Charvet L. Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(2):104-16.
14. Ringseis R, Eder K, Mooren FC, Kruger K. Metabolic signals and innate immune activation in obesity and exercise. *Exerc Immunol Rev.* 2015;21:58-68.
15. Davis JE, Gabler NK, Walker-Daniels J, Spurlock ME. Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. *Obesity (Silver Spring).* 2008;16(6):1248-55.
16. Velloso LA, Folli F, Saad MJ. TLR4 at the Crossroads of Nutrients, Gut Microbiota, and Metabolic Inflammation. *Endocr Rev.* 2015;36(3):245-71.
17. Ponziani FR, Pecere S, Gasbarrini A, Ojetti V. Physiology and pathophysiology of liver lipid metabolism. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015;1-13.
18. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2008;359(15):1577-89.
19. Bolen S, Feldman L, Vassy J, Wilson L, Yeh HC, Marinopoulos S, et al. Systematic review: comparative effectiveness and safety of oral medications for type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med.* 2007;147(6):386-99.

20. Lewis JR, Mohanty SR. Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. *Dig Dis Sci*. 2010;55(3):560-78.
21. Lavine JE, Schwimmer JB, Van Natta ML, Molleston JP, Murray KF, Rosenthal P, et al. Effect of vitamin E or metformin for treatment of nonalcoholic fatty liver disease in children and adolescents: the TONIC randomized controlled trial. *JAMA*. 2011;305(16):1659-68.
22. Bailey CJ, Day C. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes Care*. 1989;12(8):553-64.
23. Cicero AF, Tartagni E, Ertek S. Metformin and its clinical use: new insights for an old drug in clinical practice. *Arch Med Sci*. 2012;8(5):907-17.
24. Salpeter SR, Buckley NS, Kahn JA, Salpeter EE. Meta-analysis: metformin treatment in persons at risk for diabetes mellitus. *Am J Med*. 2008;121(2):149-57 e2.
25. Glueck CJ, Fontaine RN, Wang P, Subbiah MT, Weber K, Illig E, et al. Metformin reduces weight, centripetal obesity, insulin, leptin, and low-density lipoprotein cholesterol in nondiabetic, morbidly obese subjects with body mass index greater than 30. *Metabolism*. 2001;50(7):856-61.
26. Gokcel A, Gumurdulu Y, Karakose H, Melek Ertorer E, Tanaci N, BascilTutuncu N, et al. Evaluation of the safety and efficacy of sibutramine, orlistat and metformin in the treatment of obesity. *Diabetes Obes Metab*. 2002;4(1):49-55.
27. Kita Y, Takamura T, Misu H, Ota T, Kurita S, Takeshita Y, et al. Metformin prevents and reverses inflammation in a non-diabetic mouse model of nonalcoholic steatohepatitis. *PLoS One*. 2012;7(9):e43056.
28. Nath N, Khan M, Paintlia MK, Singh I, Hoda MN, Giri S. Metformin attenuated the autoimmune disease of the central nervous system in animal models of multiple sclerosis. *J Immunol*. 2009;182(12):8005-14.

29. Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, Bergenstal RM, Gapstur SM, Habel LA, et al. Diabetes and cancer: a consensus report. *CA Cancer J Clin.* 2010;60(4):207-21.
30. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMP-activated protein kinase: a target for drugs both ancient and modern. *Chem Biol.* 2012;19(10):1222-36.
31. Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong JK, et al. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet.* 2011;50(2):81-98.
32. Zhou M, Xia L, Wang J. Metformin transport by a newly cloned proton-stimulated organic cation transporter (plasma membrane monoamine transporter) expressed in human intestine. *Drug Metab Dispos.* 2007;35(10):1956-62.
33. Muller J, Lips KS, Metzner L, Neubert RH, Koepsell H, Brandsch M. Drug specificity and intestinal membrane localization of human organic cation transporters (OCT). *Biochem Pharmacol.* 2005;70(12):1851-60.
34. Takane H, Shikata E, Otsubo K, Higuchi S, Ieiri I. Polymorphism in human organic cation transporters and metformin action. *Pharmacogenomics.* 2008;9(4):415-22.
35. Chen L, Pawlikowski B, Schlessinger A, More SS, Stryke D, Johns SJ, et al. Role of organic cation transporter 3 (SLC22A3) and its missense variants in the pharmacologic action of metformin. *Pharmacogenet Genomics.* 2010;20(11):687-99.
36. Nies AT, Koepsell H, Winter S, Burk O, Klein K, Kerb R, et al. Expression of organic cation transporters OCT1 (SLC22A1) and OCT3 (SLC22A3) is affected by genetic factors and cholestasis in human liver. *Hepatology.* 2009;50(4):1227-40.
37. Shu Y, Brown C, Castro RA, Shi RJ, Lin ET, Owen RP, et al. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1, OCT1, on metformin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther.* 2008;83(2):273-80.

38. Tsuda M, Terada T, Ueba M, Sato T, Masuda S, Katsura T, et al. Involvement of human multidrug and toxin extrusion 1 in the drug interaction between cimetidine and metformin in renal epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;329(1):185-91.
39. Sato T, Masuda S, Yonezawa A, Tanihara Y, Katsura T, Inui K. Transcellular transport of organic cations in double-transfected MDCK cells expressing human organic cation transporters hOCT1/hMATE1 and hOCT2/hMATE1. *Biochem Pharmacol*. 2008;76(7):894-903.
40. Tanihara Y, Masuda S, Sato T, Katsura T, Ogawa O, Inui K. Substrate specificity of MATE1 and MATE2-K, human multidrug and toxin extrusions/H(+)-organic cation antiporters. *Biochem Pharmacol*. 2007;74(2):359-71.
41. Otsuka M, Matsumoto T, Morimoto R, Arioka S, Omote H, Moriyama Y. A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(50):17923-8.
42. Ito S, Kusuhara H, Kuroiwa Y, Wu C, Moriyama Y, Inoue K, et al. Potent and specific inhibition of mMate1-mediated efflux of type I organic cations in the liver and kidney by pyrimethamine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;333(1):341-50.
43. Tsuda M, Terada T, Mizuno T, Katsura T, Shimakura J, Inui K. Targeted disruption of the multidrug and toxin extrusion 1 (mate1) gene in mice reduces renal secretion of metformin. *Mol Pharmacol*. 2009;75(6):1280-6.
44. Ito S, Kusuhara H, Yokochi M, Toyoshima J, Inoue K, Yuasa H, et al. Competitive inhibition of the luminal efflux by multidrug and toxin extrusions, but not basolateral uptake by organic cation transporter 2, is the likely mechanism underlying the pharmacokinetic drug-drug interactions caused by cimetidine in the kidney. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012;340(2):393-403.
45. Kusuhara H, Ito S, Kumagai Y, Jiang M, Shiroshita T, Moriyama Y, et al. Effects of a MATE protein inhibitor, pyrimethamine, on the renal elimination of metformin at oral microdose and at therapeutic dose in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther*. 2011;89(6):837-44.

46. Tzvetkov MV, Vormfelde SV, Balen D, Meineke I, Schmidt T, Sehrt D, et al. The effects of genetic polymorphisms in the organic cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3 on the renal clearance of metformin. *Clin Pharmacol Ther.* 2009;86(3):299-306.
47. Xia L, Engel K, Zhou M, Wang J. Membrane localization and pH-dependent transport of a newly cloned organic cation transporter (PMAT) in kidney cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292(2):F682-90.
48. Gong L, Goswami S, Giacomini KM, Altman RB, Klein TE. Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics.* 2012;22(11):820-7.
49. Foretz M, Viollet B. Regulation of hepatic metabolism by AMPK. *J Hepatol.* 2011;54(4):827-9.
50. Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M, Andreelli F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin Sci (Lond).* 2012;122(6):253-70.
51. Shu Y, Sheardown SA, Brown C, Owen RP, Zhang S, Castro RA, et al. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. *J Clin Invest.* 2007;117(5):1422-31.
52. Hawley SA, Ross FA, Chevtzoff C, Green KA, Evans A, Fogarty S, et al. Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation. *Cell Metab.* 2010;11(6):554-65.
53. Kohjima M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T, Fujino T, et al. SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med.* 2008;21(4):507-11.
54. Akbar DH. Effect of metformin and sulfonylurea on C-reactive protein level in well-controlled type 2 diabetics with metabolic syndrome. *Endocrine.* 2003;20(3):215-8.

55. Bai A, Ma AG, Yong M, Weiss CR, Ma Y, Guan Q, et al. AMPK agonist downregulates innate and adaptive immune responses in TNBS-induced murine acute and relapsing colitis. *Biochem Pharmacol*. 2010;80(11):1708-17.
56. Zhao X, Zmijewski JW, Lorne E, Liu G, Park YJ, Tsuruta Y, et al. Activation of AMPK attenuates neutrophil proinflammatory activity and decreases the severity of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295(3):L497-504.
57. Giri S, Nath N, Smith B, Viollet B, Singh AK, Singh I. 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside inhibits proinflammatory response in glial cells: a possible role of AMP-activated protein kinase. *J Neurosci*. 2004;24(2):479-87.
58. Labuzek K, Liber S, Gabryel B, Okopien B. AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-4-ribofuranoside) increases the production of toxic molecules and affects the profile of cytokines release in LPS-stimulated rat primary microglial cultures. *Neurotoxicology*. 2010;31(1):134-46.
59. Gauthier MS, O'Brien EL, Bigornia S, Mott M, Cacicedo JM, Xu XJ, et al. Decreased AMP-activated protein kinase activity is associated with increased inflammation in visceral adipose tissue and with whole-body insulin resistance in morbidly obese humans. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;404(1):382-7.
60. Yang Z, Kahn BB, Shi H, Xue BZ. Macrophage alpha1 AMP-activated protein kinase (alpha1AMPK) antagonizes fatty acid-induced inflammation through SIRT1. *J Biol Chem*. 2010;285(25):19051-9.
61. Steinberg GR, Michell BJ, van Denderen BJ, Watt MJ, Carey AL, Fam BC, et al. Tumor necrosis factor alpha-induced skeletal muscle insulin resistance involves suppression of AMP-kinase signaling. *Cell Metab*. 2006;4(6):465-74.
62. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:693-733.
63. Wang S, Zhang M, Liang B, Xu J, Xie Z, Liu C, et al. AMPKalpha2 deletion causes aberrant expression and activation of NAD(P)H oxidase and consequent

endothelial dysfunction in vivo: role of 26S proteasomes. *Circ Res.* 2010;106(6):1117-28.

64. Wu X, Mahadev K, Fuchsel L, Ouedraogo R, Xu SQ, Goldstein BJ. Adiponectin suppresses I κ B kinase activation induced by tumor necrosis factor- α or high glucose in endothelial cells: role of cAMP and AMP kinase signaling. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293(6):E1836-44.

65. Hattori Y, Suzuki K, Hattori S, Kasai K. Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor kappaB activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells. *Hypertension.* 2006;47(6):1183-8.

66. Sag D, Carling D, Stout RD, Suttles J. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype. *J Immunol.* 2008;181(12):8633-41.

67. Canto C, Auwerx J. AMP-activated protein kinase and its downstream transcriptional pathways. *Cell Mol Life Sci.* 2010;67(20):3407-23.

68. Salminen A, Hyttinen JM, Kaarniranta K. AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. *J Mol Med (Berl).* 2011;89(7):667-76.

69. Jay MA, Ren J. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rev.* 2007;3(1):33-9.

70. Bain DL, Heneghan AF, Connaghan-Jones KD, Miura MT. Nuclear receptor structure: implications for function. *Annu Rev Physiol.* 2007;69:201-20.

71. Osumi T, Wen JK, Hashimoto T. Two cis-acting regulatory sequences in the peroxisome proliferator-responsive enhancer region of rat acyl-CoA oxidase gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;175(3):866-71.

72. Harmon GS, Lam MT, Glass CK. PPARs and lipid ligands in inflammation and metabolism. *Chem Rev.* 2011;111(10):6321-40.
73. Chawla A, Schwarz EJ, Dimaculangan DD, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma: adipose-predominant expression and induction early in adipocyte differentiation. *Endocrinology.* 1994;135(2):798-800.
74. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* 1994;79(7):1147-56.
75. Wang YX, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, et al. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell.* 2003;113(2):159-70.
76. Kliewer SA, Forman BM, Blumberg B, Ong ES, Borgmeyer U, Mangelsdorf DJ, et al. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(15):7355-9.
77. Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. Molecular mechanism of PPARalpha action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2015;62(3):720-33.
78. Ramanan S, Kooshki M, Zhao W, Hsu FC, Robbins ME. PPARalpha ligands inhibit radiation-induced microglial inflammatory responses by negatively regulating NF-kappaB and AP-1 pathways. *Free Radic Biol Med.* 2008;45(12):1695-704.
79. Buler M, Aatsinki SM, Skoumal R, Komka Z, Toth M, Kerkela R, et al. Energy-sensing factors coactivator peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1alpha) and AMP-activated protein kinase control expression of inflammatory mediators in liver: induction of interleukin 1 receptor antagonist. *J Biol Chem.* 2012;287(3):1847-60.
80. Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest.* 1999;103(11):1489-98.