

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓCIAS

CARINA PREVIATE

**TRATAMENTO NEONATAL COM
METFORMINA PREVINE A SÍNDROME
METABÓLICA NA VIDA ADULTA**

Maringá
2019

CARINA PREVIATE

**TRATAMENTO NEONATAL COM
METFORMINA PREVINE A SÍNDROME
METABÓLICA NA VIDA ADULTA**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao programa de Pós-
graduação em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar de Freitas Mathias

Maringá
2019

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Previante, Carina

P944T Tratamento neonatal com metformina previne a
síndrome metabólica na vida adulta/ Carina Previante.
-- Maringá, 2019.

32 f. : il. color., figs.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cezar de Freitas
Mathias.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de
Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, 2019.

1. Metformina. 2. Síndrome metabólica. 3. Redução
de ninhada. 4. Programação metabólica. 5. Lactação.
I. Mathias, Paulo Cezar de Freitas, orient. II.
Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas. III. Título.

CDD 22. ED.571.57

Jane Lessa Monção CRB9 1173

CARINA PREVIA TE

**TRATAMENTO NEONATAL COM
METFORMINA PREVINE A SÍNDROME
METABÓLICA NA VIDA ADULTA**

Dissertação apresentada à
Universidade Estadual de Maringá,
como parte das exigências do Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas, na área de concentração
em Fisiologia Integrativa, para obtenção
do título de Mestre.

APROVADO em 21 de fevereiro de 2019



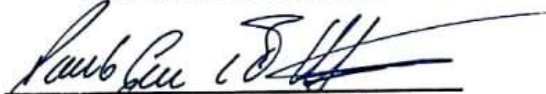
Prof. Dr. Angelo Rafael Carpinelli



Prof. Dr. Paulo Matafome



Prof.^a Dra. Maria Ida Bonini
Ravanelli Speziali



Prof. Dr. Paulo Cesar de Freitas
Mathias
(Orientador)

Agradecimentos

Agradeço à minha família, em especial meus pais, Agustinho e Marly, por acreditarem e investirem em mim, não medindo esforços para que eu chegasse até essa etapa da minha vida. Às minhas irmãs, Pietra e Isabela, por todo apoio e incentivo durante meus anos de estudos. Obrigada por fazerem meus dias mais felizes. Ao meu cunhado, Guilherme, pelos momentos de descontração em meio a correia do dia-a-dia.

Agradeço ao meu orientador, Paulo Mathias, pelos ensinamentos e incentivos que tornaram possível a realização deste trabalho. Agradeço também a minha coorientadora, Claudinéia, que com muita paciência me ensinou as diferentes técnicas realizadas neste estudo e a dinâmica de pesquisa em um laboratório. Agradeço todas as pessoas que compõem a equipe do Laboratório de Biologia Celular da Secreção que ajudaram e colaboraram para a realização deste projeto, pessoas que convivi ao longo desses anos e com quem aprendi a fazer ciência. Obrigada, vocês são como uma família para mim.

À CAPES pelo auxílio financeiro na forma de bolsa, o que permitiu dedicar-me integralmente ao meu projeto de pesquisa. Às fundações de apoio à pesquisa CAPES, CNPq e Fundação Araucária que financiaram este projeto. A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas que foram fundamentais na minha formação acadêmica.

Agradeço também os meus amigos e colegas que estiveram presentes durante todo esse processo, em especial à Suelen, Amanda e Arthur por todo apoio emocional. À Junia pelo carinho, paciência e por sua capacidade de me trazer paz nos momentos de desespero.

PREVIATE, Carina. **TRATAMENTO NEONATAL COM METFORMINA PREVINE A SÍNDROME METABÓLICA NA VIDA ADULTA**. 2019. 32 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Biológicas. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2019.

RESUMO

A síndrome metabólica é caracterizada por um conjunto de fatores de risco que são frequentemente observados na prática clínica, como obesidade abdominal, inflamação, dislipidemia, hiperinsulinemia, hiperglicemia, e pressão arterial alta. O desenvolvimento dos problemas metabólicos é causado pela interação de fatores genéticos, ambientais, e por condições estressantes durante períodos críticos de desenvolvimento. A metformina é uma droga utilizada para o tratamento da diabetes e síndrome do ovário policístico em gestantes e lactantes, mesmo sabendo que ela tem a capacidade de atravessar a placenta e passar para o leite. Pela necessidade de estudos que investiguem possíveis mecanismos do efeito da utilização da metformina em fases críticas do desenvolvimento a longo prazo, e levando em consideração o conceito de programação metabólica, hipotetizamos que o tratamento com metformina durante a lactação pode atenuar as disfunções metabólicas na vida adulta induzidas pela superalimentação durante a lactação. Após o nascimento das ninhadas (ratos *wistar*), os grupos controle foram padronizados para uma prole com nove animais, e os grupos redução de ninhada, após o terceiro dia, para três animais. Do 1º dia até o 12º os animais dos grupos NL-S (controle salina) e SL-S (redução de ninhada salina) receberam uma injeção intraperitoneal de salina, e os grupos NL-M (controle metformina) e SL-M (redução de ninhada metformina) receberam injeção intraperitoneal de metformina na concentração de 100 mg/kg de massa corpórea/dia. Aos 90 dias de vida, estes animais foram submetidos a eutanásia para avaliação dos parâmetros biométricos e bioquímicos. O tratamento neonatal com metformina diminuiu o peso corporal, o estoque de gordura retroperitoneal e o consumo alimentar, além disso normalizou a glicemia e insulinemia durante o teste de tolerância à glicose, regularizou os níveis de insulina plasmática durante a lactação, e diminuiu a secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas no grupo SL. Em conclusão, o tratamento neonatal com a

metformina reduziu a instalação da síndrome metabólica induzida pelo modelo de redução de ninhada.

Palavras-Chave: Metformina. Síndrome Metabólica. Redução de ninhada. Programação Metabólica. Lactação.

PREVIATE, Carina. **NEONATAL TREATMENT WITH METFORMIN PREVENTS METABOLIC SYNDROME IN ADULT LIFE**. 2019. 32 p. Dissertation (Master Degree in Physiological Sciences) – Department of Physiological Sciences. State University of Maringá, Maringá, 2019.

ABSTRACT

Metabolic syndrome is characterized by a set of metabolic risk factors that are frequently observed in clinical practice, such as abdominal obesity, inflammation, dyslipidemia, hyperinsulinemia, hyperglycemia, and high blood pressure. The development of metabolic problems is caused by the interaction of genetic, environmental, and stressful conditions during critical periods of development. Metformin is a drug used to treat diabetes and polycystic ovary syndrome in pregnant women and breastfeeding women, even though it knows it has the ability to cross the placenta and pass into the milk. Due to the need for studies that investigate possible mechanisms of the effect of metformin on critical phases of long-term development, and taking into account the concept of metabolic programming, we hypothesized that early intraperitoneal treatment with metformin can programming the rat to resist the development of metabolic dysfunctions in adult life, caused by overfeeding during lactation. After the birth of the litters (*wistar* rats) the control groups were standardized for on offspring with nine animals, and the litter reduction groups, after the third day, for three. From the first day to the 12th, animals from the NL-S (saline normal litter) and SL-S (saline small litter) groups received an intraperitoneal saline injection, and the NL-M (metformin normal litter) and SL-M (metformin small litter) received intraperitoneal injection of metformin at the concentration of 100 mg / kg of body mass / day. At 90 days of age, these animals were submitted to euthanasia to evaluate the biometric and biochemical parameters. Neonatal treatment with metformin decreased body weight, retroperitoneal fat stores, and food intake, in addition normalized glycemia and insulinemia during the glucose tolerance test, regularized plasma insulin levels during lactation, and decreased secretion of insulin through the pancreatic islets in SL group. In conclusion, neonatal treatment with metformin reduced the installation of the metabolic syndrome induced by the small litter model.

Keywords: Metformin. Metabolic Syndrome. Small litter. Metabolic Programming. Lactation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Linha do tempo do protocolo experimental.....	06
Figura 2 -	Peso corporal.....	10
Figura 3 -	Ganho de peso.....	11
Figura 4 -	Estoques de gordura.....	12
	a Periepididimal.....	12
	b Retroperitoneal.....	13
	c Mesentérica.....	13
Figura 5 -	Consumo alimentar relativo.....	14
Figura 6 -	Efeito da metformina na insulinemia da prole ao longo da lactação....	15
Figura 7 -	a Glicemia durante o ivGTT.....	17
	b Insulinemia durante o ivGTT.....	18
Figura 8 -	Secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas.....	19

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMPK	Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
ASC	Área sob a curva
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CNA	Comprimento naso-anal
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DOHaD	<i>Developmental Origins of Health and Diseases</i>
EPM	Erro padrão da média
GLP-1	<i>Glucagon-like-peptide-1</i>
I	Interação entre os fatores (tamanho da ninhada x tratamento)
i.p.	Intraperitoneal
ivGTT	Teste de tolerância à glicose intravenoso
L	Fator de tamanho da ninhada
NL-M	Controle Metformina
NL-S	Controle Salina
NPY	Neuropeptídeo Y
RIA	Radioimunoensaio
rpm	Rotações por minuto
SAB	Soro albumina bovina
SL-M	Redução de Ninhada Metformina
SL-S	Redução de Ninhada Salina
T	Fator de tratamento
UEM	Universidade Estadual de Maringá

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	04
2.1 Objetivo Geral	04
2.2 Objetivos Específicos	04
3 MÉTODOS	05
3.1 Aprovação ética	05
3.2 Animais, tratamento e condições experimentais	05
3.3 Avaliação dos níveis plasmáticos de insulina durante a lactação	06
3.4 Parâmetros biométricos	07
3.5 Teste de Tolerância à glicose intravenoso (ivGTT)	07
3.6 Isolamento das Ilhotas Pancreáticas	08
3.7 Respostas secretora frente a diferentes concentrações de glicose	08
3.8 Análise estatística dos dados	09
5 RESULTADOS	10
4.1 Efeitos do tratamento com metformina nos parâmetros biométricos	10
4.2 Níveis plasmáticos de insulina durante a lactação	15
4.3 Glicemia e insulinemia durante o teste de tolerância à glicose intravenosa (ivGTT)	16
4.4 Resposta secretora das ilhotas pancreáticas frente a diferentes concentrações de glicose	19
5 DISCUSSÃO	20
6 CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS	25
ANEXOS	31
A. APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	32

1 INTRODUÇÃO

A síndrome metabólica é caracterizada por um conjunto de fatores de risco metabólicos que são frequentemente observados na prática clínica, como obesidade abdominal, inflamação, dislipidemia, hiperinsulinemia, hiperglicemia, e pressão alta; e é definida pela presença de pelo menos três destes fatores (CAO et al., 2019; GARRALDA-DEL-VILLAR et al., [s.d.]; KAUR, 2014; LINK; REUE, 2018). Estas disfunções metabólicas aumentam a predisposição para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 e alguns tipos de câncer (CAO et al., 2019; GARRALDA-DEL-VILLAR et al., [s.d.]; LINK; REUE, 2018).

A prevalência da síndrome metabólica, apesar de variar entre diferentes regiões, níveis sociais, sexo, idade, raça e etnia, tem um aumento significativo em todo o mundo, a cada ano (KAUR, 2014; LINK; REUE, 2018; NOLAN et al., 2017). Estima-se que aproximadamente 25% da população mundial tenha um quadro de síndrome metabólica (THE INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2006), e no Brasil a estimativa é de 8,9% (RAMIRES et al., 2013).

O desenvolvimento dos problemas metabólicos é causado principalmente pela interação de fatores genéticos e ambientais (KAUR, 2014). Dentre estes, destacam-se os fatores ambientais, levando em consideração as mudanças no estilo de vida da sociedade moderna, pelos hábitos alimentares (quantidade e qualidade do alimento) e a baixa frequência ou falta de exercício físico (GARRALDA-DEL-VILLAR et al., [s.d.]; KAUR, 2014).

Entretanto, além dos fatores genéticos e ambientais, condições estressantes durante o período de concepção parental (CHANG et al., 2017; FULLSTON et al., 2015), gestação e lactação (ARMENGAUD et al., 2018; CHAN et al., 2013; MIRANDA et al., 2018), infância e adolescência (DE OLIVEIRA et al., 2018; LAMPL; MUMMERT; SCHOEN, 2016; LELIJVELD et al., 2016); como alterações nutricionais, metabólicas e hormonais, também podem contribuir para o desenvolvimento de doenças metabólicas na vida adulta. Estas observações corroboram com o conceito da programação metabólica, também conhecido como DOHaD (“Developmental Origins of Health and Diseases”) ou hipótese de Barker. De

forma contrária, o conceito DOHaD também pode ser interpretado como se fatores benéficos quando incorporados em períodos críticos do desenvolvimento, diminuíssem ou impedissem o desenvolvimento de doenças metabólicas na vida adulta (DE OLIVEIRA et al., 2013; MALTA et al., 2016; RIBEIRO et al., 2017).

A metformina (dimetilbiguanida) é uma droga derivada da guanidina, o composto ativo hipoglicemiante da *Galega officinalis* (*French lilac*), utilizada para o tratamento da diabetes mellitus desde 1957 na Europa, e desde 1995 nos Estados Unidos (NESTI; NATALI, 2017; PERNICOVA; KORBONITS, 2014).

Atualmente, além de ser a droga oral mais prescrita no mundo para o tratamento da diabetes mellitus tipo II, por reduzir os níveis de glicose e melhorar a sensibilidade à insulina (SALPETER et al., 2008), a metformina também é indicada para o tratamento e prevenção de diversas outras doenças devido aos seus efeitos pleiotrópicos e poucos efeitos colaterais. A única reação desagradável comum que este medicamento pode causar é desconforto gastrointestinal, principalmente no início do tratamento (CUBEDDU et al., 2000). A metformina, desta forma, é indicada na prática clínica para o tratamento da diabetes gestacional (LINDSAY; LOEKEN, 2017), síndrome do ovário policístico (DIAMANTI-KANDARAKIS et al., 2010), síndrome metabólica (ORCHARD et al., 2005), tratamento e prevenção de câncer (POLLAK, 2013), e prevenção da diabetes (CICERO; TARTAGNI; ERTEK, 2012; KHOKHAR et al., 2017).

Embora seu mecanismo de ação não tenha sido completamente elucidado, sabe-se que esta droga diminui a produção de glicose hepática, resultado pela inibição da gliconeogênese e da glicogenólise, e estímulo da glicogênese; além disso, a metformina aumenta a absorção de glicose periférica nos tecidos insulino-dependentes, principalmente na musculatura esquelética, por aumentar a expressão de GLUT1 e GLUT4 (DEL PRETE; LUTZ; SCHARRER, 1999; OWEN; DORAN; HALESTRAP, 2000; ROWDEN; FASANO, 2007).

Recentes evidências indicam que estas vias são modificadas pela ação indireta da metformina na ativação da proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK). A AMPK é principalmente expressa no fígado, mas também é encontrada em outros tecidos, incluindo o intestino, tecido adiposo, músculo esquelético, miocárdio e pâncreas (NESTI; NATALI, 2017; RODRIGUEZ; HIEL;

DELZENNE, 2018). Esta proteína tem a função no metabolismo celular de manter a homeostasia energética, desligando vias metabólicas que consomem ATP – vias anabólicas de síntese de ácidos graxos e colesterol – e estimulando vias metabólicas que produzem ATP – vias catabólicas de oxidação de glicose e ácidos graxos (ZHOU et al., 2001). Da mesma forma, a metformina, pode modular a atividade do hipotálamo através da fosforilação da AMPK, o que resulta na redução da expressão do neuropeptídeo Y e conseqüentemente aumento da saciedade (DUAN et al., 2013) evidenciando os possíveis mecanismos das propriedades anoréxicas desta droga.

Sabe-se que a metformina tem a capacidade de atravessar a placenta e de transferência para o leite, entretanto, esta droga ainda é prescrita, em alguns países, para o tratamento da diabetes e síndrome do ovário policístico em gestantes e lactantes (LINDSAY; LOEKEN, 2017). Estudos que mostram os efeitos causados pela metformina nos fetos, e principalmente, seus possíveis efeitos a longo prazo, são escassos e apresentam resultados contraditórios. Além disso, a *Food and Drug Administration*, nos Estados Unidos, aprova o uso de metformina em crianças, com 10 anos ou mais, para o tratamento da diabetes mellitus tipo 2 (KHOKHAR et al., 2017).

Visto a importância das disfunções metabólicas, a literatura apresenta diversos modelos experimentais para o estudo da obesidade e da síndrome metabólica em animais. Um destes modelos, amplamente estudado em roedores, é obtido por meio de redução de ninhada, que consiste na redução do número de filhotes da ninhada para três animais, no terceiro dia de lactação. Normalmente, roedores, como ratos e camundongos, geram de dez a doze filhotes por ninhada, assim, reduzindo a ninhada para apenas três filhotes a oferta de leite será muito maior, resultando em uma superalimentação durante a lactação. Na vida adulta estes animais apresentam hiperfagia, hiperinsulinemia, resistência periférica à insulina e obesidade (GOMES et al., 2012; PLAGEMANN et al., 1999; RINALDI et al., 2012).

Pela necessidade de estudos que investiguem possíveis mecanismos do efeito da utilização da metformina em fases críticas do desenvolvimento a longo prazo, e levando em consideração o conceito de programação metabólica, nossa hipótese é de que o tratamento com metformina durante a lactação pode atenuar as disfunções metabólicas na vida adulta induzidas pela superalimentação durante a lactação.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar o efeito do tratamento precoce intraperitoneal de metformina em ratos adultos *Wistar* programados para disfunções metabólicas por superalimentação durante a lactação.

2.2 Específicos

- Determinar se a administração intraperitoneal de metformina altera de forma significativa o peso corporal, consumo alimentar e estoques de gorduras na vida adulta;
- Verificar se a insulinemia e glicemia são modificadas pela administração neonatal de metformina na vida adulta;
- Avaliar as concentrações plasmáticas de insulina durante a lactação em animais tratados com metformina;
- Avaliar o efeito do tratamento com metformina sobre a secreção de insulina em ilhotas pancreáticas isoladas.

3 MÉTODOS

3.1 Aprovação ética

Todos os protocolos experimentais foram realizados de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA) sob o protocolo de número 4235260917.

3.2 Animais, tratamento e condições experimentais

Ratos *Wistar* machos e fêmeas provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá foram acomodados no Biotério Setorial do Laboratório de Biologia Celular da Secreção, vinculado ao Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular da mesma instituição. Os animais foram acondicionados em caixas apropriadas e receberam água e ração comercial à vontade. Após cinco dias de adaptação, os animais foram colocados para cruzamento na proporção de três fêmeas por macho. Após detectada a prenhes, as fêmeas foram acomodadas em gaiolas individuais até o nascimento da ninhada.

Quatro grupos experimentais foram formados: controle salina (NL-S), controle metformina (NL-M), redução de ninhada salina (SL-S), e redução de ninhada metformina (SL-M). Os grupos controle, NL-S e NL-M, foram padronizados no primeiro dia de nascimento para uma prole com nove animais, sendo dada a preferência para animais machos, da mesma forma, os grupos redução de ninhada, SL-S e SL-M, foram padronizados para uma prole com nove animais no primeiro dia, no entanto, ao terceiro dia foram reduzidos a uma prole de apenas três animais machos.

Do 1º ao 12º dia após o nascimento os animais dos grupos NL-M e SL-M receberam uma injeção intraperitoneal de metformina (1,1-Dimethylbiguanide hydrochloride, SIGMA-ALDRICH®) na dose de 100mg/kg de massa corpórea por dia, e os grupos NL-S e SL-S receberam uma injeção intraperitoneal de salina (0,9% de NaCl). Aos 21 dias de vida foi realizado o desmame de cada prole, quando então, foram

mantidos apenas três animais por caixa, para a realização dos protocolos experimentais (Fig. 1).

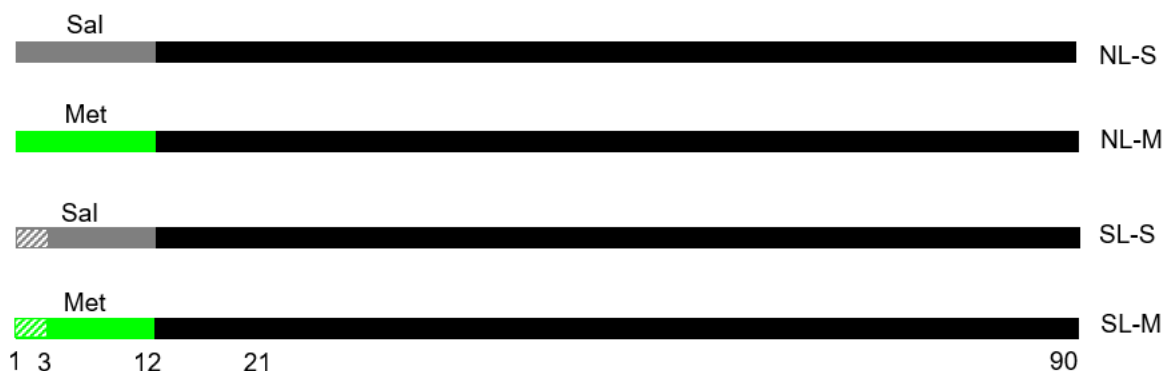


Fig. 1. Linha do tempo do protocolo experimental. As barras cinzas representam a injeção intraperitoneal de salina (0,9% de NaCl), as verdes, o tratamento intraperitoneal de metformina (100 mg/ kg/ massa corpórea), ambos do 1° ao 12° dia de vida. As barras sólidas representam as ninhadas controle (NL) e as barras listradas as ninhadas reduzidas ao 3° dia (SL). O dia 21 representa o desmame das ninhadas, e o dia 90 a eutanásia para realização dos experimentos. NL-S: controle salina; NL-M: controle metformina; SL-S: redução de ninhada salina, SL-M: redução de ninhada metformina.

Durante o período experimental todos os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo (12 h claro/escuro).

3.3 Parâmetros biométricos

A evolução do peso corporal e o consumo alimentar de todos os animais ($n = 9-15$ por grupo) foram acompanhados semanalmente durante todo o período experimental. Após os procedimentos experimentais, os animais de todos os grupos sofreram eutanásia aos 90 dias de idade por decapitação com guilhotina. Em seguida, os animais foram laparotomizados para a coleta dos principais estoques de gorduras (periepídica, retroperitoneal e mesentérica) os quais foram pesados para uma estimativa do acúmulo total de gordura corporal. Os valores das gorduras foram expressos em relação ao peso corporal de cada animal (g/100g de massa corpórea).

3.4 Avaliação dos níveis plasmáticos de insulina durante a lactação

Após 6 horas de jejum, amostras de sangue das ninhadas de todos os grupos foram retiradas através de eutanásia por decapitação para determinar as concentrações de insulina nos dias 7, 13 e 21 de vida (n = 9-14 ratos por grupo).

3.5 Teste de Tolerância à glicose intravenoso (ivGTT)

Para o teste de tolerância a glicose intravenoso os animais (n = 9-15 ratos por grupo) aos 86 dias de vida foram submetidos a uma cirurgia para a implantação de uma cânula de silicone na veia jugular direita por onde foram administradas todas as soluções utilizadas bem como retiradas as amostras de sangue. Este procedimento foi realizado através de uma incisão na região cervical anterior, seguida da dissecação dos tecidos até a visualização da veia. A cânula foi inserida na veia e fixada através de uma sutura simples no músculo peitoral maior. Para que não entrasse sangue na cânula e não ocorresse a formação de coágulos, ela foi preenchida com solução de heparina a 10% (Liquemine[®]) diluída em salina (0,9% de NaCl).

Após a cirurgia, os animais foram mantidos no biotério setorial em caixas individuais com água e ração comercial à vontade. O teste foi realizado 24h depois dos procedimentos cirúrgicos e com os animais submetidos a jejum de 12h (20h às 8h).

O volume de glicose administrado nos animais durante o teste foi na dose de 1g/kg de massa corpórea. O ivGTT se iniciou com uma primeira coleta de sangue (400µL), denominado tempo 0, em seguida, foi injetada a solução de glicose, e nos tempos 5, 15, 30 e 45 minutos foram retiradas novamente amostras de sangue (400µL). Após cada coleta de sangue foi injetado solução salina 0,9% para que a volemia do rato não fosse alterada.

Depois deste procedimento, as amostras de sangue foram centrifugadas a 13.000 rpm/5 minutos, o plasma foi recolhido e armazenado a -20 °C para posterior quantificação da glicemia pelo método da glicose oxidase (TRINDER, 1969) por espectrofotometria (Analisador bioquímico semiautomático, BIO 200FL, Bio Plus[®], São Paulo/SP, Brasil), utilizando kit comercial (Gold Analisa[®], Belo

Horizonte/MG, Brasil) e a dosagem da insulinemia por radioimunoensaio (RIA) (SCOTT; ATWATER; ROJAS, 1981) através de um contador de emissão de partículas gama (Wizard² Automatic Gamma Counter, _{TM}-2470, PerkinElmer[®], Shelton/CT, USA), sendo utilizado como padrão insulina de rato, anticorpo anti-insulina de rato (Sigma-Aldrich[®], St Louis/MO, USA) e insulina humana recombinante marcada com I¹²⁵ (PerkinElmer[®], Shelton/CT, USA). O ensaio tem sensibilidade de 90%.

3.6 Isolamento das Ilhotas Pancreáticas

Ilhotas pancreáticas foram isoladas adotando-se uma metodologia previamente descrita (GRAVENA; MATHIAS; ASHCROFT, 2002). Aos 90 dias de vida um lote de ratos (n = 6 ratos por grupo) sofreu eutanásia por decapitação, uma vez que se faz necessário a exsanguinação para a não coagulação no tecido pancreático. Os ratos foram imediatamente laparotomizados para exposição do ducto biliar comum, sendo este dissecado próximo ao pedículo hepático por onde se introduziu uma cânula de polietileno. Após a canulação do ducto biliar comum e a oclusão na sua extremidade distal, próximo a entrada do duodeno, foram injetados no interior do pâncreas 8mL de solução fisiológica, solução Hanks, contendo os seguintes componentes: colagenase tipo XI, 0,1%; soro albumina bovina (SAB), 5% e HEPES [N-(2-hydroxyethyl-piperazine)-N'-(2-ethanesulphonic acid)], 0,6%, (Sigma-Aldrich[®], St Louis/MO, USA) adicionados em solução Hanks [(mmol/L): NaCl, 136,9; KCl, 5,4; MgSO₄.7H₂O, 0,81; Na₂HPO₄, 0,34; KH₂PO₄, 0,44; CaCl₂.2H₂O, 1,26; NaHCO₃, 4,16; glicose, 0,06; SAB, 15 e (O₂, 95% + CO₂, 5%)/10 min, pH 7,4].

Em seguida os pâncreas foram removidos e postos para incubação a 37°C/15min sob constante agitação. Posteriormente à incubação, os pâncreas foram lavados e centrifugados a 1000 rpm/5 segundos por três vezes e a cada etapa o sobrenadante foi sugado. As ilhotas foram visualizadas e coletadas com o auxílio de uma lupa estereoscópica (Estereomicroscópio binocular, SQZ-DS4-BI-35, Tecnival[®], Brasil).

3.7 Resposta secretora frente a diferentes concentrações de glicose

Grupos de 4 ilhotas foram previamente incubados (37°C/60min) em 1mL de solução Krebs-Ringer [(mmol/L): NaCl, 115; NaHCO₃, 24; KCl, 1,6; MgCl₆H₂O, 1; CaCl₂2H₂O, 1; SAB, 15; e pH 7,4] contendo glicose a 5,6mmol/L, oxigenada (O₂, 95% + CO₂, 5%) em placas de cultivo de células. Em seguida, o sobrenadante foi descartado dos poços e foi adicionado 1mL de uma nova solução Krebs-Ringer contendo as seguintes concentrações de glicose [(mmol/L): 5,6; 8,3 e 16,7].

3.8 Análise estatística dos dados

Os resultados foram apresentados como média \pm o erro padrão da média (EPM) e submetidos ao teste de normalidade de D'Agostino Pearson. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA *two-way*), seguido pelo teste *Tukey's post hoc*. Foram utilizados como intervalo de confiabilidade, valores de $P < 0,05$. Os fatores considerados foram tamanho da ninhada (L), tratamento (T), e interação (I). As análises foram realizadas através do programa *GraphPad Prism*[®] versão 7 (*Windows GraphPad Prism*[®] Software, San Diego/CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Efeitos do tratamento com metformina nos parâmetros biométricos

Como esperado, a ninhada que sofreu redução no terceiro dia de vida, grupo SL-S, teve aumento de peso corporal ao desmame (21 dias) e na vida adulta (90 dias), comparado aos animais do seu grupo controle NL-S, de 37% ($p < 0,0001$) e 11% ($p < 0,01$), respectivamente (Fig. 3). Apesar de não ter sido encontrada diferença no ganho de peso entre os grupos experimentais SL-S comparado ao seu controle NL-S, e SL-M comparado a NL-M, o tamanho da ninhada mostrou ter efeito neste parâmetro ($p < 0,05$; Fig. 4).

O tratamento durante os 12 primeiros dias de lactação com metformina, mostrou-se eficaz ($p < 0,0001$ aos 21 dias; $p < 0,01$ aos 90 dias), visto que os animais do grupo SL-M tiveram uma redução de peso tanto ao desmame ($p < 0,0001$; Fig. 3) quanto na vida adulta ($p < 0,05$; Fig. 3), entretanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos ratos do grupo NL-M quando comparados aos animais do grupo NL-S (Fig. 3).

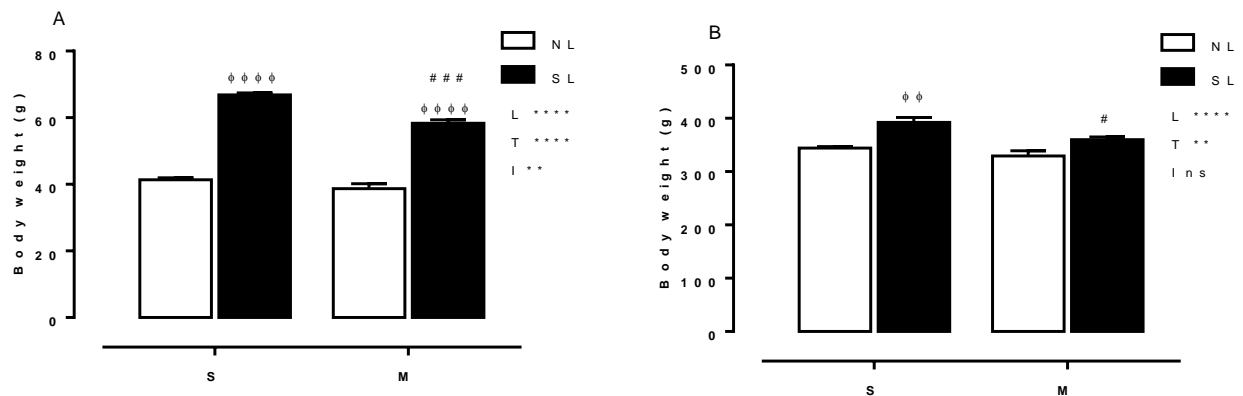


Fig. 2. Peso corporal no desmame (a) e na vida adulta (b). Os resultados foram apresentados como média \pm EPM de 9-15 ratos por grupo experimental. NL-S, controle salina; NL-M, controle metformina; SL-S, redução de ninhada salina; SL-M, redução de ninhada metformina. # $P < 0,05$, ### $P < 0,001$, para S vs M nas mesmas condições; phi phi phi phi $P < 0,0001$ para NL vs SL no mesmo grupo baseada na análise post-hoc de *Tukey*. L, fator de tamanho da ninhada; T, fator de

tratamento; e I, interação entre os fatores tamanho da ninhada e tratamento. ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$ e ns, sem diferença significativa, com base na análise de variância (ANOVA *two-way*).

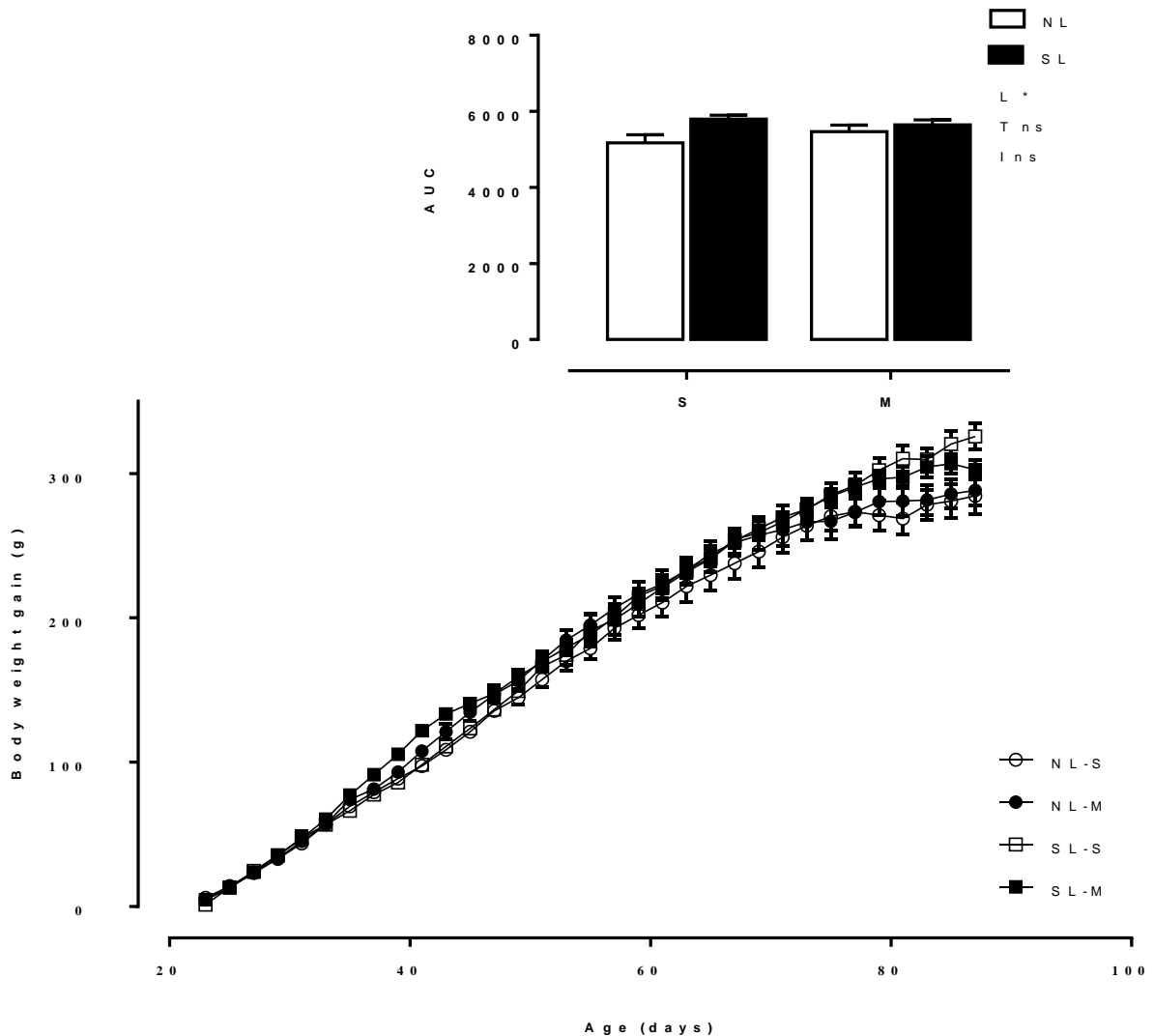
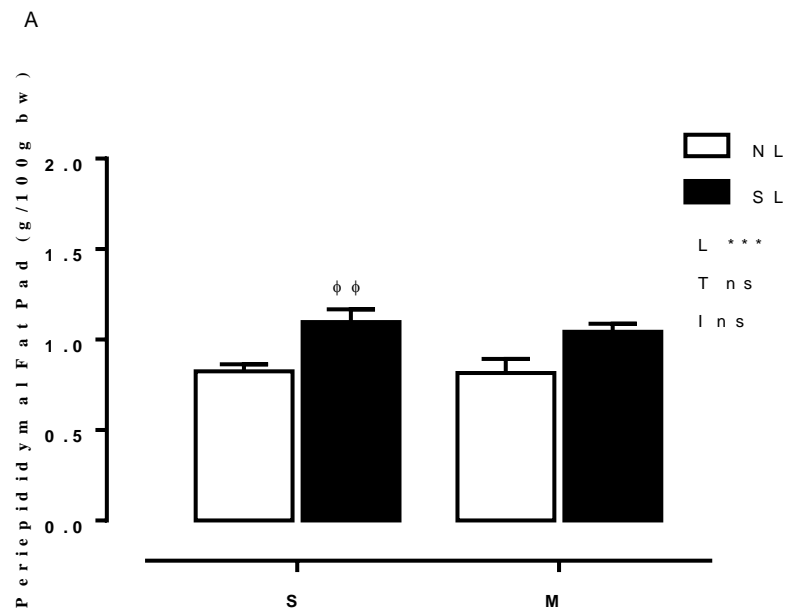


Fig. 3. Ganho de peso. Os resultados foram apresentados como média \pm EPM de 9-15 ratos por grupo experimental. NL-S, controle salina; NL-M, controle metformina; SL-S, redução de ninhada salina; SL-M, redução de ninhada metformina. A inserção na parte superior direita da figura representa a ASC. L, fator de tamanho da ninhada; T, fator de tratamento; e I, interação entre os fatores tamanho da ninhada e tratamento. * $P < 0,05$, e ns, sem diferença significativa, com base na análise de variância (ANOVA *two-way*).

Os principais estoques de gordura, como esperado, foram maiores nos ratos do grupo SL-S quando comparado ao grupo NL-S, como observado na gordura periepídidima (+ 33%; $p < 0,01$; Fig. 6a), retroperitoneal (+ 48%; $p < 0,001$; Fig. 6b) e mesentérica (+ 37%; $p < 0,01$; Fig. 6c). O tratamento precoce intraperitoneal com metformina mostrou ter efeito na deposição de gordura retroperitoneal ($p < 0,01$; Fig.6b) e mesentérica ($p < 0,05$; Fig.6c), entretanto, reduziu apenas a gordura retroperitoneal dos animais do grupo SL-M em 23% quando comparado aos animais do grupo SL-S ($p < 0,05$; Fig. 6b). Não sendo constatada redução das gorduras nos animais do grupo NL-M quando comparados aos animais do seu grupo controle NL-S (Fig. 6).



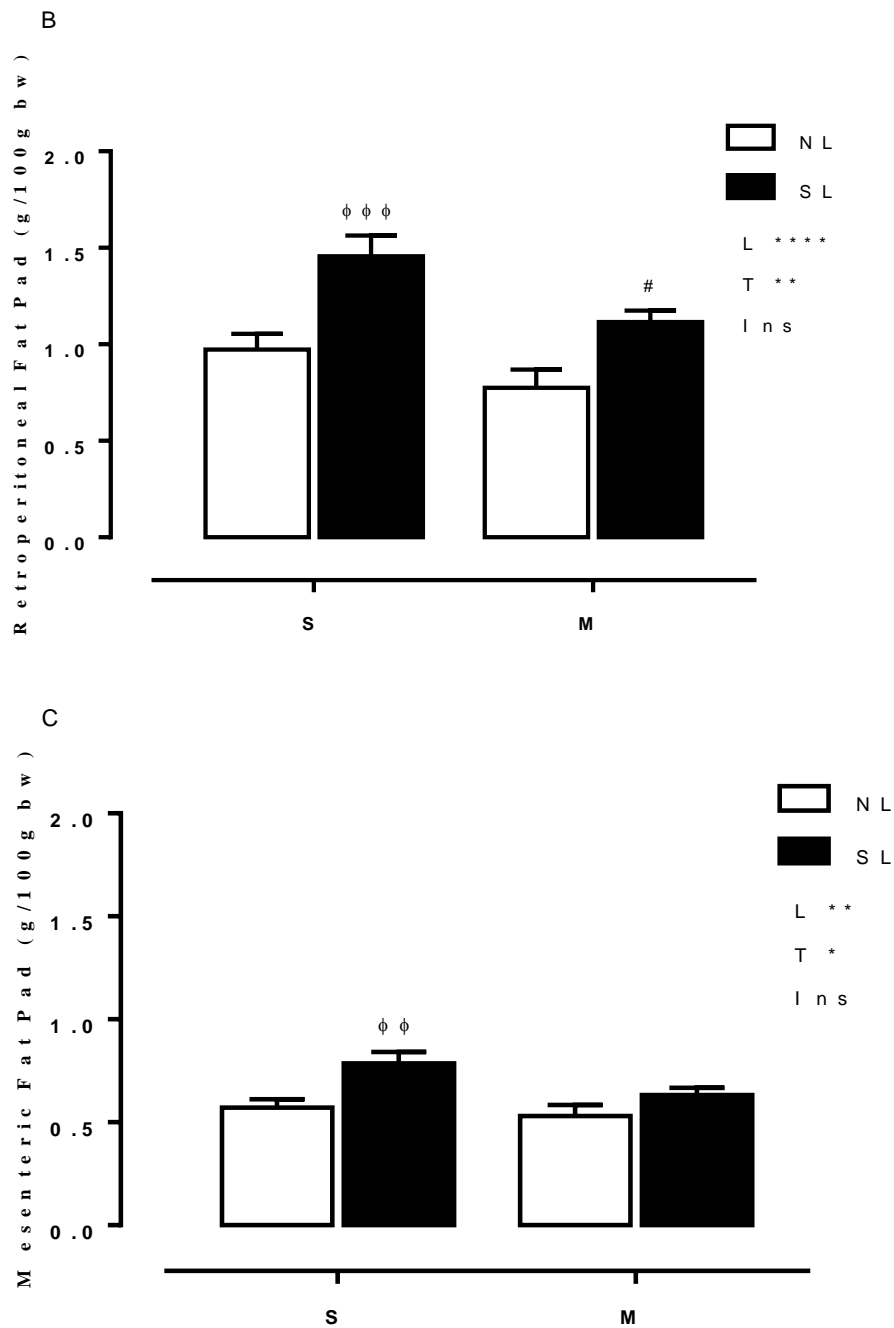


Fig. 4. Estoques de gordura periepididimal (a), retroperitoneal (b), e mesentérica (c). Os resultados foram apresentados como média \pm EPM de 9-15 ratos por grupo experimental. NL-S, controle salina; NL-M, controle metformina; SL-S, redução de ninhada salina; SL-M, redução de ninhada metformina. # $P < 0,05$, para S vs M nas mesmas condições; $\phi\phi$ $P < 0,01$, $\phi\phi\phi$ $P < 0,001$ para NL vs SL no mesmo grupo baseada na análise post-hoc de *Tukey*. L, fator de tamanho da

ninhada; T, fator de tratamento; e I, interação entre os fatores tamanho da ninhada e tratamento. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ e ns, sem diferença significativa, com base na análise de variância (ANOVA *two-way*).

Os animais superalimentados durante a lactação, grupo SL-S, mostraram-se hiperfágicos, como esperado. A ingestão alimentar foi afetada pelo tratamento com metformina ($p < 0,01$). Observou-se uma redução estatisticamente significativa de 58% no consumo alimentar dos ratos do grupo SL-M comparado aos ratos do seu grupo controle SL-S ($p < 0,01$; Fig. 5), não sendo observadas diferenças entre os grupos NL-M e NL-S (Fig. 5).

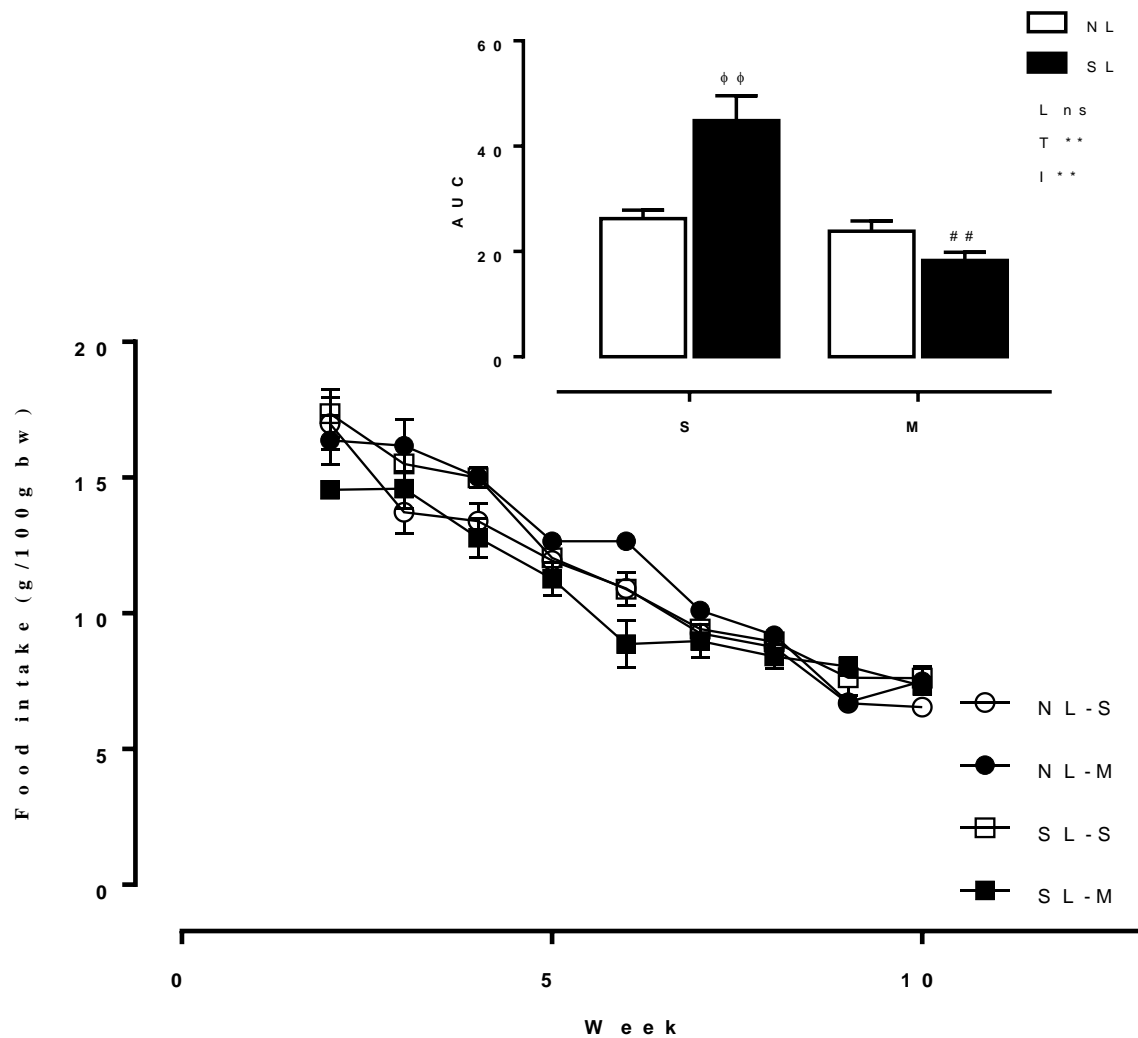


Fig. 5. Consumo alimentar relativo (g/100g de massa corpórea). Os resultados foram apresentados como média \pm EPM de 9-15 ratos por grupo experimental. NL-S, controle salina; NL-M, controle metformina; SL-S, redução de ninhada salina; SL-M, redução de ninhada metformina. A inserção na parte superior direita da figura representa a ASC do consumo alimentar. ## $P < 0,01$, para S vs M nas mesmas condições; $\phi\phi$ $P < 0,01$ para NL vs SL no mesmo grupo baseada na análise post-hoc de *Tukey*. L, fator de tamanho da ninhada; T, fator de tratamento; e I, interação entre os fatores tamanho da ninhada e tratamento. ** $P < 0,01$, e ns, sem diferença significativa, com base na análise de variância (ANOVA *two-way*).

4.2 Níveis plasmáticos de insulina durante a lactação

Durante a lactação, os níveis de insulina plasmática dos animais do grupo SL-S, mostraram-se elevados comparados aos animais do grupo controle NL-S aos 13 ($p < 0,05$) e 21 ($p < 0,001$) dias de vida, como mostrado na figura 2. O tratamento com metformina mostrou ter efeito nas mesmas idades, 13 e 21 dias ($p < 0,05$), entretanto, os níveis plasmáticos de insulina foram reduzidos apenas nos ratos do grupo SL-M quando comparados com seu grupo controle SL-S (13 dias, $p < 0,05$; 21 dias, $p < 0,01$; Fig. 2), não sendo observada diferença entre os grupos NL-S e NL-M.

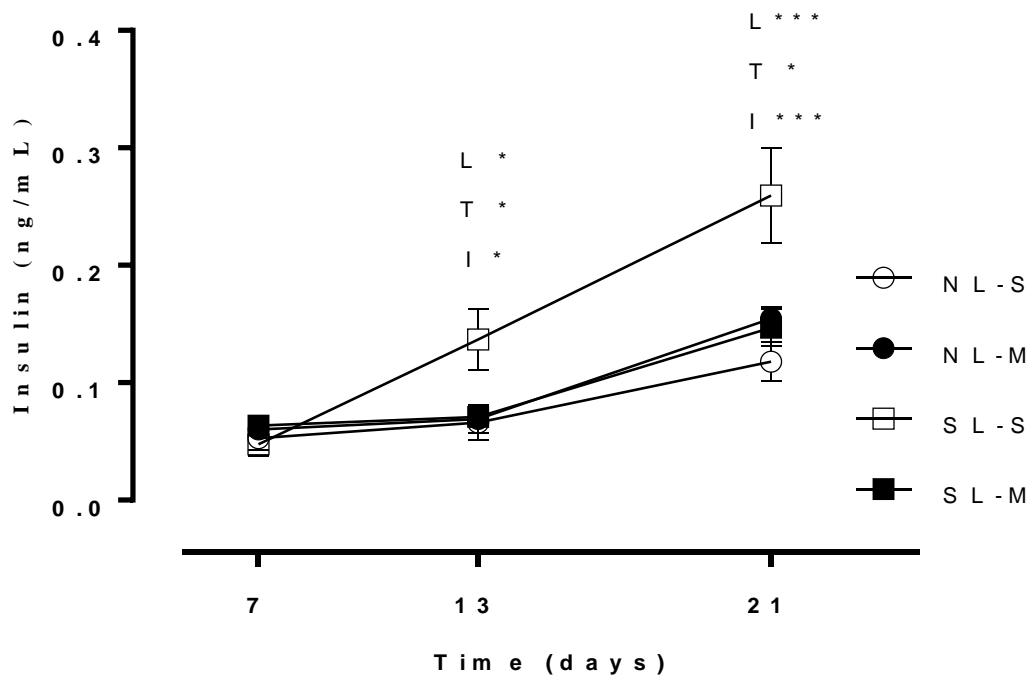
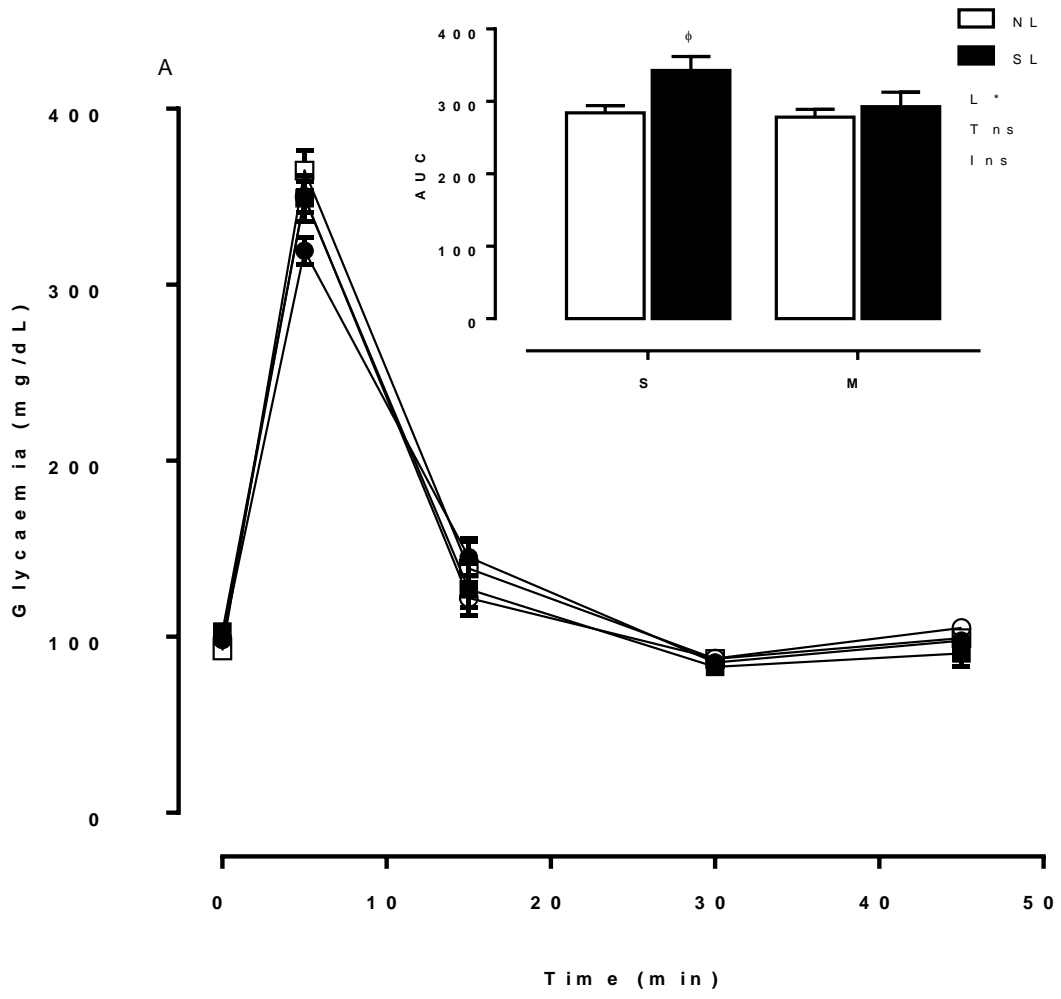


Fig. 6. Efeito da metformina na insulinemia da prole ao longo da lactação. NL-S, controle salina; NL-M, controle metformina; SL-S, redução de ninhada salina; SL-M, redução de ninhada metformina. L, fator de tamanho da ninhada; T, fator de tratamento; e I, interação entre os fatores. * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, com base na análise de variância (ANOVA *two-way*) de 9–14 ratos por grupo experimental.

4.3 Glicemia e insulinemia durante o teste de tolerância à glicose intravenosa (ivGTT)

Durante o teste de tolerância à glicose intravenosa, conforme demonstrado pelo gráfico da área sob a curva (ASC), a glicemia e a insulinemia dos animais superalimentados durante a lactação, grupo SL-S, aumentaram em 21% ($p < 0,05$; Fig. 7a) e 63% ($p < 0,0001$; Fig. 7b), respectivamente, em comparação ao seu controle, grupo NL-S.

Embora o tratamento neonatal com metformina não tenha alterado a glicemia durante o ivGTT, a insulinemia foi reduzida em 60% nos ratos do grupo SL-M comparado aos ratos também superalimentados que não receberam o tratamento, grupo SL-S ($p < 0,0001$; Fig. 7b). Além disso, nota-se o efeito do tamanho da ninhada ($p_L < 0,01$), do tratamento ($p_T < 0,0001$), e da interação destes dois fatores ($p_{LT} < 0,001$).



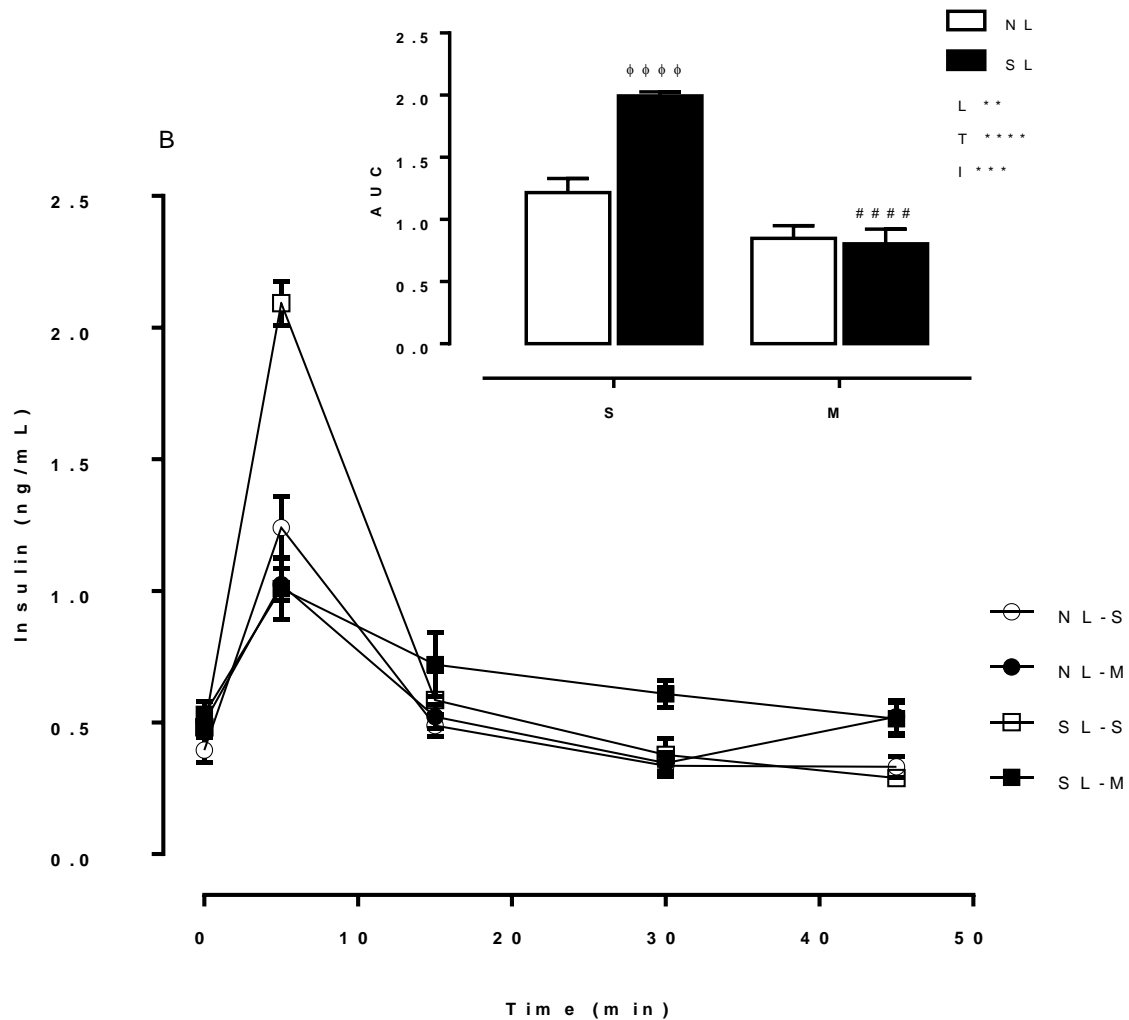


Fig. 7. Glicemia (a) e insulinemia (b) durante o ivGTT. Os resultados foram apresentados como média \pm EPM de 9-15 ratos por grupo experimental. NL-S, controle salina; NL-M, controle metformina; SL-S, redução de ninhada salina; SL-M, redução de ninhada metformina. A inserção na parte superior direita da figura representa a ASC. ##### $P < 0,0001$, para S vs M nas mesmas condições; ϕ $P < 0,05$, $\phi\phi\phi\phi$ $P < 0,0001$ para NL vs SL no mesmo grupo baseada na análise post-hoc de Tukey. L, fator de tamanho da ninhada; T, fator de tratamento; e I, interação entre os fatores tamanho da ninhada e tratamento. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ e ns, sem diferença significativa, com base na análise de variância (ANOVA two-way).

4.4 Resposta secretora das ilhotas pancreáticas frente a diferentes concentrações de glicose

A figura 8 mostra que o tamanho da ninhada teve efeito na secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas ($p_L < 0,01$). Em concentração basal de glicose (5.6 mmol/L) o tratamento neonatal com metformina não teve efeito sob esse parâmetro nas diferentes ninhadas, sendo que o grupo SL-M, mostrou-se com maior secreção de insulina quando comparado ao seu controle NL-M ($p < 0,01$; Fig. 8).

Em concentrações pós-prandiais de glicose, o tratamento intraperitoneal com metformina, diferentemente da concentração basal de glicose, mostrou ter efeito sob a secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas ($p_T < 0,001$; Fig. 8). Os animais do grupo SL-M tiveram redução na secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas isoladas em duas concentrações pós-prandiais quando comparados aos animais do grupo SL-S, de aproximadamente 44% (8.3 mmol/L de glicose, $p < 0,001$; 17.7 mmol/L de glicose, $p < 0,05$; Fig. 8).

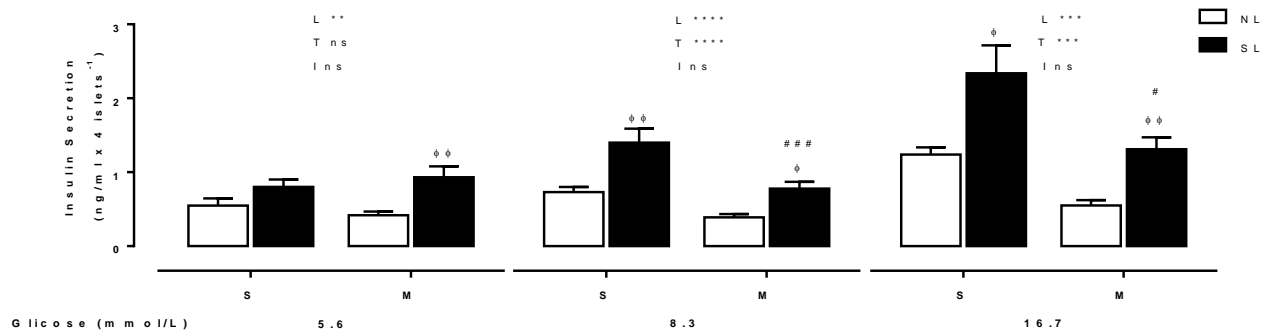


Fig. 8. Secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas. Secreção de insulina estimulada por diferentes concentrações de glicose. Os resultados foram apresentados como média \pm EPM de 6 ratos, de 3 ninhadas diferentes, por grupo experimental. NL-S, controle salina; NL-M, controle metformina; SL-S, redução de ninhada salina; SL-M, redução de ninhada metformina. A inserção na parte superior direita da figura representa a ASC. # $P < 0,05$, ### $P < 0,001$, para S vs M nas mesmas condições; φ $P < 0,05$, φφ $P < 0,01$ para NL vs SL no mesmo grupo baseada na análise post-hoc de Tukey. L, fator de tamanho da ninhada; T, fator de tratamento; e I, interação entre os fatores tamanho da ninhada e tratamento. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ e ns, sem diferença significativa, com base na análise de variância (ANOVA two-way).

5 DISCUSSÃO

O tratamento neonatal com metformina durante os doze primeiros dias de vida protegeu a prole de ratos contra as disfunções metabólicas na vida adulta causadas pela superalimentação durante a lactação. Os animais do grupo SL-S, superalimentados durante a lactação, apresentaram na vida adulta sobrepeso, hiperfagia, intolerância à glicose e hiperinsulinemia durante o IVGTT, como já descrito na literatura (DE ALMEIDA et al., 2013; HAWLEY et al., 2002; PLAGEMANN et al., 1999; RINALDI et al., 2012; RODRIGUES et al., 2009). No entanto, pela primeira vez, demonstramos que essas características podem ser atenuadas através do tratamento com metformina durante o início da vida.

A ninhada que foi reduzida durante a lactação, e recebeu o tratamento com metformina do primeiro ao décimo segundo dia de vida, grupo SL-M, mostrou na vida adulta redução do peso corporal e da gordura retroperitoneal, provavelmente, causadas pela menor ingestão alimentar destes animais. Outros estudos, já observaram que o tratamento com metformina diminui o peso corporal, os estoques de gordura e a ingestão alimentar (ADEYEMO et al., 2015; FREEMARK; BURSEY, 2001; GOLAY, 2008; LEE; MORLEY, 1998; MALIN; KASHYAP, 2014; MATSUI et al., 2010; PORTELA et al., 2015; YANOVSKI et al., 2011), entretanto, estes resultados foram encontrados durante o tratamento com metformina e não em um contexto de programação.

Estudos que buscam efeitos a longo prazo da utilização da metformina durante a gestação realizados por Salomäki e colaboradores (2014), demonstraram que a administração de metformina durante a gestação em camundongas prenhas, resultou em menor ganho de peso corporal e estoques de gorduras na prole, diante da oferta de uma dieta hiperlipídica. Diferencialmente, ensaios clínicos de Hanem e colaboradores (2018), mostraram que crianças expostas a metformina durante a gestação apresentaram maior IMC e maior prevalência a sobrepeso/obesidade; Rowan e colaboradores (2018), constataram que apesar das maiores medidas antropométricas, como peso e IMC, o percentual de gordura das crianças expostas a metformina durante a gestação, não eram maiores que das crianças expostas a insulina.

Apesar da redução de gordura dos animais tratados com metformina ter sido evidente apenas na gordura retroperitoneal do grupo SL-M em relação aos ratos do grupo SL-S, o tratamento precoce intraperitoneal com esta droga mostrou ter efeito tanto na gordura retroperitoneal como na mesentérica, evidenciando seu efeito benéfico, visto que o aumento do tecido adiposo visceral está intimamente relacionado com o aumento de risco a resistência à insulina, dislipidemias e consequentemente a diabetes mellitus tipo 2 (BOYKO et al., 2000; WAJCHENBERG et al., 2002).

Embora não tenha sido avaliado a expressão do NPY e fosforilação da AMPK, sugerimos que a metformina, administrada durante um período no qual a barreira hematoencefálica ainda não está completamente fechada, foi capaz de ativar a AMPK no hipotálamo de modo a diminuir a expressão do NPY, como já observado (DUAN et al., 2013), resultando em maior saciedade, e consequentemente menor ingestão alimentar.

Outros estudos, apontam diferenças nos níveis plasmáticos de importantes hormônios relacionados a homeostase energética após tratamento oral com metformina. Estudos em ratos obesos induzidos por dieta hiperlipídica (KIM et al., 2006; MATSUI et al., 2010), e estudos em pacientes obesos não diabéticos (PAOLISSO et al., 1998) apresentaram redução nos níveis plasmáticos do hormônio leptina, sugerindo que a metformina melhora a sensibilidade a leptina causada pela obesidade.

Aumento na concentração plasmática de GLP-1 (*glucagon-like-peptide-1*) já foi relatado em estudos com animais obesos (MAIDA et al., 2011; MATSUI et al., 2010), em pacientes diabéticos e não-diabéticos (PREISS et al., 2017; WU et al., 2014), e em homens obesos não-diabéticos (GARBER, 2011). Adicionalmente, o tratamento com metformina também pode aumentar os níveis séricos de adiponectina em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (SU et al., 2016; WANG et al., 2013).

O conjunto destas alterações nos níveis plasmáticos hormonais, como a redução dos níveis de leptina, aumento de GLP-1 e aumento de adiponectina, convergem para uma mesma função, o aumento da saciedade e consequentemente redução da ingestão alimentar.

Neste estudo, demonstramos que o tratamento neonatal com metformina induziu a redução dos níveis plasmáticos de insulina em animais

superalimentados, normalizando este parâmetro durante a lactação. Estudos anteriores mostram que a hiperinsulinemia durante períodos críticos de desenvolvimento causam mudanças na função e estrutura do hipotálamo, o que resulta em alterações permanentes como excesso de peso corporal, intolerância à glicose e pressão arterial elevada (HARDER et al., 1998). Dessa forma, propomos que os níveis normais de insulina no início da vida, causados pelo tratamento intraperitoneal com metformina durante os doze primeiros dias de vida, protegeu estes animais superalimentados durante a lactação de desenvolverem doenças metabólicas na vida adulta. Da mesma forma, a não alteração da quantidade de insulina nos animais controle que também receberam o tratamento com metformina, poderia explicar porque estes animais não tiveram alterações nos parâmetros avaliados quando comparados aos animais controle que não receberam a droga.

Considerando o período do tratamento, a metformina provavelmente programou os filhotes superalimentados na lactação para uma vida saudável, impedindo possíveis mudanças danosas no hipotálamo causadas pela hiperinsulinemia. A melhora do metabolismo causada pela normalização dos níveis plasmáticos de insulina durante a lactação já foi demonstrada em estudos anteriores (MALTA et al., 2016).

Além da normalização da insulina plasmática durante o período de lactação, a insulinemia durante o ivGTT dos animais que foram superalimentados durante a lactação e receberam tratamento com metformina também foi menor quando comparada aos animais que não receberam tratamento, mesmo sem alteração da glicemia. Sabe-se que a metformina aumenta a sensibilidade à insulina (FORD et al., 2015; SEGHERI et al., 2018) e estudos anteriores demonstraram a redução da insulinemia causada pelo tratamento não precoce com metformina (FREEMARK; BURSEY, 2001; VIOLLET et al., 2012; ZHOU et al., 2001).

Demonstramos, pela primeira vez, que o tratamento precoce com metformina causa mudanças na função das células beta pancreáticas *in vitro*. Um recente estudo demonstrou que ilhotas incubadas em concentrações de metformina próximas a concentrações terapêuticas da droga, inibiu a secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas, em adição, altas concentrações de metformina induziram a morte

celular (GELIN et al., 2018). Neste trabalho, constatamos que ilhotas pancreáticas isoladas de animais superalimentados durante a lactação que receberam o tratamento intraperitoneal de metformina durante os doze primeiros dias de vida, grupo SL-M, secretaram menos insulina em concentrações de glicose pós-prandiais. Entretanto, o tratamento precoce com metformina não causou diferenças estatisticamente significativas nos animais do grupo controle (NL-M).

Estudos anteriores, ainda não publicados, do nosso grupo de pesquisa, mostraram que o tratamento com metformina durante doze dias na vida adulta (60 a 71 dias de vida) no mesmo modelo animal (SL) não causaram modificações na secreção das ilhotas pancreáticas dos animais aos 150 dias de vida, além disso, Franco e colaboradores (2014) constataram que o tratamento crônico com metformina não interferiu no efeito insulínico da glicose em ilhotas pancreáticas isoladas. Este resultado sugere, portanto, que o período de tratamento foi crucial para as alterações causadas na secreção das células beta pancreáticas, possivelmente tendo efeito na embriogênese do pâncreas que se inicia no meio da gestação e termina durante a lactação em roedores (GITTES, 2009; O'DOWD; STOCKER, 2013).

6 CONCLUSÃO

O tratamento neonatal com injeção intraperitoneal de metformina na concentração de 100mg por kg de massa corpórea por dia, durante os doze primeiros dias de lactação, melhora o metabolismo de ratos *wistar* adultos programados para disfunções metabólicas pela superalimentação na lactação, induzida pela redução da ninhada. Esses animais apresentaram redução do peso corporal no desmame e na vida adulta, atenuação do consumo alimentar, redução da gordura retroperitoneal, normalização da insulinemia durante a lactação e durante o ivGTT, e normalização da secreção de insulina pelas ilhotas pancreáticas.

Com este estudo, portanto, sugerimos que normalização dos níveis de insulina durante a lactação causada pelo tratamento precoce com metformina, pode ser um dos principais mecanismos envolvidos para que os animais superalimentados durante a lactação resistissem ao desenvolvimento das alterações características da síndrome metabólica.

REFERÊNCIAS

ADEYEMO, M. A. et al. Effects of metformin on energy intake and satiety in obese children. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, [s. l.], 2015.

ARMENGAUD, J. B. et al. Offspring of mothers with hyperglycaemia in pregnancy: The short term and long-term impact. What is new? **Diabetes Research and Clinical Practice**, [s. l.], 2018.

BOYKO, E. J. et al. Visceral adiposity and risk of type 2 diabetes: A prospective study among Japanese Americans. **Diabetes Care**, [s. l.], 2000.

CAO, R. Y. et al. FNDC5: a novel player in metabolism and metabolic syndrome. **Biochimie**, [s. l.], 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.01.001>>

CHAN, L. L. Y. et al. Effect of maternal nutrient restriction from early to midgestation on cardiac function and metabolism after adolescent-onset obesity. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, [s. l.], 2013.

CHANG, R. C. et al. DNA methylation-independent growth restriction and altered developmental programming in a mouse model of preconception male alcohol exposure. **Epigenetics**, [s. l.], v. 2294, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/15592294.2017.1363952>>

CICERO, A. F. G.; TARTAGNI, E.; ERTEK, S. Metformin and its clinical use: New insights for an old drug in clinical practice. **Archives of Medical Science**, 2012.

CUBEDDU, L. X. et al. Effects of metformin on intestinal 5-hydroxytryptamine (5-HT) release and on 5-HT₃ receptors. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, [s. l.], 2000.

DE ALMEIDA, D. L. et al. Early overfeed-induced obesity leads to brown adipose tissue hypoactivity in rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, [s. l.], 2013.

DE OLIVEIRA, J. C. et al. Poor pubertal protein nutrition disturbs glucose-induced insulin secretion process in pancreatic islets and programs rats in adulthood to increase fat accumulation. **Journal of Endocrinology**, [s. l.], 2013.

DE OLIVEIRA, J. C. et al. Low protein diet in puberty impairs testosterone output and energy metabolism in male rats. **Journal of Endocrinology**, [s. l.], v. 55, n. March, p. 1–31, 2018.

DEL PRETE, E.; LUTZ, T. A.; SCHARRER, E. Acute increase in food intake after intraperitoneal injection of metformin in rats. **Physiology and Behavior**, [s. l.], 1999.

DIAMANTI-KANDARAKIS, E. et al. Metformin in polycystic ovary syndrome. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s.l.], 2010.

DUAN, Y. et al. Metformin inhibits food intake and neuropeptide Y gene expression in the hypothalamus. **Neural Regeneration Research**, [s. l.], 2013.

FORD, R. J. et al. Metformin and salicylate synergistically activate liver AMPK, inhibit lipogenesis and improve insulin sensitivity. **Biochemical Journal**, [s. l.], 2015.

FREEMARK, M.; BURSEY, D. The Effects of Metformin on Body Mass Index and Glucose Tolerance in Obese Adolescents With Fasting Hyperinsulinemia and a Family History of Type 2 Diabetes. **Pediatrics**, [s. l.], 2001.

FULLSTON, T. et al. Paternal obesity induces metabolic and sperm disturbances in male offspring that are exacerbated by their exposure to an “obesogenic” diet. **Physiological Reports**, [s. l.], v. 3, p. 1–14, 2015.

GARBER, A. J. Long-acting glucagon-like peptide 1 receptor agonists: A review of their efficacy and tolerability. **Diabetes Care**, 2011.

GARRALDA-DEL-VILLAR, M. et al. Healthy Lifestyle and Incidence of Metabolic Syndrome in the SUN Cohort. **Nutrientes**, [s. l.], p. 1–15, [s.d.].

GELIN, L. et al. Metformin Inhibits Mouse Islet Insulin Secretion and Alters Intracellular Calcium in a Concentration-Dependent and Duration-Dependent Manner near the Circulating Range. **Journal of Diabetes Research**, [s. l.], 2018.

GITTES, G. K. Developmental biology of the pancreas: A comprehensive review. **Developmental Biology**, 2009.

GOLAY, A. Metformin and body weight. **International Journal of Obesity**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 61–72, 2008.

GOMES, R. M. et al. Efeito de um programa de exercício físico moderado em ratos de diferentes modelos de obesidade. **Revista da Educacao Fisica**, [s. l.], 2012.

GRAVENA, C.; MATHIAS, P. C.; ASHCROFT, S. J. H. Acute effects of fatty acids on insulin secretion from rat and human islets of Langerhans. **The Journal of endocrinology**, [s. l.], 2002.

HARDER, T. et al. Syndrome X-like alterations in adult female rats due to neonatal insulin treatment. **Metabolism: Clinical and Experimental**, [s. l.], 1998.

HANEM, L. et al. Metformin Use in PCOS Pregnancies Increases the Risk of Offspring Overweight at 4 Years of Age: Follow-Up of Two RCTs. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, 2018.

HAWLEY, S. A. et al. The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. **Diabetes**, [s. l.], 2002.

KAUR, J. A Comprehensive Review on Metabolic Syndrome. **Cardiology Research and Practice**, [s. l.], v. 2014, 2014.

KHOKHAR, A. et al. Metformin Use in Children and Adolescents with Prediabetes. **Pediatric Clinics of North America**, 2017.

KIM, Y. W. et al. Metformin restores leptin sensitivity in high-fat-fed obese rats with leptin resistance. **Diabetes**, [s. l.], 2006.

LAMPL, M.; MUMMERT, A.; SCHOEN, M. Promoting Healthy Growth or Feeding Obesity? The Need for Evidence-Based Oversight of Infant Nutritional Supplement Claims. **Healthcare**, [s. l.], 2016.

LEE, A.; MORLEY, J. E. Metformin decreases food consumption and induces weight loss in subjects with obesity with type II non-insulin-dependent diabetes. **Obesity Research**, [s. l.], 1998.

LELIJVELD, N. et al. Chronic disease outcomes after severe acute malnutrition in Malawian children (ChroSAM): a cohort study. **The Lancet Global Health**, [s. l.], p. 654–662, 2016.

LINDSAY, R. S.; LOEKEN, M. R. Metformin use in pregnancy: promises and uncertainties. **Diabetologia**, 2017.

LINK, J. C.; REUE, K. The Genetic Basis for Sex Differences in Obesity and Lipid Metabolism. **Annual Review of Nutrition**, [s. l.], n. 73, p. 225–245, 2018.

MAIDA, A. et al. Metformin regulates the incretin receptor axis via a pathway dependent on peroxisome proliferator-activated receptor- α in mice. **Diabetologia**, [s. l.], 2011.

MALIN, S. K.; KASHYAP, S. R. Effects of metformin on weight loss: potential mechanisms. **Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity**, 2014.

MALTA, A. et al. Neonatal treatment with scopolamine butylbromide prevents metabolic dysfunction in male rats. **Scientific Reports**, [s. l.], 2016.

MATSUI, Y. et al. Metformin Reduces Body Weight Gain and Improves Glucose Intolerance in High-Fat Diet-Fed C57BL/6J Mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, [s. l.], 2010.

MIRANDA, R. A. et al. Particulate Matter Exposure During Perinatal Life Results in Impaired Glucose Metabolism in Adult Male Rat Offspring. **Cellular Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 55, n. 44, p. 395–405, 2018.

NESTI, L.; NATALI, A. Metformin effects on the heart and the cardiovascular system: A review of experimental and clinical data. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, 2017.

NOLAN, P. B. et al. Prevalence of metabolic syndrome and metabolic syndrome components in young adults : A pooled analysis. **Preventive Medicine Reports**, [s. l.], v. 7, p. 211–215, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pmedr.2017.07.004>>

O'DOWD, J. F.; STOCKER, C. J. Endocrine pancreatic development: Impact of obesity and diet. **Frontiers in Physiology**, 2013.

ORCHARD, T. J. et al. The effect of metformin and intensive lifestyle intervention on the metabolic syndrome: The diabetes prevention program randomized trial. **Annals of Internal Medicine**, [s. l.], 2005.

OWEN, M. R.; DORAN, E.; HALESTRAP, A. P. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. **Biochemical Journal**, [s. l.], 2000.

PAOLISSO, G. et al. Effect of metformin on food intake in obese subjects. **European Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], 1998.

PERNICOVA, I.; KORBONITS, M. **Metformin-Mode of action and clinical implications for diabetes and cancer** *Nature Reviews Endocrinology*, 2014.

PLAGEMANN, A. et al. Morphological alterations of hypothalamic nuclei due to intrahypothalamic hyperinsulinism in newborn rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, [s. l.], 1999.

POLLAK, M. Potential applications for biguanides in oncology. **Journal of Clinical Investigation**, 2013.

PORTELA, L. V. et al. Intracerebroventricular Metformin Decreases Body Weight But Has Pro-oxidant Effects and Decreases Survival. **Neurochemical Research**, [s. l.], 2015.

PREISS, D. et al. Sustained influence of metformin therapy on circulating glucagon-like peptide-1 levels in individuals with and without type 2 diabetes. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, [s. l.], 2017.

RAMIRES, E. K. N. M. et al. Prevalência e Fatores Associados com a Síndrome Metabólica na População Adulta Brasileira: Pesquisa Nacional de Saúde – 2013. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**, [s. l.], p. 455–466, 2013.

RIBEIRO, T. A. et al. Maternal low intensity physical exercise prevents obesity in offspring rats exposed to early overnutrition. **Scientific Reports**, [s. l.], n. June, p. 1–11,

2017.

RINALDI, W. et al. Efeito da redução de ninhada sobre as respostas autonômicas e metabólicas de ratos Wistar. **Revista de Nutricao**, [s. l.], 2012.

RODRIGUES, A. L. et al. Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats. **Journal of Physiology**, [s. l.], 2009.

RODRIGUEZ, J.; HIEL, S.; DELZENNE, N. M. Metformin: Old friend, new ways of action-implication of the gut microbiome? **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, 2018.

ROWAN, J. et al. Metformin in Gestational Diabetes: The Offspring Follow-up (MiG TOFU): Body Composition and Metabolic Outcomes at 7-9 Years of Age. **Obstetrical and Gynecological Survey**, 2018.

ROWDEN, A. K.; FASANO, C. J. Emergency Management of Oral Hypoglycemic Drug Toxicity. **Emergency Medicine Clinics of North America**, 2007.

SALOMAKI, H. et al. Prenatal metformin exposure in a maternal high fat diet mouse model alters the transcriptome and modifies the metabolic responses of the offspring. **Plos One**, 2014.

SALPETER, S. R. et al. Meta-analysis: Metformin Treatment in Persons at Risk for Diabetes Mellitus. **American Journal of Medicine**, [s. l.], 2008.

SCOTT, A. M.; ATWATER, I.; ROJAS, E. A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of langerhans. **Diabetologia**, [s. l.], 1981.

SEGHIERI, M. et al. Short Course of Insulin Treatment versus Metformin in Newly Diagnosed Patients with Type 2 Diabetes. **Journal of Clinical Medicine**, [s. l.], v. 7, n. 9, p. 235, 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2077-0383/7/9/235>>

SU, J. R. et al. Relationship of Serum Adiponectin Levels and Metformin Therapy in Patients with Type 2 Diabetes. **Hormone and Metabolic Research**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 92–98, 2016.

TRINDER, P. Determination of blood glucose using an oxidase-peroxidase system with a non-carcinogenic chromogen. **Journal of clinical pathology**, [s. l.], 1969.

VIOLLET, B. et al. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. **Clinical Science**, [s. l.], 2012.

WAJCHENBERG, B. L. et al. Depot-specific hormonal characteristics of subcutaneous and visceral adipose tissue and their relation to the metabolic syndrome. **Hormone and**

Metabolic Research, 2002.

WANG, H. et al. The Effects of Gliclazide, Metformin, and Acarbose on Body Composition in Patients with Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus. **Current Therapeutic Research - Clinical and Experimental**, [s. l.], 2013.

WU, T. et al. Effects of sitagliptin on glycemia, incretin hormones, and antropyloroduodenal motility in response to intraduodenal glucose infusion in healthy lean and obese humans and patients with type 2 diabetes treated with or without metformin. **Diabetes**, [s. l.], 2014.

YANOVSKI, Jack A. et al. Effects of metformin on body weight and body composition in obese insulin-resistant children: A randomized clinical trial. **Diabetes**, [s. l.], 2011.

ZHOU, G. et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. **Journal of Clinical Investigation**, [s. l.], 2001.

ANEXOS



ANEXO A: APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



Comissão de Ética no Uso de Animais

da
Universidade Estadual de Maringá

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITO DO TRATAMENTO INTRAPERITONEAL COM METFORMINA SOBRE A OBESIDADE INDUZIDA PELO MODELO DE REDUÇÃO DE NINHADA EM RATOS WISTAR", protocolada sob o CEUA nº 4235260917, sob a responsabilidade de **Paulo Cezar de Freitas Mathias** e equipe; *Carina Previante; Claudinéia Conatoni da Silva Franco; Maroly Alves Pinto* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) na reunião de 07/03/2018.

We certify that the proposal "EFFECT OF INTRAPERITONEAL TREATMENT WITH METFORMIN AGAINST OBESITY ONSET INDUCED BY POSTNATAL EARLY OVERFEED IN WISTAR RATS.", utilizing 284 Heterogenic rats (251 males and 33 females), protocol number CEUA 4235260917, under the responsibility of **Paulo Cezar de Freitas Mathias** and team; *Carina Previante; Claudinéia Conatoni da Silva Franco; Maroly Alves Pinto* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the State University of Maringá (CEUA/UEM) in the meeting of 03/07/2018.

Finalidade da Proposta: *Pesquisa*

Vigência da Proposta: de 03/2018 a 02/2019

Área: *Dbc-Biotecnologia, Genética E Biologia Celular*

Origem:	Biotério Central da UEM	sexo:	Machos	idade:	80 a 85 dias	N:	11
Espécie:	Ratos heterogênicos			Peso:	300 a 350 g		
Linhagem:	Wistar						
Origem:	Biotério Central da UEM	sexo:	Fêmeas	idade:	70 a 75 dias	N:	33
Espécie:	Ratos heterogênicos			Peso:	200 a 250 g		
Linhagem:	Wistar						
Origem:	Biotério Setorial do Laboratório de Biologia Celular da Secreção - (LBSC, PRONEDO)	sexo:	Machos	idade:	0 a 150 dias	N:	240
Espécie:	Ratos heterogênicos			Peso:	6 a 550 g		
Linhagem:	Wistar						

Local do experimento: Biotério Setorial do Laboratório de Biologia Celular da Secreção - (LBSC, PRONEDO) e Laboratório de Biologia Celular da Secreção

Maringá, 07 de março de 2018

Profa. Dra. Tatiana Carlesso dos Santos
Coordenadora da CEUA/UEM
Universidade Estadual de Maringá

Dr. Claudemir Martins Soares
Coordenador Adjunto da CEUA/UEM
Universidade Estadual de Maringá