

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 29/05/2027.



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

Diego Aparecido Rios Queiróz

**Influência da administração de metformina na
remodelação cardíaca após infarto agudo do
miocárdio experimental em ratos**

Tese apresentada ao programa de Fisiopatologia em Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Titular Leonardo Antonio Mamede Zornoff

**Botucatu
2025**

Diego Aparecido Rios Queiróz

Influência da administração de metformina na remodelação cardíaca após infarto agudo do miocárdio experimental em ratos

Tese apresentada ao programa de Fisiopatologia em Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Titular Leonardo Antonio Mamede Zornoff

Botucatu
2025

Q3i

Queiróz, Diego Aparecido Rios

Influência da administração de metformina na remodelação cardíaca após infarto agudo do miocárdio experimental em ratos /

Diego Aparecido Rios Queiróz. -- Botucatu, 2025

64 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Faculdade de Medicina, Botucatu

Orientador: Leonardo Antonio Mamede Zornoff

1. Remodelação ventricular. 2. Estresse oxidativo. 3.
Metabolômica. 4. Microbiota intestinal. I. Título.

Impacto esperado na sociedade

Doenças cardiovasculares são a maior causa de morte no mundo e quando ocorre antes dos 70 anos é considerada morte precoce. Segundo a ONU, precisamos reduzir 30% dessas mortes até 2030. A metformina é um medicamento para tratar diabetes e, ao que tudo indica, pode também ajudar o coração a se recuperar após um infarto, reduzindo sequelas. Nosso estudo em corações de ratos reforçou isso. Agora é preciso confirmar com mais estudos em pessoas. Esse é o caminho natural na construção da ciência. Podemos afirmar que hoje mais um tijolo foi assentado.

Impact on Society

Cardiovascular diseases are the leading cause of death in the world and when they occur before the age of 70, they are considered premature deaths. According to the UN, we need to reduce these deaths by 30% by 2030. Metformin is a medication used to treat diabetes and, apparently, it can also help the heart recover from a heart attack, reducing the consequences. Our study on rat hearts reinforced this. Now we need to confirm this with further studies in people. This is the natural path in the construction of science. We can say that another brick in the wall was laid today.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE DIEGO APARECIDO RIOS QUEIRÓZ, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA EM CLÍNICA MÉDICA, DA FACULDADE DE MEDICINA - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 29 dias do mês de maio do ano de 2025, às 14h, no(a) Depto. de Clínica Médica - FM/Botucatu - Unesp, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de DIEGO APARECIDO RIOS QUEIRÓZ, intitulada **Influência da suplementação de metformina na remodelação cardíaca após infarto agudo do miocárdio experimental em ratos.**

A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. LEONARDO ANTONIO MAMEDE ZORNOFF (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Depto. de Clínica Médica / FM/Botucatu - Unesp, Prof. Dr. WILSON NADRUZ JUNIOR (Participação Virtual) do(a) FCM/Campinas - Unicamp, Profa. Dra. PAULA FELIPPE MARTINEZ (Participação Virtual) do(a) Instituto Integrado de Saúde / Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Profa. Dra. MARINA POLITI OKOSHI (Participação Presencial) do(a) Depto. de Clínica Médica / FM/Botucatu - Unesp, Profa. Dra. BERTHA FURLAN POLEGATO (Participação Presencial) do(a) Depto. de Clínica Médica / FM/Botucatu - Unesp. Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.



Prof. Dr. LEONARDO ANTONIO MAMEDE ZORNOFF

Dedicatória

*Dedico tudo isso ao amor da minha vida, minha esposa **Paola**.*

Se esse momento existe é porque você foi a pessoa que fez acontecer, que esteve ao meu lado e me deu a coragem necessária, sempre!

“Minha senhorita”, você doa o melhor de si para executar com maestria tudo o que faz, sempre preocupada com a excelência, primorosamente transforma o simples em extraordinário, desde as pitadas de pimenta até as pipetadas de soluções.

“Linda do meu coração”, você é quem traz equilíbrio nas minhas sinapses de angústias profundas, traz motivo para recheiar cada dia com um brinde, e quem me faz sentir uma conexão tamanha ao ponto de sermos “praticamente siameses”.

“Amore mio”, sempre perspicaz com os seus “por quês”, porta minhas reflexões aos planos radiculares mais profundos. Espero ainda dedicar muito para você em nossas próximas inúmeras primaveras...e lembre-se: juntos somos invencíveis!

Muito obrigado!

Agradecimentos

À minha família, especialmente meus pais, **Sirlei e Euripes**, que me ajudaram a chegar aqui, comemoram minhas conquistas e me apoiam nas decisões da vida, a despeito da consequente distância que delas derivam. Também aos meus sogros, **Eraci e Onofre**, sempre dispostos a ajudar, com seus pequenos gestos demonstram o quanto se importam.

Ao Prof. **Leonardo Zornoff**, pela confiança depositada ao me orientar, por ajudar a organizar as ideias na mente e pelo auxílio em superar os desafios inerentes do percurso.

À Profa. **Marina Politi Okoshi**, pelo aceite em participar da banca de defesa, pela colaboração com experimentos realizados no laboratório de seu grupo de pesquisa, pela amizade e incontáveis diálogos de inestimado valor acadêmico, profissional e pessoal.

À Profa. **Bertha Furlan Polegato**, pelo incentivo desde os primórdios do trabalho, pela participação ativa em inúmeros experimentos, pelas contribuições no Exame Geral de Qualificação e por ter aceitado participar na banca de defesa.

Ao Prof. **Marcos Ferreira Minicucci**, pelas ideias no projeto, auxílio nas análises estatísticas, inclusive as preciosas contribuições no Exame Geral de Qualificação.

Aos demais professores e colegas da **Disciplina/Serviço de Clínica Médica Geral** e da **Nutrologia** (Prof. Sérgio, Profa. Paula, Minoru, Edson, Filipe, Danilo, Carolina, Taline, Raquel), pelo auxílio direto ou indireto na viabilização desse trabalho, bem como do meu período de doutorado sanduíche na Itália.

À **Natalia, Danilo, Ronny**, pela dedicação com meu projeto, e aos demais membros do **Laboratório RECAN**, pelo auxílio na condução dos experimentos.

À Profa. **Paula Martinez** e ao Prof. **Wilson Nadruz**, por terem aceitado
participar na banca examinadora da defesa.

Ao Prof. **Katashi Okoshi**, pela amizade, disponibilidade na realização e
explicação dos ecocardiogramas.

Ao Dr. **Gustavo Mota**, pela paciência e prontidão ao transmitir toda sua expertise
nas análises de Western blotting.

Ao Dr. **Dijon de Campos**, pela colaboração na execução de experimentos.

Ao Dr. **Gilson Murata**, pela parceria na realização dos ensaios enzimáticos.

À Dra. **Camila Correa**, pela atenção nos experimentos de estresse oxidativo.

Ao Dr. **Paulo Ribolla** e **Dr. Diego Alonso**, pelas contribuições na análise da
microbiota intestinal.

À Dr. **Marina Amaral**, pelos serviços prestados no estudo da metabolômica.

Ao **Flávio, Aline, Rannier, Leonardo, Miriam**...que legitimam o valor de ter na
vida bons amigos.

À Faculdade de Medicina de Botucatu, ao Programa de Pós-Graduação
Fisiopatologia em Clínica Médica e à Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX), pela
possibilidade de realização do doutorado.

À CAPES (Processo: CAPES-PRINT - 88887.936421/2024-00) e à FAMESP,
pelo apoio financeiro durante meu doutorado sanduíche no exterior.

The aim of science is not to open the door to infinite wisdom, but to set a limit to infinite error.

— Bertolt Brecht, *Life of Galileo*

RESUMO:

Introdução: Após o infarto agudo do miocárdio (IAM), o ventrículo cardíaco passa por alterações morfológicas, estruturais e funcionais, conhecidas coletivamente como remodelação cardíaca, influenciada por fatores como disfunção metabólica, estresse oxidativo e inflamação. A metformina (MET) tem sido estudada além de seus efeitos glicêmicos, com evidências crescentes sugerindo que ela pode proporcionar cardioproteção direta, possivelmente devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antiproliferativas e antioxidantes. Pesquisas recentes têm destacado o papel da microbiota intestinal na doença cardiovascular e, mais especificamente, também como alvo de ação da MET. Este estudo tem como objetivo avaliar o efeito da MET sobre a remodelação cardíaca após IAM em ratos. **Métodos:** Setenta ratos machos Wistar não diabéticos (220-250 g) foram submetidos a infarto do miocárdio com tórax aberto por ligadura da artéria coronária esquerda ou cirurgia simulada (Sham). Após sete dias, garantindo a homogeneidade do tamanho do infarto por ecocardiografia, os ratos foram divididos nos seguintes grupos: Sham não tratado (Sham, n=20); infartado não tratado (MI, n=27); e infartado tratado com MET (MI+MET, n=23). A MET foi administrada na água de beber na dose de 250 mg/kg/dia por 12 semanas, com todos os ratos recebendo ração padrão. Ao final do estudo, realizamos ecocardiografia, seguida de eutanásia, estudos funcionais em corações isolados, histologia do ventrículo esquerdo (VE), análise da atividade enzimática metabólica do VE, análise do estresse oxidativo por espectrofotometria e expressão proteica por Western blot, metabolômica sérica por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e composição da microbiota intestinal usando sequenciamento do RNA 16S. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de uma via com pós-teste de Tukey ou teste de Kruskal-Wallis e Dunn, considerando $p < 0,05$ como significativo. **Resultados:** O grupo MI+MET consumiu menos alimento e água do que o grupo MI, embora não tenha sido observada diferença significativa no peso corporal. A análise histológica não revelou diferenças no tamanho do infarto entre os grupos MI e MI+MET ($50 \pm 10\%$ vs $51 \pm 8\%$, respectivamente). O infarto do miocárdio induziu aumento dos volumes do VE e disfunção cardíaca, mas a MET não interferiu nessas variáveis. Por outro lado, o grupo MI+MET apresentou redução significativa tanto na hipertrofia cardíaca quanto na fibrose, confirmadas por menores áreas de secção transversal dos cardiomiócitos e menor deposição de colágeno em comparação ao grupo MI. Além disso, o grupo MI+MET mostrou menor estresse oxidativo e menor atividade da hexoquinase no tecido miocárdico do que o grupo MI. A MET também aumentou a diversidade alfa e beta da microbiota intestinal. Ademais, a MET reduziu seis metabólitos (arginina, nicotinamida, triptofano, carnitina, butirilcarnitina e ácido hipúrico) e aumentou dois (ácido azelaico e ácido subérico). **Conclusão:** A metformina atenuou o remodelamento cardíaco induzido pelo infarto do miocárdio em ratos, por meio da modulação do estresse oxidativo, do metabolismo energético miocárdico, além de modular a microbiota intestinal. Estes achados fornecem mais evidências sobre os efeitos cardioprotetores da MET no contexto do remodelamento pós-IAM.

Palavras-chave: biguanida, hipertrofia de cardiomiócitos, fibrose cardíaca, cardioproteção, metabolômica.

ABSTRACT:

Background: After acute myocardial infarction (AMI), the cardiac ventricle undergoes morphological, structural, and functional changes, collectively known as cardiac remodeling, influenced by factors such as metabolic dysfunction, oxidative stress, and inflammation. Metformin (MET) has been studied beyond its glycemic effects, with growing evidence suggesting it may provide direct cardioprotection, possibly due to anti-inflammatory, antiproliferative, and antioxidant properties. Recent research has highlighted the role of the intestinal microbiota in cardiovascular disease and, more specifically, as a target of MET action. This study aims to evaluate the effect of MET on cardiac remodeling following AMI in rats.

Methods: Non-diabetic male Wistar rats (220-250 g) were subjected to open-chest myocardial infarction via left coronary artery ligation or sham surgery. After seven days, ensuring homogeneity of myocardial infarction size via echocardiography, rats were divided into the following groups: Sham non-treated (Sham, n=20); infarct non-treated (MI, n=27); and infarct treated with MET (MI+MET, n=23). MET was administered in drinking water at a dose of 250 mg/kg/day for 12 weeks, with all rats receiving standard chow. At end, we performed echocardiography, followed by euthanasia, functional studies on isolated hearts, left ventricular (LV) histology, LV metabolic enzymatic activity, oxidative stress analysis by spectrophotometry and protein expression by Western blotting, serum metabolomics via liquid chromatography-mass spectrometry, and gut microbiota composition using 16S rRNA sequencing. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with Tukey's post-test, or Kruskal-Wallis and Dunn's test, with $p < 0.05$ considered significant.

Results: The MI+MET group consumed less food and water than the MI group, though no significant difference in body weight was observed. Histological analysis revealed no differences in infarct size between the MI and MI+MET groups ($50 \pm 10\%$ vs $51 \pm 8\%$, respectively). Myocardial infarction induced increased LV volumes, and cardiac dysfunction, but MET did not interfere with these variables. On the other hand, the MI+MET group exhibited a significant reduction in both cardiac hypertrophy and fibrosis, as confirmed by smaller cardiomyocyte cross-sectional areas and lower collagen deposition compared to the MI group. Additionally, the MI+MET group showed less oxidative stress and lower hexokinase activity in myocardial tissue than the MI group. MET also increased both alpha- and beta-diversity of the gut microbiota. Furthermore, MET reduced six metabolites (arginine, nicotinamide, tryptophan, carnitine, butyrylcarnitine, and hippuric acid) and increased two (azelaic acid and suberic acid).

Conclusion: Metformin mitigates myocardial infarction induced cardiac remodeling in rats, through modulation of oxidative stress, myocardial energy metabolism, and modulates gut microbiota. These findings provide valuable insights into the cardioprotective effects of MET in the context of post-MI remodeling.

Keywords: biguanide, cardiomyocyte hypertrophy, cardiac fibrosis, cardioprotection, metabolomics.

Sumário

CAPÍTULO 1

| | |
|----------------------------------|----|
| Introdução | 11 |
| Hipótese | 19 |
| Objetivos | 19 |
| Referências bibliográficas | 19 |

CAPÍTULO 2

| | |
|------------------|----|
| Manuscript | 27 |
|------------------|----|

Introdução

Remodelação Cardíaca

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) compõem grupo de condições que se caracterizam por apresentarem período longo de latência, tempo de evolução prolongado e lesões irreversíveis que acarretam variedade de incapacidades e representam a maior causa de óbitos no mundo. Dentro do grande grupo de DCNT, as doenças cardiovasculares (DCV) representam a principal causa de mortalidade no mundo, responsável por 1/3 das mortes¹, sendo o subgrupo de doença cardíaca isquêmica o que mais contribui. Reduzir em um terço o risco de morte prematura pelas DCNT, definida como a que ocorre entre 30-70 anos de idade, é o objetivo 3.4 na Agenda para o Desenvolvimento Sustentável - 2030, da Organização das Nações Unidas². Portanto, parte-se da premissa de incentivo para a constante pesquisa sobre essa condição.

Há que se reconhecer os avanços alcançados nas últimas décadas na terapêutica do infarto agudo do miocárdio (IAM), porém, da mesma forma, há que se lembrar dos 25% de pacientes que a longo prazo desenvolverão insuficiência cardíaca (IC)³. Esta é síndrome clínica complexa resultante de anormalidades estruturais e/ou funcionais no coração que resultam em elevadas pressões de enchimento intracardíaco e/ou inadequado débito cardíaco ao repouso e/ou durante esforços⁴. Múltiplas etiologias possíveis levam a essa condição clínica final e o percurso do insulto inicial ao desenvolvimento da IC é permeado por processo subjacente conhecido como remodelação cardíaca⁵.

O termo remodelação cardíaca foi concebido inicialmente em 1982 por Hochman e Bulkley para descrever alteração histopatológica no coração de ratos ocorrida após infarto agudo experimental, que consistia na substituição de tecido muscular cardíaco por tecido fibroso cicatricial⁶. Em 1985, Pfeffer utilizaria o termo remodelação cardíaca pela primeira vez para sinalizar o aumento progressivo da cavidade do ventrículo esquerdo em modelos experimentais de ratos com infarto do miocárdio⁷. Em 1990, Pfeffer e Braunwald publicaram revisão sobre a remodelação pós-IAM, trazendo tanto observações experimentais quanto implicações clínicas, e a expressão foi cunhada para caracterizar alterações morfológicas após o infarto, caracteristicamente o aumento da cavidade ventricular⁸.

Com o avançar das pesquisas relacionadas à remodelação cardíaca foi necessário ampliar o próprio conceito dessa condição que, progressivamente, passou a abranger desde aspectos microscópicos, passando por vias metabólicas, alterações das células e o microambiente onde estão dispostas, até chegar nas mudanças macroscópicas do coração. Assim, em 1998 ocorreu em Atlanta (EUA) o encontro *The International Forum on Cardiac Remodeling*, cujo objetivo específico foi examinar a relação entre progressão da insuficiência cardíaca e remodelação cardíaca e, no ano 2000, foi publicado o primeiro consenso sobre essa temática. A partir desse momento definiu-se remodelação cardíaca como o conjunto das mudanças genéticas, moleculares, celulares e intersticiais cardíacas, que vão se manifestar clinicamente por alterações no tamanho, massa, geometria e função do coração, em resposta a determinada agressão⁹.

Remodelação cardíaca é uma característica comum de praticamente todas as formas de doença cardíaca e numerosos insultos desencadeadores são reconhecidos incluindo IAM, hipertensão arterial, diabetes mellitus, doenças valvares, toxinas, arritmias, cardiopatias genéticas e outras condições¹⁰. Além disso, é importante enfatizar que o principal elemento celular alterado na remodelação é o cardiomiócito, mas outras células são envolvidas no processo como fibroblastos (promovendo fibrose), células do sistema imune (promovendo inflamação), células da vasculatura coronária (promovendo rigidez vascular) e células do endotélio (promovendo disfunção endotelial)^{10,11}. Finalmente, existem vias que direta ou indiretamente influenciam a remodelação, como a carga hemodinâmica, comorbidades e grau de ativação de sistemas neuro-hormonais, fatores genéticos e epigenéticos^{12,13}.

Adicionalmente, conforme se progrediu o escopo conceitual da remodelação cardíaca, também se seguiu uma ampliação descritiva das vias fisiopatológicas envolvidas e, atualmente, não são incomuns expressões como remodelação mitocondrial¹⁴, remodelação metabólica¹⁵ ou remodelação de túbulo-T¹⁶. Dentre as alterações que desempenham papel fisiopatológico de destaque na RC podem ser citadas: aumento da morte celular, principalmente por apoptose¹⁷; modificações nas proteínas responsáveis pelo trânsito de cálcio¹⁸; acúmulo de colágeno, resultando em fibrose¹⁹; alterações das metaloproteinasas, em particular o aumento da atividade das metaloproteinasas 2 e 9²⁰; aumento do estresse oxidativo²¹; déficit energético, com disfunção mitocondrial, aumento da atividade da via glicolítica e diminuição na utilização de ácidos graxos livres^{22,23}; aumento na produção de citocinas inflamatórias, particularmente interferon gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)²⁴; e alterações da geometria ventricular²⁵.

Vale destacar a diferenciação entre a remodelação cardíaca fisiológica (compensatória) e a patológica (má adaptativa). É possível que para determinadas mudanças sejam ativadas vias mecânicas semelhantes em ambas as formas de remodelação (por exemplo, hipertrofia), mas a intensidade das mudanças é desproporcional na remodelação patológica⁵. Nesse sentido, no decorrer deste trabalho o termo genérico remodelação cardíaca será utilizado como sinônimo da remodelação patológica, a qual, em última instância, representa o objeto central do presente estudo.

A remodelação pós-IAM é dividida em fase precoce (<72h) e fase tardia (>72h). A primeira envolve expansão da zona de infarto, que pode resultar em ruptura ventricular precoce ou formação de aneurisma. A fase tardia, por sua vez, envolve o ventrículo esquerdo globalmente e é associada com dilatação cavitária tempo-dependente, distorção do formato ventricular e hipertrofia. A falha da normalização aumenta a tensão de parede resultando em dilatação progressiva, recrutamento do miocárdio das zonas limítrofes para a cicatriz e deterioração da função contrátil²⁶. O processo da remodelação cardíaca não ocorre de forma homogênea após o infarto. Dentre os fatores que predispõem a alterações mais intensas após o infarto podemos citar: infarto de grande tamanho, preferencialmente de parede anterior, aumento do estresse parietal e ativação de diversos fatores bioquímicos²⁷.

Portanto, se aceita que a remodelação cardíaca desempenha importante papel fisiopatológico na progressão da disfunção ventricular e IC. Em consequência, devido ao grande impacto socioeconômico e às altas taxas de morbimortalidade relacionadas com esse fenômeno, torna-se relevante a identificação de fatores que atenuem o processo de remodelação ventricular.

Um importante fator de risco para cardiopatia é o diabetes mellitus tipo 2 (DM2)²⁸. Diversos são os mecanismos de lesão envolvidos como maior incidência e gravidade de doença coronariana, infarto do miocárdio, doença microvascular e cardiopatia diabética²⁹. Estudos observacionais demonstraram consistentemente um risco de IC de 2 a 4 vezes maior em indivíduos com diabetes³⁰ e registros indicaram que o diabetes é responsável por 20 a 40% dos pacientes com IC³¹.

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

REFERENCES

1. Joseph, P. & Yusuf, S. Coordinating Efforts to Reduce the Global Incidence of Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine* **389**, 1329–1331 (2023).
2. Jenča, D. *et al.* Heart failure after myocardial infarction: incidence and predictors. *ESC Heart Fail* **8**, 222–237 (2021).
3. Cohn, J. N., Ferrari, R. & Sharpe, N. Cardiac remodeling—concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol* **35**, 569–582 (2000).
4. Azevedo, P. S., Polegato, B. F., Minicucci, M. F., Paiva, S. A. R. & Zornoff, L. A. M. Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq Bras Cardiol* (2016) doi:10.5935/abc.20160005.
5. Yang, D. *et al.* The Roles of Noncardiomyocytes in Cardiac Remodeling. *Int J Biol Sci* **16**, 2414–2429 (2020).
6. Dunlay, S. M. *et al.* Type 2 Diabetes Mellitus and Heart Failure: A Scientific Statement From the American Heart Association and the Heart Failure Society of America: This statement does not represent an update of the 2017 ACC/AHA/HFSA heart failure guideline update. *Circulation* **140**, (2019).
7. Palazzuoli, A. & Iacoviello, M. Diabetes leading to heart failure and heart failure leading to diabetes: epidemiological and clinical evidence. *Heart Fail Rev* **28**, 585–596 (2022).
8. Nesti, L. & Natali, A. Metformin effects on the heart and the cardiovascular system: A review of experimental and clinical data. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **27**, 657–669 (2017).
9. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *The Lancet* **352**, 854–865 (1998).
10. Holman, R. R., Paul, S. K., Bethel, M. A., Matthews, D. R. & Neil, H. A. W. 10-Year Follow-up of Intensive Glucose Control in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine* **359**, 1577–1589 (2008).
11. Varjabedian, L., Bourji, M., Pourafkari, L. & Nader, N. D. Cardioprotection by Metformin: Beneficial Effects Beyond Glucose Reduction. *American Journal of Cardiovascular Drugs* **18**, 181–193 (2018).
12. Eurich, D. T. *et al.* Comparative safety and effectiveness of metformin in patients with diabetes mellitus and heart failure systematic review of observational studies involving 34 000 patients. *Circ Heart Fail* **6**, 395–402 (2013).
13. Maruthur, N. M. *et al.* Diabetes Medications as Monotherapy or Metformin-Based Combination Therapy for Type 2 Diabetes. *Ann Intern Med* **164**, 740–751 (2016).
14. Richardson, T. L. *et al.* Hospitalization for Heart Failure Among Patients With Diabetes Mellitus and Reduced Kidney Function Treated With Metformin Versus Sulfonylureas: A Retrospective Cohort Study. *J Am Heart Assoc* **10**, (2021).
15. Salvatore, T. *et al.* Effects of metformin in heart failure: From pathophysiological rationale to clinical evidence. *Biomolecules* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3390/biom11121834> (2021).

16. Bahardoust, M. *et al.* Effect of metformin (vs. placebo or sulfonylurea) on all-cause and cardiovascular mortality and incident cardiovascular events in patients with diabetes: an umbrella review of systematic reviews with meta-analysis. *J Diabetes Metab Disord* **23**, 27–38 (2023).
17. Fontaine, E. Metformin-Induced Mitochondrial Complex I Inhibition: Facts, Uncertainties, and Consequences. *Front Endocrinol (Lausanne)* **9**, (2018).
18. Zhang, C.-S. *et al.* Metformin Activates AMPK through the Lysosomal Pathway. *Cell Metab* **24**, 521–522 (2016).
19. Steinberg, G. R. & Hardie, D. G. New insights into activation and function of the AMPK. *Nat Rev Mol Cell Biol* **24**, 255–272 (2023).
20. Salt, I. P. & Hardie, D. G. AMP-Activated Protein Kinase. *Circ Res* **120**, 1825–1841 (2017).
21. Lin, S.-C. & Hardie, D. G. AMPK: Sensing Glucose as well as Cellular Energy Status. *Cell Metab* **27**, 299–313 (2018).
22. Li, J. Z. & Li, Y. R. Cardiovascular Protection by Metformin: Latest Advances in Basic and Clinical Research. *Cardiology* **148**, 374–384 (2023).
23. McCreight, L. J., Bailey, C. J. & Pearson, E. R. Metformin and the gastrointestinal tract. *Diabetologia* **59**, 426–435 (2016).
24. Vallianou, N. G., Stratigou, T. & Tsagarakis, S. Metformin and gut microbiota: their interactions and their impact on diabetes. *Hormones* **18**, 141–144 (2019).
25. Foretz, M., Guigas, B. & Viollet, B. Understanding the glucoregulatory mechanisms of metformin in type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* **15**, 569–589 (2019).
26. Pfeffer, M. A. *et al.* Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* **44**, 503–512 (1979).
27. Zornoff, L. A. M., Paiva, S. A. R., Minicucci, M. F. & Spadaro, J. Infarto do miocárdio experimental em ratos: análise do modelo. *Arq Bras Cardiol* **93**, 434–440 (2009).
28. Minicucci, M. F. *et al.* Critical infarct size to induce ventricular remodeling, cardiac dysfunction and heart failure in rats. *Int J Cardiol* **151**, 242–243 (2011).
29. Polegato, B. F. *et al.* Association between Functional Variables and Heart Failure after Myocardial Infarction in Rats. *Arq Bras Cardiol* (2016) doi:10.5935/abc.20160015.
30. Okoshi, K. *et al.* Influence of intermittent fasting on myocardial infarction-induced cardiac remodeling. *BMC Cardiovasc Disord* **19**, 126 (2019).
31. Guizoni, D. M. *et al.* Effects of late exercise on cardiac remodeling and myocardial calcium handling proteins in rats with moderate and large size myocardial infarction. *Int J Cardiol* **221**, 406–412 (2016).
32. Lang, R. M. *et al.* Recommendations for Cardiac Chamber Quantification by Echocardiography in Adults: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *Journal of the American Society of Echocardiography* **28**, 1-39.e14 (2015).

33. Lindsey, M. L. *et al.* Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **314**, H812–H838 (2018).
34. Solskov, L. *et al.* Metformin Induces Cardioprotection against Ischaemia/Reperfusion Injury in the Rat Heart 24 Hours after Administration. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **103**, 82–87 (2008).
35. Yin, M. *et al.* Metformin improves cardiac function in a nondiabetic rat model of post-MI heart failure. *Circ Physiol* **301**, 459–468 (2011).
36. Tonon, C. R. *et al.* Liraglutide Pretreatment Does Not Improve Acute Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Rats. *Int J Mol Sci* **25**, 5833 (2024).
37. Kruger, N. J. The Bradford Method for Protein Quantitation. in *Basic Protein and Peptide Protocols* 9–16 (Humana Press, New Jersey). doi:10.1385/0-89603-268-X:9.
38. Siqueira, J. S. *et al.* Overview of bergamot leaves extract (*Citrus bergamia*) effect on the RedOx/Inflammatory scenario in obesity target organs in an animal model of metabolic syndrome. *J Funct Foods* **113**, 106042 (2024).
39. Castardeli, E. *et al.* Tobacco smoke-induced left ventricular remodelling is not associated with metalloproteinase-2 or -9 activation. *Eur J Heart Fail* **9**, 1081–1085 (2007).
40. Pang, Z. *et al.* MetaboAnalyst 5.0: narrowing the gap between raw spectra and functional insights. *Nucleic Acids Res* **49**, W388–W396 (2021).
41. Dunn, W. B. *et al.* Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat Protoc* **6**, 1060–1083 (2011).
42. Polo, T. C. F. & Miot, H. A. Aplicações da curva ROC em estudos clínicos e experimentais. *J Vasc Bras* **19**, (2020).
43. Nakamura, M. & Sadoshima, J. Mechanisms of physiological and pathological cardiac hypertrophy. *Nat Rev Cardiol* **15**, 387–407 (2018).
44. González, A., Hall, M. N., Lin, S.-C. & Hardie, D. G. AMPK and TOR: The Yin and Yang of Cellular Nutrient Sensing and Growth Control. *Cell Metab* **31**, 472–492 (2020).
45. Calvert, J. W. *et al.* Acute metformin therapy confers cardioprotection against myocardial infarction via AMPK-eNOS-mediated signaling. *Diabetes* **57**, 696–705 (2008).
46. Gundewar, S. *et al.* Activation of AMP-activated protein kinase by metformin improves left ventricular function and survival in heart failure. *Circ Res* **104**, 403–411 (2009).
47. Zhang, C. *et al.* Metformin attenuates ventricular hypertrophy by activating the AMP-activated protein kinase–endothelial nitric oxide synthase pathway in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **38**, 55–62 (2011).
48. Loi, H. *et al.* Metformin protects the heart against hypertrophic and apoptotic remodeling after myocardial infarction. *Front Pharmacol* **10**, (2019).
49. Xu, X. *et al.* Metformin Protects Against Systolic Overload-Induced Heart Failure Independent of AMP-Activated Protein Kinase α 2. *Hypertension* **63**, 723–728 (2014).

50. Howell, J. J. *et al.* Metformin Inhibits Hepatic mTORC1 Signaling via Dose-Dependent Mechanisms Involving AMPK and the TSC Complex. *Cell Metab* **25**, 463–471 (2017).
51. Mohan, M. *et al.* A randomized controlled trial of metformin on left ventricular hypertrophy in patients with coronary artery disease without diabetes: the MET-REMODEL trial. *Eur Heart J* **40**, 3409–3417 (2019).
52. Kamel, A. M., Sabry, N. & Farid, S. Effect of metformin on left ventricular mass and functional parameters in non-diabetic patients: a meta-analysis of randomized clinical trials. *BMC Cardiovasc Disord* **22**, 405 (2022).
53. Frangogiannis, N. G. The Extracellular Matrix in Ischemic and Nonischemic Heart Failure. *Circ Res* **125**, 117–146 (2019).
54. Ravassa, S. *et al.* Prediction of Left Ventricular Reverse Remodeling and Outcomes by Circulating Collagen-Derived Peptides. *JACC Heart Fail* **11**, 58–72 (2023).
55. Wang, X. *et al.* Metformin improves cardiac function in rats via activation of AMP-activated protein kinase. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **38**, 94–101 (2011).
56. Sasaki, H. *et al.* Metformin Prevents Progression of Heart Failure in Dogs. *Circulation* **119**, 2568–2577 (2009).
57. Han, F., Shu, J., Wang, S., Tang, C. & Luo, F. Metformin Inhibits the Expression of Biomarkers of Fibrosis of EPCs In Vitro. *Stem Cells Int* **2019**, 1–10 (2019).
58. Asensio-Lopez, M. del C. *et al.* Pharmacological inhibition of the mitochondrial NADPH oxidase 4/PKCa/Gal-3 pathway reduces left ventricular fibrosis following myocardial infarction. *Translational Research* **199**, 4–23 (2018).
59. Xiao, H. *et al.* Metformin attenuates cardiac fibrosis by inhibiting the TGF β 1–Smad3 signalling pathway. *Cardiovasc Res* **87**, 504–513 (2010).
60. Liu, J. *et al.* The combination of exercise and metformin inhibits TGF- β 1/Smad pathway to attenuate myocardial fibrosis in db/db mice by reducing NF- κ B-mediated inflammatory response. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **157**, 114080 (2023).
61. Nguyen, G. *et al.* Metformin ameliorates activation of hepatic stellate cells and hepatic fibrosis by succinate and GPR91 inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* **495**, 2649–2656 (2018).
62. Borges, C. M. *et al.* Metformin arrests the progression of established kidney disease in the subtotal nephrectomy model of chronic kidney disease. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **318**, F1229–F1236 (2020).
63. Rangarajan, S. *et al.* Metformin reverses established lung fibrosis in a bleomycin model. *Nat Med* **24**, 1121–1127 (2018).
64. Lopaschuk, G. D., Karwi, Q. G., Tian, R., Wende, A. R. & Abel, E. D. Cardiac Energy Metabolism in Heart Failure. *Circ Res* **128**, 1487–1513 (2021).
65. Bertero, E. & Maack, C. Metabolic remodelling in heart failure. *Nat Rev Cardiol* **15**, 457–470 (2018).
66. Houten, S. M. *et al.* Peroxisomal L-bifunctional enzyme (Ehhadh) is essential for the production of medium-chain dicarboxylic acids. *J Lipid Res* **53**, 1296–1303 (2012).

67. Bai, F. *et al.* Metformin regulates lipid metabolism in a canine model of atrial fibrillation through AMPK/PPAR- α /VLCAD pathway. *Lipids Health Dis* **18**, 109 (2019).
68. Beauloye, C., Bertrand, L., Horman, S. & Hue, L. AMPK activation, a preventive therapeutic target in the transition from cardiac injury to heart failure. *Cardiovasc Res* **90**, 224–233 (2011).
69. Garcia, D. & Shaw, R. J. AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Mol Cell* **66**, 789–800 (2017).
70. Herzig, S. & Shaw, R. J. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 121–135 (2018).
71. Harada, M., Nattel, S. N. & Nattel, S. AMP-Activated Protein Kinase. *Circ Arrhythm Electrophysiol* **5**, 860–867 (2012).
72. Brown, D. A. *et al.* Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure. *Nat Rev Cardiol* **14**, 238–250 (2017).
73. Larsen, A. H. *et al.* A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of metformin on myocardial efficiency in insulin-resistant chronic heart failure patients without diabetes. *Eur J Heart Fail* **22**, 1628–1637 (2020).
74. Dambrova, M. *et al.* Acylcarnitines: Nomenclature, Biomarkers, Therapeutic Potential, Drug Targets, and Clinical Trials. *Pharmacol Rev* **74**, 506–551 (2022).
75. Liepinsh, E. *et al.* Activated peroxisomal fatty acid metabolism improves cardiac recovery in ischemia-reperfusion. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **386**, 541–550 (2013).
76. Razavi, A. C. *et al.* Novel Findings From a Metabolomics Study of Left Ventricular Diastolic Function: The Bogalusa Heart Study. *J Am Heart Assoc* **9**, (2020).
77. Gander, J. *et al.* Metabolic Impairment in Coronary Artery Disease: Elevated Serum Acylcarnitines Under the Spotlights. *Front Cardiovasc Med* **8**, (2021).
78. Zhao, S. *et al.* The Association Between Acylcarnitine Metabolites and Cardiovascular Disease in Chinese Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)* **11**, 212 (2020).
79. Cheng, M.-L. *et al.* Metabolic Disturbances Identified in Plasma Are Associated With Outcomes in Patients With Heart Failure. *J Am Coll Cardiol* **65**, 1509–1520 (2015).
80. Wancewicz, B. *et al.* Metformin Monotherapy Alters the Human Plasma Lipidome Independent of Clinical Markers of Glycemic Control and Cardiovascular Disease Risk in a Type 2 Diabetes Clinical Cohort. *J Pharmacol Exp Ther* **386**, 169–180 (2023).
81. Witkowski, M., Weeks, T. L. & Hazen, S. L. Gut Microbiota and Cardiovascular Disease. *Circ Res* **127**, 553–570 (2020).
82. Davies, A. *et al.* Short and medium chain acylcarnitines as markers of outcome in diabetic and non-diabetic subjects with acute coronary syndromes. *Int J Cardiol* **389**, 131261 (2023).
83. Lees, H. J., Swann, J. R., Wilson, I. D., Nicholson, J. K. & Holmes, E. Hippurate: The Natural History of a Mammalian–Microbial Cometabolite. *J Proteome Res* **12**, 1527–1546 (2013).

84. Gonthier, M.-P. *et al.* Microbial Aromatic Acid Metabolites Formed in the Gut Account for a Major Fraction of the Polyphenols Excreted in Urine of Rats Fed Red Wine Polyphenols. *J Nutr* **133**, 461–467 (2003).
85. Gao, X. *et al.* GC/MS-based urinary metabolomics reveals systematic differences in metabolism and ethanol response between Sprague–Dawley and Wistar rats. *Metabolomics* **7**, 363–374 (2011).
86. Davis, B. J., Xie, Z., Viollet, B. & Zou, M.-H. Activation of the AMP-Activated Kinase by Antidiabetes Drug Metformin Stimulates Nitric Oxide Synthesis In Vivo by Promoting the Association of Heat Shock Protein 90 and Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Diabetes* **55**, 496–505 (2006).
87. Adam, J. *et al.* Metformin Effect on Nontargeted Metabolite Profiles in Patients With Type 2 Diabetes and in Multiple Murine Tissues. *Diabetes* **65**, 3776–3785 (2016).
88. Lazzarin, T. *et al.* Role of Nutrients and Foods in Attenuation of Cardiac Remodeling through Oxidative Stress Pathways. *Antioxidants* **11**, 2064 (2022).
89. Prag, H. A., Murphy, M. P. & Krieg, T. Preventing mitochondrial reverse electron transport as a strategy for cardioprotection. *Basic Res Cardiol* **118**, 34 (2023).
90. Batandier, C. *et al.* The ROS Production Induced by a Reverse-Electron Flux at Respiratory-Chain Complex 1 is Hampered by Metformin. *J Bioenerg Biomembr* **38**, 33–42 (2006).
91. Buczyńska, A., Sidorkiewicz, I., Krętowski, A. J. & Adamska, A. Examining the clinical relevance of metformin as an antioxidant intervention. *Front Pharmacol* **15**, (2024).
92. Hou, X. *et al.* Metformin reduces intracellular reactive oxygen species levels by upregulating expression of the antioxidant thioredoxin via the AMPK-FOXO3 pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **396**, 199–205 (2010).
93. Liu, X. *et al.* Metformin protects high glucose-cultured cardiomyocytes from oxidative stress by promoting NDUFA13 expression and mitochondrial biogenesis via the AMPK signaling pathway. *Mol Med Rep* **22**, 5262–5270 (2020).
94. Wang, X. *et al.* Metformin attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via up-regulation of antioxidant enzymes. *PLoS One* **12**, e0182777 (2017).
95. Shi, Y. & Hou, S.-A. Protective effects of metformin against myocardial ischemia-reperfusion injury via AMPK-dependent suppression of NOX4. *Mol Med Rep* **24**, 712 (2021).
96. Yu, E. *et al.* Association of Tryptophan Metabolites with Incident Type 2 Diabetes in the PREDIMED Trial: A Case-Cohort Study. *Clin Chem* **64**, 1211–1220 (2018).
97. Zuo, H. *et al.* Plasma Biomarkers of Inflammation, the Kynurenine Pathway, and Risks of All-Cause, Cancer, and Cardiovascular Disease Mortality: The Hordaland Health Study. *Am J Epidemiol* **183**, 249–58 (2016).
98. Jiang, Z. *et al.* Human gut microbial aromatic amino acid and related metabolites prevent obesity through intestinal immune control. *Nat Metab* **7**, 808–822 (2025).
99. Metz, R. *et al.* IDO inhibits a tryptophan sufficiency signal that stimulates mTOR: A novel IDO effector pathway targeted by D-1-methyl-tryptophan. *Oncoimmunology* **1**, 1460–1468 (2012).

100. Xie, N. *et al.* NAD⁺ metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential. *Signal Transduct Target Ther* **5**, 227 (2020).
101. Sanchez-Rangel, E. & Inzucchi, S. E. Metformin: clinical use in type 2 diabetes. *Diabetologia* **60**, 1586–1593 (2017).
102. Cheng, M., Ren, L., Jia, X., Wang, J. & Cong, B. Understanding the action mechanisms of metformin in the gastrointestinal tract. *Front Pharmacol* **15**, (2024).
103. Bahne, E. *et al.* Metformin-induced glucagon-like peptide-1 secretion contributes to the actions of metformin in type 2 diabetes. *JCI Insight* **3**, (2018).
104. Yerevanian, A. & Soukas, A. A. Metformin: Mechanisms in Human Obesity and Weight Loss. *Curr Obes Rep* **8**, 156–164 (2019).
105. Ji, S., Wang, L. & Li, L. Effect of Metformin on Short-Term High-Fat Diet-Induced Weight Gain and Anxiety-Like Behavior and the Gut Microbiota. *Front Endocrinol (Lausanne)* **10**, (2019).
106. Xiao, S. *et al.* Lac-Phe mediates the effects of metformin on food intake and body weight. *Nat Metab* **6**, 659–669 (2024).
107. Szymczak-Pajor, I., Drzewoski, J., Kozłowska, M., Krekora, J. & Śliwińska, A. The Gut Microbiota-Related Antihyperglycemic Effect of Metformin. *Pharmaceuticals (Basel)* **18**, (2025).
108. Beale, A. L. *et al.* The Gut Microbiome of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *J Am Heart Assoc* **10**, (2021).
109. Tang, W. H. W., Bäckhed, F., Landmesser, U. & Hazen, S. L. Intestinal Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *J Am Coll Cardiol* **73**, 2089–2105 (2019).
110. Herisson, F. M. *et al.* Targeting the Gut-Heart Axis Improves Cardiac Remodeling in a Clinical Scale Model of Cardiometabolic Syndrome. *JACC Basic Transl Sci* **10**, 1–15 (2025).
111. Cheng, M., Ren, L., Jia, X., Wang, J. & Cong, B. Understanding the action mechanisms of metformin in the gastrointestinal tract. *Front Pharmacol* **15**, (2024).
112. de la Cuesta-Zuluaga, J. *et al.* Metformin Is Associated With Higher Relative Abundance of Mucin-Degrading *Akkermansia muciniphila* and Several Short-Chain Fatty Acid-Producing Microbiota in the Gut. *Diabetes Care* **40**, 54–62 (2017).
113. Rodriguez, J., Hiel, S. & Delzenne, N. M. Metformin. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **21**, 294–301 (2018).
114. Shin, N.-R. *et al.* An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut* **63**, 727–735 (2014).
115. Yang, M. *et al.* Beneficial Effects of Newly Isolated *Akkermansia muciniphila* Strains from the Human Gut on Obesity and Metabolic Dysregulation. *Microorganisms* **8**, 1413 (2020).
116. Wu, H. *et al.* Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naive type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. *Nat Med* **23**, 850–858 (2017).
117. Pavlo Petakh, Kamyshna, I. & Kamyshnyi, A. Effects of metformin on the gut microbiota: A systematic review. *Mol Metab* **77**, 101805 (2023).