



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”**

FACULDADE DE MEDICINA

Vanessa de Cássia Martins Pires

**Influência da metformina no metabolismo energético cardíaco de ratos
expostos à fumaça de cigarros**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de
Mestre em Fisiopatologia em Clínica Médica..

Orientadora: Profa. Dra. Paula Schmidt Azevedo Gaiolla
Coorientador: Profa. Dra. Priscila Portugal dos Santos

Botucatu

2018

Vanessa de Cássia Martins Pires

Influência da metformina no metabolismo energético
cardíaco de ratos expostos à fumaça de cigarros.

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Mestre
em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Paula Schmidt Azevedo Gaiolla
Coorientador: Profa. Dra. Priscila Portugal dos Santos

Botucatu
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Pires, Vanessa de Cassia Martins.

Mestre : Influência da metformina no metabolismo energético cardíaco de ratos expostos à fumaça de cigarros / Vanessa de Cassia Martins Pires. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Paula Schmidt Azevedo Gaiolla

Capes: 33004064

1. Metabolismo energético. 2. Fumo - Vício. 3. Remodelação ventricular. 4. Metformina. 5. Cardiologia.

Palavras-chave: cardiologia; metabolismo energético; metformina; remodelação cardíaca; tabagismo.

AGRADECIMENTO

Processo nº 2016/14547-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

RESUMO -----	4
INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA -----	8
OBJETIVOS -----	12
MATERIAL E MÉTODOS -----	13
DELINEAMENTO -----	13
A EXPOSIÇÃO AO FUMO -----	13
PRESSÃO ARTERIAL CAUDAL -----	14
AVALIAÇÃO FUNCIONAL “IN VIVO” -----	14
AVALIAÇÃO DOPPLER-ECOCARDIOGRÁFICA -----	15
EUTANÁSIA -----	15
ESTUDO HISTOLÓGICO UTILIZANDO IMUNOFLUORESCÊNCIA -----	17
WESTERN BLOT -----	17
EXTRAÇÃO DAS PROTEÍNAS MIOCÁRDICAS -----	17
ELETROFORESE EM GEL -----	18
TRANSFERÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DAS PORTEÍNAS -----	18
ANTICORPOS PRIMÁRIOS -----	19
ANTICORPOS SECUNDÁRIOS -----	19
ANÁLISE ESTATÍSTICA -----	19
RESULTADOS -----	21
DISCUSSÃO -----	27
CONCLUSÃO -----	30
BIBLIOGRAFIA -----	31
ANEXO -----	33

RESUMO

Introdução: A exposição à fumaça de cigarros (EFC) não só aumenta o risco para doenças cardiovasculares como, também, lesa diretamente o miocárdio. Estudos experimentais e clínicos mostram que EFC está associada com hipertrofia e disfunção miocárdica, independentemente de fatores vasculares. Pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos com a lesão miocárdica induzida pela EFC. Dentre estes mecanismos estão as alterações no metabolismo energético. Em um coração normal, 60 a 90% do adenosina trifosfato (ATP) são provenientes da oxidação de ácidos graxos (AG). Em condições patológicas, existem alterações na utilização dos substratos, na biogênese mitocondrial e por fim na produção de ATP, que podem comprometer a morfologia e função cardíaca. Estudos mostram que o tabagismo pode levar a resistência insulínica, que por sua vez pode comprometer a bioenergética cardíaca. Entretanto, não é sabido se há comprometimento do metabolismo energético cardíaco associado à resistência insulínica induzida pela EFC. Adicionalmente, em estudos experimentais, a metformina tem se mostrado eficiente em atenuar a remodelação cardíaca, principalmente atuando sobre o metabolismo energético.

Objetivos: Os objetivos do trabalho foi avaliar o papel da metformina na remodelação cardíaca induzida pela fumaça de cigarro, por meio da avaliação morfofuncional cardíaca, do estresse oxidativo, do metabolismo energético, e expressão de proteínas que participam do metabolismo da glicose.

Material e Métodos: Foram utilizados 60 animais alocados em 4 grupos de 15 animais cada: grupo EFC (n=15), formado por animais expostos à fumaça do cigarro; EFC-MET (n=15) formado por animais expostos à fumaça do cigarro e com ingestão de metformina diluída na água; grupo controle C (n=15) e grupo MET (n=15) que recebeu metformina diluída em água. Após 2 meses os animais foram submetidos a: a) estudo bioquímico para avaliação da exposição ao cigarro, b) estudo ecocardiográfico para avaliação morfofuncional; c) aferição da pressão arterial caudal; d) estudo histológico utilizando imunofluorescência para avaliação de hipertrofia, angiogenese e translocação de GLUT-4; e) Western Blot para avaliação da expressão de proteínas envolvidas com resistência insulínica e metabolismo da glicose; f) avaliação espectrofotométrica para avaliação da atividade de enzimas do metabolismo energético e da quantidade de glicogênio cardíaco.

Resultados: Os animais EFC tiveram aumento do átrio esquerdo (AE), do diâmetro do ventrículo esquerdo (DDVE), da massa do ventrículo esquerdo (IMVE), da espessura relativa da parede posterior (ERP) seguido de disfunção diastólica. A metformina atenuou o tamanho do AE, a ERP, a disfunção diastólica em animais EFC. Em relação aos mecanismos potencialmente

envolvidos, observou-se que a EFC aumentou a formação de hidroperóxido de lipídeos, mas a associação com metformina e fumo aumentou ainda mais. Porém a metformina, independentemente da EFC aumentou a atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase. Em relação ao metabolismo energético, observou-se que o fumo independentemente da metformina reduziu a atividade do complexo I e ATP sintase. Já a metformina aumentou a atividade do complexo I, II e ATP sintase, independentemente da EFC. Não houve interação entre fumo e metformina para o metabolismo energético. Em relação a expressão de proteínas do metabolismo da glicose observou-se que AKT fosforilado/AKT total e GLUT-4 da membrana diminuíram com o fumo e foram atenuados pela metformina. Conclusão: A metformina atenua os danos gerados pela EFC, provavelmente este fato não ocorre por redução do estresse oxidativo. Existe a possibilidade da EFC induzir alteração do metabolismo da glicose, que no tecido cardíaco fora atenuada pela metformina, talvez por aumentar a fosforilação da AKT e aumento do GLUT-4 na membrana.

ABSTRACT

Introduction: Exposure to cigarette smoke (ECS) not only increases the risk for cardiovascular disease but also directly damages the myocardium. Experimental and clinical studies show that ECS is associated with hypertrophy and myocardial dysfunction, regardless of vascular factors. Little is known about the mechanisms involved with myocardial injury induced by ECS. Among these mechanisms are the changes in energy metabolism. In a normal heart, 60 to 90% of the adenosine triphosphate (ATP) comes from the fatty acid oxidation (FA). In pathological conditions, there are alterations in the use of substrates, in mitochondrial biogenesis and finally in the production of ATP, which may compromise morphology and cardiac function. Studies show that smoking can lead to insulin resistance, which in turn can compromise cardiac bioenergetics. However, it is not known whether there is impairment of the cardiac energy metabolism associated with the insulin resistance induced by the ECS. Additionally, in experimental studies, metformin has been shown to be effective in attenuating cardiac remodeling, mainly by acting on energy metabolism. **Objectives:** The objective of this study was to evaluate the role of metformin in cardiac remodeling induced by cigarette smoke through cardiac morphofunctional evaluation, oxidative stress, energy metabolism, and expression of proteins that participate in glucose metabolism. **Material and Methods:** Sixty animals were allocated to four groups of 15 animals each: ECS group (n = 15), composed of animals exposed to cigarette smoke; ECS-MET (n = 15) consisting of animals exposed to cigarette smoke and with ingestion of metformin diluted in water; group C (n = 15) and MET group (n = 15) who received metformin diluted in water. After 2 months the animals were submitted to: a) biochemical study to evaluate the exposure to cigarette; b) echocardiographic study for morphofunctional evaluation; c) measurement of caudal blood pressure; d) histological study using immunofluorescence to evaluate hypertrophy, angiogenesis and GLUT-4 translocation; e) Western Blot for evaluation of the expression of proteins involved with insulin resistance and glucose metabolism; f) spectrophotometric evaluation to evaluate the activity of energy metabolism enzymes and the amount of cardiac glycogen. **RESULTS:** ECS animals had left atrial enlargement (AE), left ventricular diameter (LVDD), left ventricular mass (LVMI), relative posterior wall thickness (ERP) followed by diastolic dysfunction. Metformin attenuated the size of AE, ERP, diastolic dysfunction in ECS animals. Regarding the potentially involved mechanisms, it was observed that the ECS increased the formation of lipid hydroperoxide, but the association with metformin and smoke increased even more. However, metformin, independently of the ECS increased the activity of the antioxidant enzymes catalase and superoxide dismutase. Regarding energetic metabolism,

it was observed that smoking independently of metformin reduced the activity of complex I and ATP synthase. On the other hand, metformin increased the activity of complex I, II and ATP synthase, independently of the ECS. There was no interaction between smoking and metformin for energy metabolism. Regarding the expression of glucose metabolism proteins, it was observed that phosphorylated AKT / total AKT and membrane GLUT-4 decreased with smoke and were attenuated by metformin. Conclusion: Metformin attenuates the damage generated by the ECS, probably not by reducing oxidative stress. There is a possibility that ECS may induce altered glucose metabolism, which in cardiac tissue has been attenuated by metformin, perhaps by increasing the phosphorylation of AKT and increasing GLUT-4 in the membrane.

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O hábito de fumar aumenta em mais de duas vezes o risco de óbito por doenças cardiovasculares (1, 2, 3). Desta forma, os efeitos vasculares do cigarro, levando a doença cardiovascular e insuficiência cardíaca, têm sido bastante explorados. É necessário considerar os efeitos tóxicos da fumaça do cigarro ao miocárdio, independentemente dos fatores vasculares.

Os efeitos tóxicos da fumaça de cigarros desencadeando o processo de remodelação são observados em estudos experimentais e clínicos. Em modelos experimentais, a fumaça de cigarro, induziu diferentes padrões de remodelação cardíaca, sendo o mais comum padrão normal seguido por hipertrofia excêntrica (4). Em geral, observa-se também aumento da área seccional dos miócitos que caracterizam hipertrofia concêntrica (5). Acompanhando estas alterações morfológicas, observou-se piora dos parâmetros de funções sistólica e diastólica, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (6, 7, 8, 9, 10, 3).

Em humanos, Hartz e colaboradores observaram que homens com menos de 50 anos, na ausência de aterosclerose significativa e de hipertensão, apresentavam hipertrofia e hipocinesia cardíaca (11). Outros autores apontaram que o tabagismo está associado à hipertrofia e disfunção cardíaca, independentemente da aterosclerose e hipertensão arterial (12,13).

Pouco se sabe sobre os mecanismos que participam da remodelação cardíaca induzida por efeitos tóxicos da fumaça de cigarros, diretamente no coração. Dentre eles encontram-se, problemas no metabolismo energético cardíaco. (14).

O coração é um órgão que demanda grande quantidade de energia para seu funcionamento. Diariamente o coração necessita de aproximadamente 30 kg de adenosina trifosfato (ATP) para suprir seu gasto energético. A transformação adequada de energia depende da utilização de substratos, como os ácidos graxos e glicose, da massa e da função mitocondrial (14).

Considerando o coração normal, 60 a 90% do ATP formado é proveniente da oxidação de ácidos graxos. Os ácidos graxos sofrem beta-oxidação. A oxidação dos ácidos graxos resulta na formação de acetilcoenzima A (Acetil CoA), para o ciclo de Krebs (14, 15, 16).

Os carboidratos, também são fontes importantes contribuindo para formação de 10 a 40% do ATP cardíaco. A entrada de glicose na célula leva a produção de piruvato e em seguida de AcetilCoA. AcetilCoA, proveniente da metabolização de ácidos graxos ou glicose, entram no ciclo de Krebs, geram NADPH^+ e FADH_2^+ , que serão transportadores de elétrons nos complexos de I a V, da cadeia respiratória mitocondrial. Ao final, no complexo V, o gradiente de prótons gera energia para que adenosina difosfato (ADP) se ligue ao fósforo inorgânico, pela ação da ATP sintase, formando ATP.

Em condições normais a insulina se liga ao seu receptor na membrana plasmática celular. Este receptor se autofosforila e se ativa. Em seguida fosforila uma proteína de acoplamento que recruta phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K, da membrana plasmática. Este conjunto ativa a proteína quinase B, Akt, que é um mediador central dos efeitos da insulina. A Akt-1 favorece a translocação do GLUT 4 para a membrana, permitindo a entrada da glicose. Adicionalmente Akt-1 inibe o metabolismo de ácidos graxos (17).

Em condições patológicas, ou seja, durante a remodelação cardíaca, existe redução na oxidação de ácidos graxos e aumento da utilização de glicose. Isto ocorre principalmente nos estágios iniciais da remodelação cardíaca, como uma forma de proteger o coração. Isto se deve ao fato da oxidação dos ácidos graxos gastarem mais oxigênio por ATP gerado quando comparado com a glicose. Neste momento existe um estímulo para que Akt-1 favoreça a entrada de glicose no cardiomiócito, via GLUT-4. Adicionalmente Akt-1 reduz a oxidação dos ácidos graxos. Independentemente dos efeitos metabólicos a Akt-1 está associada à diminuição de apoptose, liberação de óxido nítrico, a hipertrofia e fibrose. Em situações de diminuição de ATP, aumento de estresse oxidativo, alterações no trânsito de cálcio, existe ainda estímulo para produção da proteína quinase ativada por AMP, AMPK, que participa de várias vias de sinalização. Dentre as vias de sinalização que são estimuladas pelo AMPK estão estímulo aos receptores GLUT-1 e 4, aumentando a captação de glicose, bem como a enzima óxido nítrico sintase endotelial, eNOS. O GLUT-1 favorece a entrada da glicose na célula independentemente da insulina. A eNOS estimula a síntese de óxido nítrico que atuam positivamente sobre a angiogênese, na tentativa de atrair mais oxigênio para a célula, aumentando a eficiência da mitocôndria em transformar energia. (17, 18).

Em estágios mais tardios da remodelação cardíaca, os ácidos graxos que não foram oxidados se acumulam no miocárdio sob a forma de triglicerídeos e ceramidas. Este acúmulo de lipídeos intracardíaco configura a lipotoxicidade, que promove apoptose e

disfunção cardíaca. Esta fase tardia, caracteriza-se por aumento das vias Akt-1 e AMPK, mas por redução de peroxisome proliferator activated receptor alpha, PPAR- α , e peroxisome proliferator activated receptor gamma coativador 1 alpha, PGC-1 α ., que são reguladores da oxidação dos ácidos graxos (18). Ainda que a via glicolítica esteja aumentada a síntese de ATP não é suficiente para manter a função cardíaca (17, 18).

Outro ponto importante a considerar é sobre a resistência insulínica. Indivíduos diabéticos ou obesos com resistência insulínica apresentam alterações no metabolismo energético que são particulares destas situações. Nestes casos, como a insulina não consegue ativar seu receptor existe diminuição da translocação de GLUT-4 para a membrana e diminuição da fosforilação de Akt com conseqüente redução de ATP. Adicionalmente, existe maior estímulo para captação de ácidos graxos pelos miócitos. Entretanto, estes ácidos graxos não conseguem ser totalmente oxidados e se acumulam no miócito levando à lipotoxicidade (17).

Considerando a resistência insulínica, a metformina exibe papel crucial, principalmente no contexto da pré-diabetes e diabetes. A metformina tem sua origem na planta *Galega Officinales* (galegina), descoberta em 1920. Passa a ser aprovada como droga anti-diabética classificada como biguanida, em 1957 na Europa e 1995 nos Estados Unidos. Hoje é a medicação antidiabética mais prescrita em todo o mundo. Entretanto, seus mecanismos de ação ainda permanecem por serem esclarecidos. De forma geral, aceita-se que a metformina diminui a produção hepática de glicose e aumenta a captação muscular de glicose e assim controla as concentrações plasmáticas de glicose. (19)

Estudos experimentais e clínicos preliminares sugerem que a metformina apresenta efeitos protetores cardiovasculares. Em modelos de infarto agudo do miocárdio e na ausência de diabetes, cardiomiopatia diabética e estenose aórtica, a metformina apresentou efeitos positivos em reduzir cavidade ventricular e melhorar a função. Dentre os mecanismos estudados estão AMPK, SIRT-1, FOXO, PGC-1, fator de transformação de crescimento beta (TGF-beta), colágeno, óxido nítrico sintase endotelial, eNOS, entre outros (20, 21, 22, 23).

Observa-se que alterações no metabolismo energético exercem papel crucial na remodelação cardíaca podendo estar associado à hipertrofia, formação de EROS, apoptose, menor síntese de ATP, maior gasto energético e por fim disfunção miocárdica. É possível que

a exposição à fumaça de cigarros induza alterações no metabolismo energético, explicando, em parte, a hipertrofia e a disfunção miocárdica observadas em estudos anteriores.

Desde 1984 Gvozdkakova e colaboradores observaram alterações na redução da síntese de ATP e problemas na cadeia respiratória mitocondrial em animais expostos à fumaça de cigarros. Estes autores chamaram estas alterações de “smoking cardiomyopathy”. Ao longo destes anos, outros estudos avaliaram a função e massa mitocondrial evidenciando prejuízos com a exposição à fumaça de cigarros. Entretanto, pouco se sabe sobre a metabolização de substratos no coração exposto à fumaça de cigarros. Em recente estudo realizado em nosso laboratório, observamos diminuição da atividade de enzimas da beta oxidação de ácidos graxos e aumento dos triglicerídeos cardíacos, em ratos expostos à fumaça de cigarros. (24) Estes resultados foram associados com apoptose, hipertrofia e disfunção miocárdica. Zhou e colaboradores mostraram que a trimetazidina, que é o agente que reduz a beta oxidação e aumenta a via glicolítica por favorecer a síntese de ATP e economizar energia, atenuou a remodelação cardíaca induzida pela exposição à fumaça de cigarros (25). Entretanto, não estudou as vias metabólicas envolvidas. Outro estudo em humanos mostrou que o tabagismo esteve associado com aumento de ácidos graxos livres circulantes e com resistência insulínica (26). Não se sabe se o metabolismo da glicose no coração de animais expostos à fumaça de cigarros está comprometido. O papel da metformina na cardiomiopatia induzida pelo fumo permanece por ser estabelecida.

Considerando, que o tabagismo é hábito frequente na população mundial, a principal causa de mortalidade evitável, tóxico ao miocárdio podendo levar a insuficiência cardíaca, justificou-se o estudo de mecanismos envolvidos nas lesões cardíacas induzidas pelo tabaco. Um destes mecanismos é a influência da exposição à fumaça de cigarros sobre as vias metabólicas cardíacas, pois estas permaneciam por serem elucidadas. Para este estudo escolhemos avaliar o tratamento com metformina, por meio do índice de vias da utilização da glicose, por meio da avaliação da expressão da SIRT-1, FOXO-1, Akt-1, AMPK, GLUT-4, GLUT-1 e por meio da atividade de enzimas da via glicolítica como fosfofrutokinase, lactato desidrogenase, piruvato desidrogenase, complexos mitocondriais e ATP sintase, NAD/NADH . Avaliamos possíveis alterações que podem contar com a participação destas vias como variáveis ecocardiográficas morfológicas e funcionais e em variáveis histológicas como hipertrofia e número de capilares.

OBJETIVOS

Os objetivos do trabalho foi avaliar o papel da metformina na remodelação cardíaca induzida pela fumaça de cigarro, por meio da avaliação morfofuncional cardíaca, do estresse oxidativo, do metabolismo energético, e expressão de proteínas que participam do metabolismo da glicose.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento

Foram utilizados 60 ratos Wistar machos, pesando entre 200-250g. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com livre acesso à água, controle de luz (ciclos de 12 horas), de temperatura (aproximadamente 25° C) e de umidade. A ração desses animais foi pesada diariamente e a oferta foi definida de acordo com a média dos ratos que ingeriram menos ração por cada grupo para evitar a obesidade e manter o controle do peso afim de que tivéssemos certeza de que as alterações estudadas se davam pela intervenção e pelo tratamento. A metformina foi diluída em água almejando ingestão de 250mg/kg/dia. O bebedouro em que era ofertada a água era graduado em 500ml, descontávamos a sobra que se acumulava na parte inferior do bebedouro, que era próxima de 50ml. A solução nos bebedouros eram misturadas por inversão todos os dias para evitar o depósito do medicamento no fundo da garrafa.

Os animais foram divididos em 4 grupos: grupo F (n=15), formado por animais expostos à fumaça do cigarro; FM (n=15) formado por animais expostos à fumaça do cigarro e com ingestão de metformina diluída na água; grupo controle C (n=15) e grupo CM (n=15) que recebeu metformina diluída em água durante os 2 meses de observação. Este modelo foi o mesmo utilizado por Yin M, 2011, em animais infartados e não diabéticos (21)

O tempo de observação de 2 meses foi definido baseado em trabalhos anteriores do nosso grupo, onde esse tempo de exposição à fumaça do cigarro foi suficiente para induzir os efeitos deletérios característicos da remodelação cardíaca (9). Em relação ao tamanho amostral, considerou-se 15 o número adequado de animais por grupo, visto que esse número foi suficiente em estudos anteriores para mostrar as diferenças entre os grupos.

A exposição ao fumo

Para expor os animais à fumaça de cigarro, foi utilizado o método proposto por Wang et al, já padronizado em nosso laboratório (6, 9, 27-29). Os ratos foram colocados em câmara transparente, cujas medidas são, aproximadamente, 95x80x65 cm; a câmara foi conectada ao dispositivo para produção de fumaça dos cigarros. A fumaça dos cigarros foi

aspirada por vácuo e veiculada para câmara em que estavam alojados os animais e expostos durante período de 30 minutos à fumaça do cigarro. Após esse período, a fumaça foi exaurida e o procedimento repetido. Na primeira semana, a fumaça foi obtida a partir de cinco cigarros, duas vezes por dia no período da tarde, com intervalos de descanso de 10 minutos. O número de cigarros foi aumentado para o total de 10 cigarros/30 minutos, duas vezes no período da manhã e duas vezes no período da tarde. Durante o restante do período de estudo experimental, os animais foram expostos à fumaça de 40 cigarros/dia. O cigarro utilizado, cigarro comercial comum, apresenta a seguinte composição: 1,1 mg de nicotina, 14 mg de alcatrão e 15 mg de monóxido de carbono.

Pressão Arterial Caudal

Após 2 meses de tratamento, os animais foram submetidos à aferição da pressão arterial caudal. Os animais foram colocados em uma caixa de madeira forrada com maravalha, onde na tampa ficava acoplada uma lâmpada incandescente que era possível ajustar a intensidade de luz que era emitida e consequentemente a temperatura dentro da caixa. Dessa forma, os animais eram aquecidos para que a artéria da cauda fosse dilatada e a pressão pudesse ser aferida mais facilmente e mais rapidamente para que fosse possível obter o fluxo sanguíneo arterial. Este aparelho fornece manualmente o valor da pressão arterial caudal.

Avaliação funcional “in vivo”

Avaliação Doppler-ecocardiográfica

Os exames Doppler-ecocardiográficos foram realizados por um único examinador no início e ao final do período experimental. Os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50mg/Kg, i.p.) e cloridrato de xilidino (1mg/Kg, i.p.). Após tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em leve decúbito lateral esquerdo para a realização do exame. Foi utilizado o equipamento modelo Vivid S6 (*General Electric Medical Systems*, Israel), dotado de transdutor ultrassônico multifrequencial de 5,0-11,5 MHz. Para realizar as medidas estruturais do coração, as imagens foram obtidas em modo monodimensional (modo-M) orientado pelas imagens em modo bidimensional, com o transdutor em posição paraesternal, eixo menor. A avaliação do ventrículo esquerdo (VE) foi realizada posicionando o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral no nível dos músculos papilares. As imagens da aorta e do átrio esquerdo foram obtidas posicionando o

curso do modo-M ao nível do plano da valva aórtica. As seguintes estruturas cardíacas foram medidas: diâmetros diastólico (DDVE) e sistólico (DSVE) do VE; espessuras diastólicas da parede posterior do VE e do septo interventricular (EDPP e EDSIV); diâmetros da aorta (AO) e do átrio esquerdo (AE). A espessura relativa do VE (ERVE) foi calculada dividindo-se a EDPP multiplicada por dois pelo DDVE. A massa do VE (MVE) foi calculada pela fórmula $[(DDVE + EDPP + EDSIV)^3 - (DDVE)^3] \times 1,04$, onde 1,04 representa a densidade específica do miocárdio. O índice de MVE (IMVE) foi calculado normalizando a MVE para o peso corporal. A função sistólica do VE foi avaliada pela porcentagem de encurtamento endocárdico ($\% \Delta \text{ endo}$) $[(DDVE - DSVE) / DDVE] \times 100$ e pela fração de ejeção (FE) $[(DDVE^3 - DSVE^3) / DDVE^3] \times 100$. A função diastólica do VE foi avaliada pelos seguintes índices: pico de velocidade do enchimento diastólico inicial (onda E); pico de velocidade do enchimento diastólico tardio (onda A); razão entre as ondas E e A (E/A); tempo de desaceleração da onda E (TDE); tempo de relaxamento isovolumétrico em valores absolutos (TRIV) e normalizados pela frequência cardíaca ($TRIVn = TRIV/RR^{0,5}$).

Eutanásia

No dia seguinte à realização do ecocardiograma, os animais foram submetidos a um período de jejum de 12 horas antes da realização da eutanásia, que foi realizada por meio da administração de dose excessiva de tiopental sódico 150 mg/kg, intraperitonal. Em animais que não alcançaram anestesia profunda, foram administradas doses adicionais de anestésicos até completa anestesia. Após a anestesia profunda, foi adotado método secundário de eutanásia, a decapitação, então o tórax foi aberto e foi coletado e armazenado o material biológico, como o coração, fígado e sangue dos animais. O material biológico coletado foi congelado e armazenado a -80°C .

Estudo histológico utilizando imunofluorescência

Os corações de todos os animais tiveram o VE seccionado a 4 mm, a partir do ápice, em fragmento de 3 mm de espessura, que foi fixado em solução de formol tamponado a 10% por período de 48 horas. Após fixação, o tecido foi incluso em blocos de parafina, obtendo-se, a seguir, cortes coronais para posterior análise histológica.

Fragmentos do coração foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C para avaliação de GLUT-4 e GLUT-1 por imunofluorescência em parafina.

O tecido foi fixado em lâmina “starfrost” ou em lâmina de vidro comum com silano. As lâminas foram aquecidas por 5 a 10 minutos, em estufa a 60°C . Em seguida lâminas foram colocadas em um bercinho plástico e em imersão em Xylol (1) (5 min), Xylol (2) (5min), álcool 100% (1), álcool 100% (2), álcool 90% e álcool 70%. Depois, as lâminas foram imersas em ácido cítrico e aquecidas no microondas (3X de 1 minuto). Foram deixadas para esfriar por 20 minutos. O corte foi contornado com caneta própria (Super PAP Pen Liquid Blocker). Foram lavadas com água 1x e com PBS 2x de 2 min. Os cortes foram bloqueados com albumina 5% por 30 minutos e lavados com PBS. O anticorpo primário foi aplicado sobre os tecido e mantido até o dia seguinte. Foi utilizado anticorpo primário já fluorescente. Wheat germ agglutinin (WGA- FITC) Sigma L4895 – é fluorescente portanto não necessita de anticorpo secundário. Esta marcação foi utilizada para avaliação da área seccional dos miócitos. Para o anticorpo primario isolectin GS IB-4 (I21414) biotinilado foi utilizado o anticorpo secundário: Streptavidina Cy3 (43-4315). Esta marcação de células endoteliais foi utilizada para a contagem do número de capilares. Para avaliação do GLUT-4 usamos o anticorpo - Anti-Glucose Transporter GLUT4 antibody [mAbcam48547] (FITC) que já é conjugado com o fluorófilo verde. Para avaliação do GLUT-1 utilizamos anti-glucose transporter GLUT1 Antibody (ab40084) e como anticorpo secundário Alexa Fluor[®] 594-conjugated Goat polyclonal anti mouse IgG (1/250).

Em seguida, foram lavadas com PBS – 3X de 2 minutos. Foi aplicado DAPI - 1:1000 por 5 min. Foi lavada com PBS. Foi aplicado meio Prolong gold antifade (P36934), foi coberta com lamínula e fixadas bordas com esmalte. Foi protegida da luz. Foi analisada em microscópio confocal com excitação e emissão entre 400 – 600 nm.

As imagens foram adquiridas em objetiva 40X em microscópio de fluorescência Olympus serie BX acoplado a câmera de vídeo, que enviou imagens digitais a um computador dotado de programa de análise de imagens Image Pro-plus (Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Foram mensuradas 50 a 70 células por ventrículo analisado. Os miócitos selecionados foram seccionados transversalmente. As áreas seccionais médias obtidas para cada grupo foram utilizadas como indicador do tamanho celular. A avaliação da angiogênese

foi realizada pela contagem do número de capilares por número de miócitos. O GLUT-4 e GLUT-1 foram avaliados quanto a sua presença no citoplasma e membrana.

Western Blot

A expressão das proteínas Akt-total e Akt fosforilado, Foxo acetilado/ total, Glut1 e 4 da membrana plasmática. Foram realizadas pela técnica Western Blot seguindo as seguintes etapas: extração tecidual de proteínas, eletroforese em gel, transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose, identificação das proteínas por anticorpos específicos e quantificação das bandas por densitometria. A expressão dos peptídeos foi normalizada pela expressão da proteína constitucional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ou pela β -actina.

Extração das proteínas miocárdicas

Inicialmente, fragmentos amostrais (80-100 mg) foram homogeneizados com 1 mL de tampão de extração contendo NaCl 100 mM, TritonX-100 1% (v/v), desoxicolato de sódio 0,5% (w/v), SDS 0,1 % (w/v), glicerol 10% (v/v) Tris 10 mM (ph 7,4), EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, ortovanadato de sódio 1 mM, NaF 10 mM e inibidores de proteases (P2714, Sigma- Aldrich). O homogenato foi centrifugado por 20 min, a 12000 rpm a 4° C, para eliminação de material insolúvel. O sobrenadante foi coletado e separado em alíquotas, que foram armazenadas a -80° C. A concentração de proteína total foi analisada pelo método de Bradford utilizando a curva de BSA Protein Standard como padrão.

Eletroforese em gel

Após a quantificação da concentração proteica as amostras cardíacas foram diluídas em tampão Laemmli (Tris - HCL 240mM, SDS 0,8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02% e β -mercaptoetanol 200mM) e separadas por eletroforese utilizando sistema Mini -Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio - Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico, de empilhamento (Tris - HCL 240mM pH 6,7, poliacrilamida 40%, APS e Temed) e de resolução (Tris - HCL 240mM pH 8,9, poliacrilamida 40%, glicerol, APS e Temed) a 4° C com 20 μ g de proteína total. A concentração do gel de empilhamento utilizada foi determinada de acordo com o peso molecular da proteína analisada. No primeiro poço do gel foi aplicado um padrão de peso molecular, *Kaleidoscope PrestainedStandards* (Bio Rad, Hercules, CA, USA). A corrida

eletroforética foi efetuada a 30 min a 50 V e 2:30 h a 120 V (Power Pac HC 3.0A, Bio - Rad, Hercules, CA, USA) com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%).

Transferência e identificação das proteínas

Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini - Trans Blot (Bio - Rad, Hercules, CA, USA), foi utilizado tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução de 5% de leite em pó desnatado, dissolvido em solução basal pH 8,0 (Tris 1M pH 8,0, NaCl 5M e detergente Tween 20) por 120 minutos à temperatura ambiente sob constante agitação. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário diluído na solução basal, sob agitação constante por 12 horas. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal e incubada com o anticorpo secundário diluído em solução basal por 1:30 horas sob agitação constante. Para remover o excesso de anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal pH 8,0. Por fim, a imunodeteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, USA). As membranas de nitrocelulose foram reveladas em um aparelho fotodocumentador ligado a um computador capaz de fotografar as membranas expostas ao reagente quimioluminescente, nos tempos padronizados para cada proteína estudada.

Anticorpos primários

- Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP® Antibody mAb, rabbit IgG polyclonal (Cell Signaling technology, cs 9272)
- Akt Antibody rabbit polyclonal (Cell Signaling technology, cs 9272)
- GAPDH mouse monoclonal IgG1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 32233)
- FOXO-1 (C29H4) Rabbit IgG mAb (Cell Signaling technology, cs 2880S)
- FOXO-1 acetilado Antibody, rabbit polyclonal (Cell Signaling technology, cs 9464S)
- GLUT- 1 e 4 (Abcam)

Anticorpos secundários

- Goat anti-rabbit IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Europe, sc 2004)

Enzimas do Metabolismo energético

A atividade da lactato desidrogenase (LDH) foi determinada com a utilização do método UV otimizado, em que foi medido o consumo de NADH_2 , que é proporcional à atividade da enzima presente na amostra. A atividade da fosfofrutoquinase (PFK) foi determinada em meio contendo tampão TRIS-HCl (50mM; pH 8,0), MgCl_2 , gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, aldolase, trifosfato isomerase, ATP e frutose-6-fosfato, com medidas da velocidade de oxidação do NADH_2 . Na presença de tampão fosfato de potássio (50mM; pH 7,4) foi determinada a atividade da piruvato desidrogenase (PI-DH), em mistura reativa contendo NAD, tiamina pirofosfato, coenzima A, ditiotreitól, MgCl_2 , NBT, piruvato de sódio e fenazina metassulfato, em que mede-se a conversão do piruvato em acetil-CoA através da velocidade da redução do NAD (BASS *et al*, 1969). A reação de condensação entre o grupamento acetil da molécula de acetil-CoA e oxaloacetado, reação catalisada pela citrato sintase (CS), cuja atividade foi determinada na presença dos substratos acetil-CoA e oxaloacetato e DTNB em tampão fosfato Tris-HCl 50mM, pH 8,0. A atividade da β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (β -OH-acil CoA-DH) foi determinada na presença de tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,0, EDTA, acetoacetil-CoA e NADH. A atividade da NADH-desidrogenase (complexo I) foi determinada em um sistema de reação composto por tampão fosfato de sódio 80mM pH 7,4, EDTA e NADH, em que se monitora a velocidade de oxidação do NADH. A atividade enzimática da succinato desidrogenase (complexo II) foi medida em meio a tampão fosfato de potássio (50mM; pH 7,4), contendo succinato de sódio, fenasina metassulfato e DPIP, o qual teve absorbância a 600nm diminuída. A atividade da ATP sintetase foi determinada em meio tamponado (Tris-HCl 50mM; pH 8,0), na presença de MgCl_2 , NADH, fosfoenolpiruvato, ATP, LDH e piruvato quinase(30).

Análise estatística

Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão quando apresentaram distribuição normal. Em relação às variáveis de distribuição não normal, os dados foram

apresentados em mediana e percentis. As comparações entre os grupos foram feitas pelo teste Anova de 2 fatores (vias), considerando fator 1, o fumo e fator 2 a metformina. Quando houve interação entre os fatores, o próprio programa estatístico sugere o pós teste, que nesse caso foi o Holm-Sidak, que comparou os grupos (C x M); (C x F); (M x FM) e (F x FM). O teste de Anova de 2 vias só pode ser realizado quando os dados apresentam distribuição normal. Portanto, quando os dados não apresentaram distribuição normal, foram transformados. Nesse estudo as transformações com logaritmo neperiano foram possíveis para alguns dados. O nível de significância adotado foi de 5%, para o teste com as variáveis normalizadas. Quando não houve interação, o teste de Anova de 2 fatores considera as seguintes comparações (M e C) como um grupo, não exposto ao fumo e (F e FM) como outro grupo exposto ao fumo. Nessa comparação, exposto ou não à fumaça de cigarros é calculado um valor de p fumo. Outra situação, quando não há interação é a comparação entre o grupo não exposto à metformina (C e F) e grupo exposto à metformina (M e FM), para a qual é calculado o valor de p met.

Entretanto, alguns dados como o ecocardiograma não foi possível de serem normalizados, mesmo após tentativas de varias transformações numéricas, como logaritmo neperiano, logaritmo na base 10, exponencial, quadrado, etc. Nesses casos, os dados foram comparados com teste t de Student, par a par considerando (C x M); (C x F); (M x FM) e (F x FM). Como foram realizadas 4 comparações foi utilizada a correção de Bonferroni e o nível de significância aceito foi de $p=0,05/4$ ou seja, $p=0,0125$. Após a análise estatística os resultados foram apresentados em tabelas e gráficos. Para facilitar a visualização das diferenças entre os grupos, apenas os valores de p que indicaram diferença significativa foram descritos.

O software utilizado foi o Sigma Plot 12.0. e GraphPad Prism 6.0.

RESULTADOS

A tabela 1 mostra os dados ecocardiográficos. Os animais F tiveram aumento do átrio esquerdo (AE), do diâmetro do ventrículo esquerdo (DDVE), da massa do ventrículo esquerdo (IMVE), da espessura relativa da parede (ERP) seguido de disfunção diastólica. A metformina atenuou o tamanho do AE, a ERP, a disfunção diastólica em animais F. Os dados não puderam ser normalizados e, portanto, foram comparados com o teste t de Student. A diferença entre os grupos pode ser vista pelo valor de p para comparação entre os grupos. A tabela 3 e a figura 1 mostram o índice dos capilares divididos por número de miócitos. Apenas o grupo FM apresentou maior razão capilar por número de miócitos, quando comparado ao grupo M.

Em relação aos mecanismos potencialmente envolvidos, observou-se que a exposição à fumaça de cigarros aumentou a formação de hidroperóxido de lipídeos, mas a associação com metformina e fumo aumentou ainda mais. Porém a metformina, independentemente da exposição ao fumo, aumentou a atividade das enzimas antioxidantes catalase e superóxido dismutase, como mostra a tabela 4. Em relação ao metabolismo energético, observou-se que o fumo independentemente da metformina reduziu a atividade dos complexos I e ATP sintase. Já a metformina aumentou a atividade do complexo I, II e ATP sintase, independentemente da exposição à fumaça de cigarros. Não houve interação entre fumo e metformina para o metabolismo energético, como mostra a tabela 5.

Em relação a expressão de proteínas do metabolismo da glicose observou-se que AKT fosforilado/AKT total diminuíram com o fumo e foram atenuados pela metformina, como mostra a tabela 6. Nos grupos expostos à fumaça de cigarros, observou-se que a metformina aumentou a expressão de GLUT-4 na membrana, evidenciado pela análise por western blot. As imagens da imunohistoquímica corroboram os achados do western blot, mostrando maior concentração de GLUT-4 em algumas células que estão bem marcadas, no grupo FM. As fotos dos geis de western blot estão representadas na figura 3. A ordem de aplicação das proteínas nos geis para avaliação de AKT e FOXO foram C, F, M e FM e para avaliação de GLUT1 e 4 foram C, M, F e FM. A avaliação de AKT e FOXO foram realizadas por meio da razão do produto da sua fosforilação ou acetilação, respectivamente, pela expressão total da proteína. Por isso, para AKT e FOXO não foram considerados as correções por beta actina.

Tabela 1 – Avaliação do peso, da pressão arterial média e da frequência cardíaca de ratos Wistar expostos ou não à fumaça de cigarros e que receberam ou não metformina.

	C	M	F	FM	P int	Pmet	Pfumo
Peso	508,5±29,6	488,2±25,4	504,9±39,9	492,9±47,1	-	-	-
P.A.	206±5,5	198,7±18,6	185±20,9	190,6±17,9	-	-	-
F.C.	262,6±25,9	268,5±32,6	265,1±38,2	246,6±21,4	-	-	-

PAM: pressão arterial média; FC: frequência cardíaca. Os dados são expressos em média $\pm$ desvio-padrão. O nível de significância de 5%. Os dados foram comparados por Anova de duas vias e não houve diferenças entre os grupos. (-): $P>0,05$.

C: grupo controle; M: grupo que recebeu metformina; F: grupo exposto à fumaça de cigarros; FM: grupo exposto à fumaça de cigarros e que recebeu metformina.

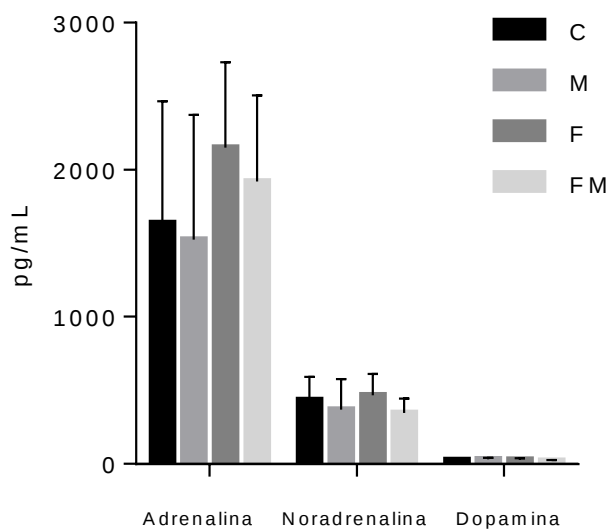


Figura 1. Dosagem de catecolaminas séricas, por cromatografia líquida de alta resolução de ratos Wistar expostos ou não à fumaça de cigarros e que receberam ou não metformina. C: grupo controle; M: grupo que recebeu metformina; F: grupo exposto à fumaça de cigarros; FM: grupo exposto à fumaça de cigarros e que recebeu metformina. $P>0,05$ para todas as comparações.

Tabela 2 – Avaliação morfológica e funcional por meio de ecocardiografia transtoracica, de ratos Wistar expostos ou não à fumaça de cigarros e que receberam ou não metformina.

	C	M	F	FM	P (FXC)	P(CXM)	P(FXFM)	P(MXFM)
AE/AO	1,18±0,02	1,18±0,01	1,38±0,01	1,19±0,02	<0,0001	-	-	-
AE	4,6±0,1	4,5±0,2	5,4±0,3	4,7±0,2	<0,0001	-	<0,001	-
DDVE	7,1±0,5	7±0,4	6,6±0,4	6,8±0,4	<0,0001	-	-	-
DSVE	3,2±0,5	2,8±0,4	3,1±0,3	2,8±0,3	-	-	0,009	-
PP	1,4±0,1	1,4±0,1	1,9±0,1	1,5±0,1	<0,0001	-	<0,001	0,002

SIV	1,5±0,1	1,5±0,1	2,0±0,1	1,6±0,1	<0,0001	-	0,011	-
Área AE	15,7±1,6	17,1±1,8	25,1±2,4	17,6±2,1	<0,0001	-	<0,0001	-
Área AD	12,9±1,4	13,3±1,7	16,9±1,9	13,8±1,4	<0,0001	-	-	-
E	74,8±4,3	81,7±8,3	76,1±3,8	75,2±6,1	-	-	-	-
A	44,3±4,9	49±7,1	47,5±11,5	45,8±4,3	-	-	-	-
TRIV	21,8±2,2	23,1±1,3	28,7±5	22,7±1,6	<0,0001	-	<0,003	-
TDE	41,9±3,1	43,4±3,2	57,1±6,7	45,5±21,4	<0,0001	-	<0,0001	-
2PP/DDVE	0,4±0,09	0,40±0,08	0,59±0,01	0,45±0,13	<0,0001	-	0,003	-
IMVE	1,33±0,04	1,29±0,05	1,80±0,05	1,36±0,04	<0,0001	-	<0,0001	-
FE	0,91±0,005	0,93±0,005	0,89±0,007	0,93±0,007	-	-	0,001	-

DDVE : diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo; DSVE : diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo ; PP : espessura da parede posterior diastólica; 2PP/DDVE ou ERP : espessura relativa da parede do ventrículo esquerdo; IMVE : índice de massa do ventrículo esquerdo ; E / A : relação entre as ondas E / A ; TDE : tempo de desaceleração da onda E ; TRIV : tempo de relaxamento isovolumétrico corrigido pela frequência cardíaca. IMVE: índice de massa do VE; FE: fração de ejeção. Os dados são expressos em média ± desvio-padrão. A distribuição dos dados para a comparação por Anova de duas vias não atingiu a normalidade ou puderam ser transformados em dados normais, por isso foram comparados par a par, seguido da correção por Bonferroni. Portanto, o nível de significância admitido foi de 0,012. Quando nível de significância foi maior que 0,012 foi utilizado (-).

C: grupo controle; M: grupo que recebeu metformina; F: grupo exposto à fumaça de cigarros; FM: grupo exposto à fumaça de cigarros e que recebeu metformina.

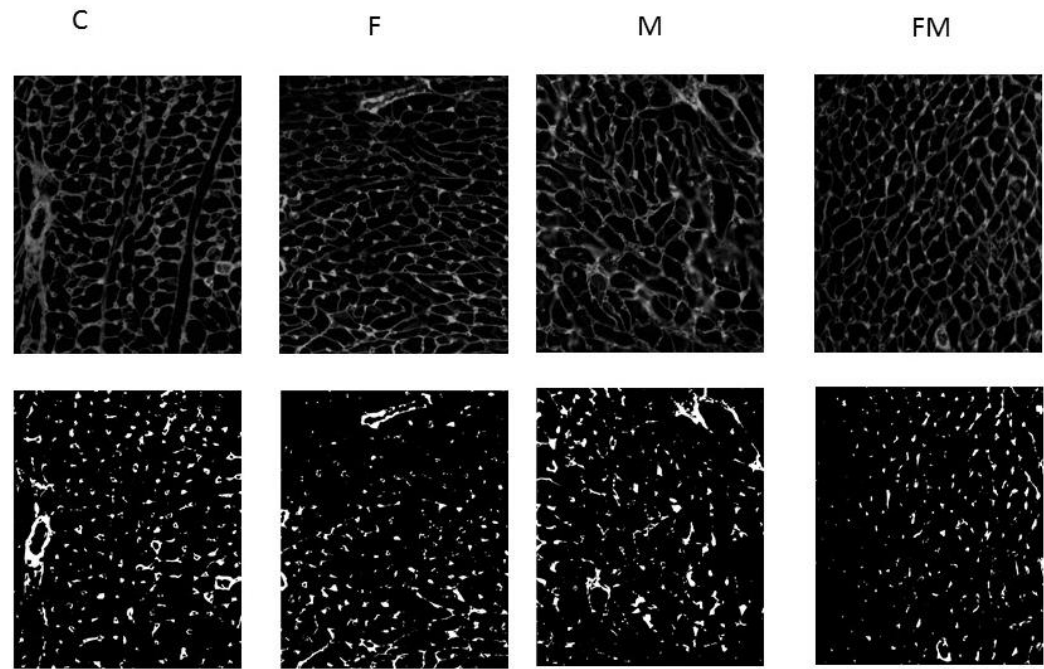
Tabela 3 – Razão entre capilares e miócitos de ratos Wistar expostos ou não à fumaça de cigarros e que receberam ou não metformina.

	C	M	F	FM	P(FXC)	P(CXM)	P(FXFM)	P(MXFM)
Capilares/miócitos	1,18±0,16	1,21±0,14	1,31±0,14	1,32±0,14	-	-	-	0,01

C: grupo controle; M: grupo que recebeu metformina; F: grupo exposto à fumaça de cigarros; FM: grupo exposto à fumaça de cigarros e que recebeu metformina.

A distribuição dos dados para a comparação por Anova de duas vias não atingiu a normalidade ou puderam ser transformados em dados normais, por isso foram comparados par

a par, seguido da correção por Bonferroni. Portanto, o nível de significância admitido foi de 0,012. Quando nível de significancia foi maior que 0,012 foi utilizado (-).



As quatro imagens da primeira linha mostram a área seccional dos miócitos. As imagens da linha debaixo mostram os capilares e vasos nos mesmos cortes. C: grupo controle; M: grupo que recebeu metformina; F: grupo exposto à fumaça de cigarros; FM: grupo exposto à fumaça de cigarros e que recebeu metformina.

Tabela 4 – Avaliação da atividade das enzimas do metabolismo energético cardíaco de ratos Wistar expostos ou não à fumaça de cigarros e que receberam ou não metformina.

	C	M	F	FM	P (FXC)	P (CXM)	P (FXFM)	P (MXFM)	P int	met	P
PTF	35,1±4,82	35,1±3,63	35,0±3,63	36,4±3,61	-	-	-	-	-	-	-
HPX	205±19,6	233±48,7	450±48,8	597±53,6	<0,001	-	<0,001	<0,001	0,002	-	-
Catalase	44,9±8,65	49,1±8,43	37,1±8,43	47,0±9,66	-	-	-	-	0,33	0,021	0,09
SOD	7,00±1,19	9,16±2,02	6,70±2,02	10,3±2,40	-	-	-	-	-	0,001	-

SOD : superóxido dismutase.HPX: hidroperóxido de lipídeo
Os dados que apresentaram distribuição normal foram comparados por Anova de 2 vias e os que não apresentaram foram transformados em logaritmo neperiano atingindo a normalidade. Quando houve interação as diferenças grupo a grupo foram indicadas pelo valor de P de cada comparação. Quando não houve interação, mas houve diferenças pela presença ou não de metformina ou do fumo, também

foram indicados pelo P met ou P fumo. Quando nível de significancia foi maior que 0,05 foi utilizado (-). C: grupo controle; M: grupo que recebeu metformina; F: grupo exposto à fumaça de cigarros; FM: grupo exposto à fumaça de cigarros e que recebeu metformina.

Tabela 5 – Avaliação da atividade das enzimas estresse oxidativo cardíaco de ratos Wistar expostos ou não à fumaça de cigarros e que receberam ou não metformina.

	C	M	F	FM	P int	P met	P fumo
PFK	116,64±23,27	122,31±28,78	159,51±28,78	157,47±25,15	-	-	0,001
PDH	172,98±33,25	215,35±30,77	141,56±30,77	167,45±53,35	-	0,032	0,014
β-OHCoA	21,33±4,91	17,59±3,62	17,71±3,62	22,15±7,66	0,05	-	-
Complexo I	11,01±2,31	15,55±3,18	4,69±3,18	5,99±1,65	0,06	0,001	<0,001
Complexo II	2,98±0,51	3,79±0,79	3,37±0,79	3,91±1,03	-	0,03	-
ATP sintase	19,88±3,76	25,01±5,26	14,45±5,26	14,97±4,64	-	0,04	<0,001

Quando nível de significancia foi maior que 0,05 foi utilizado (-). C: grupo controle; PDH: piruvato desidrogenase; β-OHCoA:Beta hidróxi-CoA desidrogenase M: grupo que recebeu metformina; F: grupo exposto à fumaça de cigarros; FM: grupo exposto à fumaça de cigarros e que recebeu metformina.

Tabela 6– Quantificação proteica por Western Blot de proteínas associadas ao metabolismo da glicose no coração de ratos Wistar expostos ou não à fumaça de cigarros e que receberam ou não metformina.

	C	CM	F	FM	P(FXC)	P(CXM)	P(MXFM)	P(FXFM)	Pint	Pmet	Pfumo
FOXO						-	-		-	-	-
AC/FOXO	0,75±1,10	0,27±0,23	0,26±0,22	0,30±0,45	-			-			
AKT fosf/AKT	0,18±0,13	0,15±0,08	0,08±0,02	0,19±0,14	0,03	-	-	0,003	0,04	-	-
Glut 1						-	-		-	-	-
membrana	0,75±1,10	0,27±0,23	0,26±0,22	0,30±0,45	-			-			
Glut 4						-	0,03		0,006		
membrana	0,56±0,33	0,23±0,15	0,34±0,36	0,52±0,22	-			0,005			

FOXO: forkhead box O, AC: acetilado, AKT: proteína quinase B; fosf: fosforilada, Glut: transportador de glicose. Quando nível de significancia foi maior que 0,05 foi utilizado (-). C: grupo controle; M: grupo que recebeu metformina; F: grupo exposto à fumaça de cigarros; FM: grupo exposto à fumaça de cigarros e que recebeu metformina.

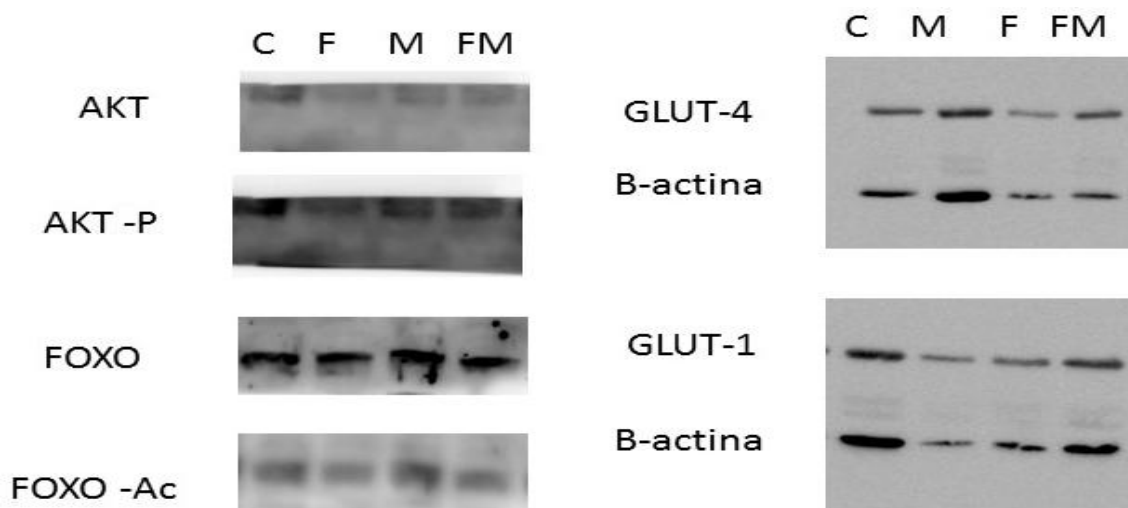


Figura 2. Imagens dos geis de Western blot para expressão de proteínas do metabolismo da glicose no coração de ratos expostos ou não à fumaça de cigarros e que receberam ou não metformina. C: grupo controle; M: grupo que recebeu metformina; F: grupo exposto à fumaça de cigarros; FM: grupo exposto à fumaça de cigarros e que recebeu metformina.

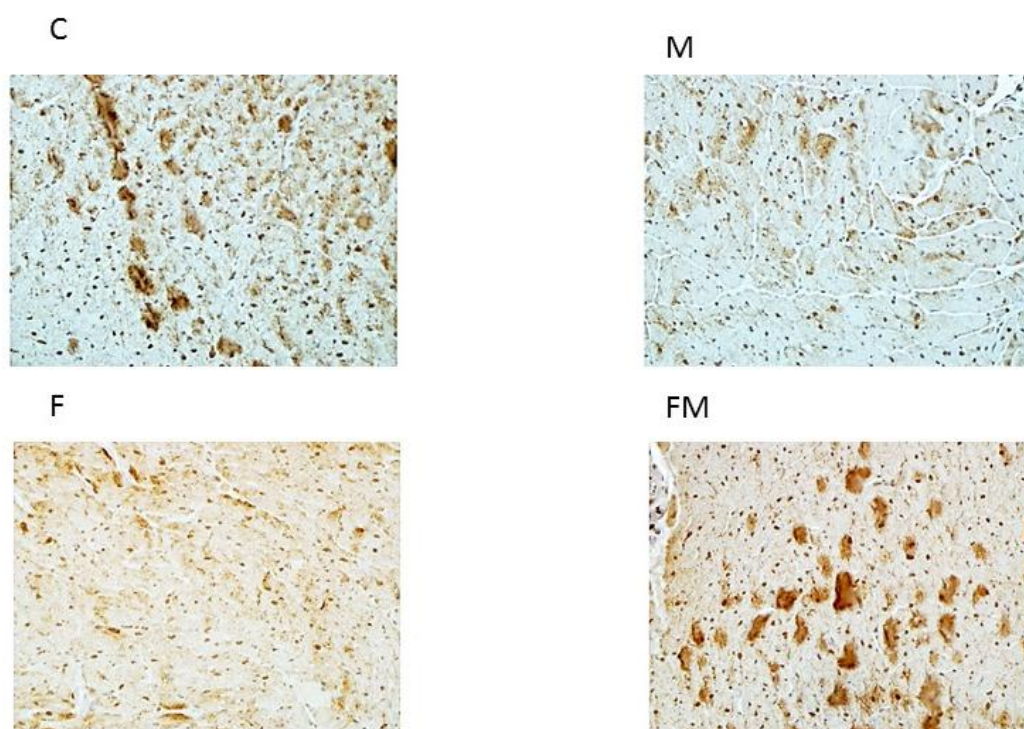


Figura 3. Imunohistoquímica do GLUT4. C: grupo controle; M: grupo que recebeu metformina; F: grupo exposto à fumaça de cigarros; FM: grupo exposto à fumaça de cigarros e que recebeu metformina.

DISCUSSÃO

Os animais dos grupos controle, controle tratado com metformina, fumo e fumo tratado com metformina não apresentaram diferença estatística para as variáveis peso, pressão arterial e frequência cardíaca e dosagem sérica de catecolaminas. A fumaça de cigarros pode agredir o coração de forma direta, desencadeando o processo de remodelação. Outra forma de agressão indireta pode ocorrer por meio da elevação da pressão arterial, alterações de lípidos etc (3). Os dados do presente estudo corroboram as hipóteses que sugerem lesão direta sobre o coração, independentemente de seus efeitos periféricos, vasculares e hemodinâmicos (3, 13). Embora as concentrações de catecolaminas sejam semelhantes entre os grupos, estudos prévios mostraram que há participação do sistema adrenérgico na lesão miocárdica induzida pelo fumo (10)

Os animais EFC tiveram aumento do átrio esquerdo (AE), do diâmetro do ventrículo esquerdo (DDVE), da massa do ventrículo esquerdo (IMVE), da espessura relativa da parede (ERP) seguido de disfunção diastólica. De fato em estudos prévios, Azevedo et al, mostraram que os animais EFC podem apresentar diferentes tipos de geometria cardíaca, normal (ERP normal e IMVE normal), remodelação concêntrica (ERP aumentada e IMVE normal), hipertrofia concêntrica (ERP aumentada e IMVE aumentado) e hipertrofia excêntrica (ERP normal e IMVE aumentado). No presente estudo observa-se aumento da ERP e do IMVE sugerindo a presença de hipertrofia concêntrica (31). A hipertrofia concêntrica em geral associa-se mais à disfunção diastólica do que sistólica. Entretanto, esse tipo de alteração merece atenção por ser reversível com o controle dos fatores de risco. Caso não haja controle dos fatores de risco, a hipertrofia concêntrica está associada a maior chance de evolução desfavorável, como insuficiência cardíaca e mortalidade (32).

A metformina atenuou o tamanho do AE, a ERP, a disfunção diastólica em animais EFC. Adicionalmente, a metformina melhorou a função sistólica nos animais EFC. Em 1998, o ensaio clínico multicêntrico UKPDS (United Kingdom prospective Diabetes Study) mostrou que indivíduos obesos e diabéticos em uso de metformina apresentaram menor mortalidade e infarto agudo do miocárdio que os pacientes tratados apenas com dieta. Adicionalmente, os pacientes tratados com metformina apresentaram menor mortalidade por qualquer causa, quando comparado com pacientes em uso de outros medicamentos como sulfonilureias. A partir de então, surgiu a hipótese que a metformina pode ter um efeito

protetor cardiovascular direto. Entretanto, existem poucos estudos em pacientes não diabéticos, alguns após infarto agudo do miocárdio com resultados controversos (33, 34).

Em relação ao uso de metformina e a exposição à fumaça de cigarros, observou-se que a metformina reduziu a toxicidade cerebral induzida pela fumaça de cigarro e inibiu lesões paraneoplásicas no rim e pulmões. Entretanto, não encontramos estudos que avaliaram o efeito da metformina no coração de ratos expostos à fumaça de cigarros (35, 36, 37).

Em relação aos mecanismos de ação da metformina são descritos ação de redução da glicose hepática por ação da metformina em reduzir o complexo I e gerar menos ATP. Para o equilíbrio energético existe estímulo a ação do AMPK com acúmulo de reserva de energia, que bloqueia a ação do glucagon, inibindo a glicogênese e facilitando a glicólise. Já na musculatura, esquelética, por exemplo, que é mais estudada, a metformina estimula fosforilação de proteínas quinases que promovem o deslocamento do GLUT4 para a membrana facilitando a captação de glicose (19, 38). Os resultados do presente estudo mostraram que no coração a avaliação da atividade das enzimas do metabolismo energético não tiveram interação entre fumo e metformina. Assim, a análise é feita baseada em um ou outro fator, independentemente. Houve maior atividade da enzima fosfofrutoquinase nos grupos expostos ao fumo, sem influência da metformina; menor atividade da enzima piruvato desidrogenase nos grupos fumantes e ação de metformina de aumentar essa enzima nos animais expostos ou não à fumaça de cigarros. Em relação à fosforilação oxidativa que acontece na membrana interna da mitocôndria, os complexos 1, 2 e ATP sintase tiveram aumento nos animais que receberam metformina. Houve ainda diminuição da atividade do complexo I e ATP sintase por efeito do fumo. (14)

Percebe-se que o fumo ao aumentar a atividade da fosfofrutoquinase tenta resgatar o metabolismo da glicose, mas com piruvato desidrogenase reduzida, pode comprometer a via de metabolismo da glicose e gerando menos energia por menor capacidade de fosforilação oxidativa, visto nas atividades do complexo I, II e ATP sintase. Já a metformina, melhorou o uso da via de metabolização da glicose, como era previsto, observado por maior ação da piruvato desidrogenase. Mas no coração, aumentou a ação da fosforilação oxidativa, diferentemente do que acontece no fígado. Em termos de remodelação cardíaca, gerar mais energia, também garante maior contratilidade ao coração, justificando em parte, melhor função sistólica dos animais expostos a fumaça de cigarros que receberam metformina, em comparação aos animais apenas expostos ao fumo.

Quando há maior fosforilação oxidativa, além de gerar mais energia, é possível que haja maior liberação de espécies reativas de oxigênio. Assim, talvez essa seja a explicação para que os animais fumantes que receberam metformina tivessem maior concentração de hidroperóxido de lipídio no miocárdio. De qualquer forma, não houve repercussão morfofuncional desse dado, pois a metformina atenuou a remodelação induzida pelo fumo.

Em relação à sinalização da insulina, de fato o fumo diminuiu o AKT fosforilado em relação ao total e também reduziu a translocação do GLUT4 para a membrana. A metformina, por sua vez recuperou a fosforilação do AKT e estimulou a translocação do GLUT-4 para a membrana. A análise de Western blot permitiu essa avaliação e a imunohistoquímica permite visão qualitativa desse achado. Observa-se que a foto representativa do animal exposto à fumaça de cigarros e que recebeu metformina evidencia grande maior marcação de GLUT-4 com algumas células bem marcadas, semelhante ao controle. Nesse sentido, é possível que a fumaça de cigarro tenha induzido resistência à ação da insulina e a metformina atenuou esse dano, melhorando a captação e metabolismo da glicose cardíaca e garantindo geração de energia ao coração.

CONCLUSÃO

A exposição à fumaça de cigarros causou remodelação do tipo concêntrica. A metformina atenuou a dimensão das cavidades nos dois grupos que utilizaram-na e melhorou a função sistólica no grupo exposto ao fumo. Dentre os mecanismos envolvidos, é possível que a metformina promova a maior captação de glicose e com isso diminua a resistência insulínica. Com isso o metabolismo da glicose fica preservado permitindo geração de mais energia para as funções cardíaca.

BIBLIOGRAFIA

1. Minicucci MF, Azevedo PS, Paiva SAR. Cardiovascular remodeling induced by passive smoking. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2009; 8: 334-339.
2. Critchley, JA, Unal, B. Is smokeless tobacco a risk factor for coronary heart disease? A systematic review of epidemiological studies. *Eur. J. Cardiovasc. Prevent. Rehab.* 2004, 11, 101-12.
3. Kaplan A, Adibi E, Ghali R, Booz GW, Kobeissy F, Zouein FA. Functional Celular, ando Molecular Remodeling of the Heart under Influence of Oxidative Cigarette Tobacco Smoke. *Oxidative Medicine and Celular Longevity*, 2017.
4. Azevedo, PS, et al. Remodeling pattern and ventricular function in rats exposed to cigarette smoke. *Arq Bras Cardiol*, 2010.
5. Zhou X, et al, Trimetazidine protects against smoking-induced left ventricular remodeling via attenuating oxidative stress, apoptosis, and inflammation. *PLoS One*, 2012. 7(7): p. e40424.
6. Castardeli E, Paiva SAR, Matsubara BB, et al. A exposição crônica à fumaça do cigarro resulta em remodelação cardíaca e prejuízo da função ventricular em ratos. *Arq Bras Cardiol* 2005; 84: 320-324.
7. Zornoff LA, Duarte DR, Paiva SAR. Remodelação cardíaca induzida pelo tabagismo: potenciais mecanismos. *Salud(i)Ciencia* 2007; 15: 1136-1138.
8. Zornoff LA, Castardeli E, Duarte DR, Minicucci MF, Azevedo OS, Matsubara BB, Matsubara LS, Campana O, Paiva AS. Exposure time and ventricular remodeling induced by tobacco smoke exposure in rats. *Med Sci Monit.* 2008 Mar;14(3):BR62-66.
9. Castardeli E, DuarteDR, Minicucci MF, AzevedoPS, Matsubara BB, Matsubara LS, C ampana AO, Paiva SA, Zornoff LA. Exposure time and ventricular remodeling induced by tobacco smoke exposure in rats. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 2008, 14(3):BR62-66.
10. Duarte, DR, et al, The role of oxidative stress and lipid peroxidation in ventricular remodeling induced by tobacco smoke exposure after myocardial infarction. *Clinics (Sao Paulo)*, 2009. 64(7): p. 691-7.
11. Hartz, AJ, et al, The association of smoking with cardiomyopathy. *N Engl J Med*, 1984. 311(19): p. 1201-6.

12. Heckbert, SR, et al, Traditional cardiovascular risk factors in relation to left ventricular mass, volume, and systolic function by cardiac magnetic resonance imaging: the Multiethnic Study of Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, 2006. 48(11): p. 2285-92.
13. Rosen, BD, et al, Hypertension and smoking are associated with reduced regional left ventricular function in asymptomatic individuals the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, 2006. 47(6): p. 1150-8.
14. Azevedo PS, Minicucci MF, Santos PP, Paiva SA, Zornoff LA. Energy metabolism in cardiac remodeling and heart failure. *Cardiol Rev*. 2013 21(3):135-40
15. Ingwall, JS. Energy metabolism in heart failure and remodeling. *Cardiovasc. Res*. 2009, 81, 412-419.
16. Stanley, W.C.; Recchia, F.A.; Lopaschuk, G.D. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol. Rev*. 2005, 85, 1093-1129.
17. Witteles RM, Fowler M.B. Insulin-resistant cardiomyopathy clinical evidence, mechanisms, and treatment options. *J. Am. Coll. Cardiol*. 2008, 51, 93-102.
18. Abel ED, Doenst, T. Mitochondrial adaptations to physiological vs. pathological cardiac hypertrophy. *Cardiovasc. Res*. 2011, 90, 234-242.
19. Pernicova I, Korbonits M. Metformin – mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat. Rev. Endocrinol*. 10.143-156 (2014).
20. Messaoudi S, et al. The cardioprotect effects of metformin. *Curr Opin Lipidol*. 2011 Dec; 22 (6):445-53.
21. Yin M, Zou Y, Du H, Zhang L, Mao L, Xiao N, Ren G, Zhang C, Pan J. Effects of high dietary fat and cholesterol on expression of PPAR alpha, LXR alpha, and their responsive genes in the liver of apoE and LDLR double deficient mice. *Mol Cell Biochem*. 2009 Mar;323(1-2): 195-205.
22. Boutant M, Cantó C. SIRT1 metabolic actions: Integrating recent advances from mouse models. *Mol Metab*. 2013 Oct 23;3(1):5-18.
23. Pillai VB, Sundaresan NR, Gupta MP. Regulation of Akt signaling by sirtuins: its implication in cardiac hypertrophy and aging. *Circ Res*. 2014; 114(2):368-78.
24. Santos PP, Oliveira F, Ferreira VCMP, Polegato BF, Roscani MG, Fernandes AA, Modesto P, Rafacho BPM, Zanati SG, Di Lorenzo A, Minicucci MF, Azevedo OS. (2014) The Role of Lipotoxicity in Smoke Cardiomyopathy. *Plos One* 9(12):e113739.

25. Zhou X, et al. Nicotine promotes cardiomyocyte apoptosis via oxidative stress and altered apoptosis-related gene expression. *Cardiology*, 2010. 115(4): p. 243-50.
26. Seet RC, Loke WM, Khoo CM, Chew SE, Chong WL, Quek AM, Lim EC, Halliwell B. Acute effects of cigarette smoking on insulin resistance and arterial stiffness in young adults. *Atherosclerosis*. 2012 Sep;224(1):195-200
27. Wang, XD, et al. Retinoid signaling and activator protein-1 expression in ferrets given beta-carotene supplements and exposed to tobacco smoke. *J Natl Cancer Inst*, 1999. 91(1): p. 60-6.
28. de Paiva, SA, et al, Behavior of cardiac variables in animals exposed to cigarette smoke. *Arq Bras Cardiol*, 2003. 81(3): p. 221-8.
29. Zornoff LA, Matsubara BB, Matsubara LS, et al. A exposição à fumaça do cigarro intensifica a remodelação ventricular após o infarto agudo do miocárdio. *Arq Bras Cardiol* 2006; 86: 276-282.
30. Desai VG, Weindruch R, Hart RW, et al. Influences of age and dietary restriction on gastrocnemius electron transport system activities in mice. *Arch Biochem Biophys*, 1996; v. 333, p.145-51.
31. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, Flachkamp FA, Foster E, Goldstein AS, Kuznetsova T, Lancellotti P, Muraru D, Picard MH, Rietzschel ER, Rudski L, Spencer KT, Tsang W, Voigt JU. *Eur Heart J Cardiovascular Imaging*. 2015 Mar; 16(3):233-70.
32. Lieb W, Gona P, Larson MG, Aragan J, Zile MR, Cheng S, Benjamin EJ, Vasan RS. The Natural History of Left Ventricular Geometry in the Community: Clinical Correlates and Prognostic Significance of Change in LV Geometric Pattern. *JACC Cardiovascular Imaging*. 2014. September; 7(9):870-878.
33. Riksen NP, Tack CJ. *The Cardiovascular Effects of Metformin Lost in Translation?* 2014. Wolters Kluwer Health.
34. American Diabetes Association . Pharmacologic Approaches to Glicemic Treatment: Standart Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care* 2018;41(Suppl 1):S73-S85.
35. Izzoti A, Balansky R, et al. Modulation by Metformin of Molecular and Histopathological Alterations in the Lung of Cigarette Smoke-exposed Mice. *Cancer Medicine* 2014;3(3):719-730.

36. Kaisar MA, et al. Offsetting the impact of smoking and e-cigarette vaping on the cerebrovascular system and stroke injury: Is Metformin a viable countermeasure? *Redox Biology* 13 (2017) 353–362.
37. Prasad S, et al. Role of Nrf2 and protective effects of Metformin against tobacco smoke-induced cerebrovascular toxicity. *Redox Biology* 12 (2017) 58–69
38. Adak T, et al. A reappraisal on metformin. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 92 (2018) 324–332.
39. Duarte DR, Minicucci MF, Azevedo PS, Matsubara BB, Matsubara LS, Novelli EL, Paiva SA, Zornoff LA. The role of oxidative stress and lipid peroxidation in ventricular remodeling induced by tobacco smoke exposure after myocardial infarction. *Clinics (Sao Paulo)*. 2009;64(7):691-7.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA





Comissão de Ética no Uso de Animais
Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012

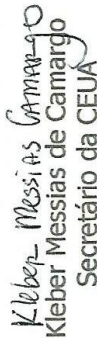
CERTIFICADO Nº 1171/2016-CEUA

Certificamos que a proposta intitulada **"Influência da metformina no metabolismo energético cardíaco de ratos expostos à fumaça de cigarros"**, registrada com o n. 1171/2016, sob a responsabilidade de Vanessa de Cássia Martins Pires Ferreira, orientada pela Profa. Dra. Paula Schmidt Azevedo Gaiolla, coordenada por Marcos Ferreira Minicucci, com a colaboração de Ana Angélica Henrique Fernandes, Katashi Okoshi, Leonardo Antônio Mamede Zornoff, Priscila Portugal dos Santos e Sérgio Alberto Rupp de Paiva – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião de 31/03/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	30/04/2018
Espécie/Linhagem/Raça	Ratos Wistar
Nº de animais	60
Peso/Idade	250 gramas/30 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da FMB - UNESP



Prof. Dr. Guilherme A. M. Barros
Presidente da CEUA



Kleber Messias Camargo
Kleber Messias de Camargo
Secretário da CEUA

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-687 Fone: (14) 3880-1608/3880-1609 e-mail secretaria: ceua@fmb.unesp.br