

João Vitor Santos Marques

Metformina: Utilizações para além da diabetes

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2018

João Vitor Santos Marques

Metformina: Utilizações para além da diabetes

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2018

João Vitor Santos Marques

Metformina: Utilizações para além da diabetes

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau Mestre em Ciências Farmacêuticas, sob a orientação da Professora Doutora Adriana Pimenta e co-orientação da Professora Doutora Renata Souto.

Atesto a originalidade do trabalho

---

(João Vitor Santos Marques)

## Sumário

A metformina, descoberta em 1922, é a molécula mais prescrita para o tratamento da diabetes mellitus tipo 2 a nível mundial. É considerado um fármaco de primeira linha para o tratamento desta patologia pois geralmente é bem tolerado, reduz os níveis de hemoglobina glicada (HbA1c) em 1-2%, tem um impacto favorável no peso corporal, não aumenta o risco de hipoglicemia quando usado em monoterapia e a relação custo-efetividade é muito benéfica. Embora o mecanismo de ação desta biguanida se encontre por elucidar, sabe-se que reduz a produção de glucose hepática e melhora a sensibilidade à insulina.

A hiperglicemia e a resistência à insulina estão também fortemente associadas ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, aumento de peso e ao desenvolvimento da síndrome do ovário policístico. O efeito da metformina nestas patologias tem sido estudado nas últimas décadas.

Ao longo desta monografia, recorrendo a artigos científicos e ensaios clínicos, são compiladas e discutidas informações relevantes que elucidam o papel deste fármaco nestas doenças.

Como resultados principais desta revisão bibliográfica pode-se destacar que a metformina apresenta alguns benefícios cardiovasculares, é capaz de controlar o índice de massa corporal e melhorar alguns fatores ligados à síndrome do ovário policístico, como a taxa de ovulação e hiperandrogenismo, mostrando maior potencial quando administrada a pacientes mais jovens.

**Palavras-chave:** metformina, doenças cardiovasculares, obesidade, síndrome do ovário policístico.

## **Abstract**

Metformin, discovered in 1922, is the most worldwide prescribed molecule for the treatment of type 2 diabetes mellitus. This drug is considered the first-line treatment of this disease because it is generally well tolerated, reduces glycosylated haemoglobin levels (HbA1c) by 1-2%, has a favourable impact on body weight, does not increase the risk of hypoglycaemia when used in monotherapy and is cost-effective. Although the mechanism of action of this biguanide is unclear, metformin reduces hepatic glucose production and improves the sensitivity to insulin.

Hyperglycaemia and insulin resistance are also strongly associated to the development of cardiovascular diseases, weight gain and the development of polycystic ovary syndrome. The effect of metformin in these pathologies has been studied in the last decades.

Throughout this work, scientific articles and clinical trials were used to compile and discuss relevant information that clarify the role of this drug in these pathologies.

As main results from this review it can be highlighted that metformin has some cardiovascular benefits, is able to control the body mass index and improves some factors related to polycystic ovarian syndrome, such as the ovulation rate and hyperandrogenism, displaying higher potential when administered to younger patients.

**Keywords:** metformin, cardiovascular diseases, obesity, polycystic ovary syndrome

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à Professora Doutora Adriana Pimenta, por toda a disponibilidade, empenho e empatia demonstrada durante o desenvolvimento do tema mostrando-se sempre disponível para esclarecer qualquer tipo de dúvidas.

Em segundo lugar, gostaria de agradecer à minha família por todo o apoio demonstrado ao longo dos anos. Sem esta não seria possível a minha formação como homem, tendo de agradecer por todos os ensinamentos transmitidos.

Por último gostaria de endereçar um enorme obrigado a todos os professores e profissionais da Universidade Fernando Pessoa que se cruzaram comigo tendo sido sempre excecionais no seu empenho, contribuindo de forma decisiva para a minha formação pessoal e profissional. À Universidade Fernando Pessoa um enorme obrigado por todos estes anos que levarei sempre na minha memória como uma das etapas mais enriquecedoras da minha vida.

Podem prender o meu corpo mas nunca a minha mente, o meu pensamento, a minha alma criativa – Manuel Marques

## **Índice**

Índice de Figuras .....	v
Índice de Tabelas.....	vii
Índice de Abreviaturas .....	viii
I - Introdução.....	1
1.1 - Enquadramento .....	2
1.2 - Metodologia .....	3
II - Metformina.....	4
2.1 - Perspetiva histórica .....	4
2.2 - Farmacocinética .....	7
2.3 - Mecanismo de ação.....	7
2.4 - Efeitos secundários .....	10
2.5 - Contraindicações.....	10
2.6 - Utilizações .....	10
III - A metformina nas doenças cardiovasculares .....	12
IV - A metformina na perda de peso .....	24
V - A metformina na síndrome do ovário policístico.....	35
VI - Conclusão .....	44
VII - Referências bibliográficas .....	46

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> - Estrutura química da guanidina.....	4
<b>Figura 2</b> - Estrutura química da galegina.....	4
<b>Figura 3</b> - Estrutura química da sintalina A.....	5
<b>Figura 4</b> - Estruturas químicas de biguanidas: metformina, fenformina e buformina.....	5
<b>Figura 5</b> - Potenciais mecanismos de ação da metformina na gliconeogénese hepática..	9
<b>Figura 6</b> - Mecanismo de ação proposto para efeitos cardiovasculares protetores da metformina.....	14
<b>Figura 7</b> - Efeitos da Ang II e da metformina no envelhecimento vascular em ratos ApoE <sup>-/-</sup> .....	15
<b>Figura 8</b> - Efeitos da metformina na área aterosclerótica e no envelhecimento vascular.....	15
<b>Figura 9</b> - Efeitos da metformina em AT1R .....	16
<b>Figura 10</b> - Efeitos da metformina no perfil lipídico .....	18
<b>Figura 11</b> - Concentração plasmática de fatores pro-inflamatórios após 12 semanas de tratamento .....	19
<b>Figura 12</b> - Modificações na expressão de mRNA nas MNC após tratamento de metformina durante 12 semanas .....	20
<b>Figura 13</b> - Efeito da metformina na maturação de HPrAD-vis.....	25
<b>Figura 14</b> - Peso corporal dos ratos após diferentes dietas.....	26
<b>Figura 15</b> - Adiposidade geral nos ratos tratados com diferentes dietas .....	27
<b>Figura 16</b> - Principais fontes de gordura visceral nos ratos.....	27
<b>Figura 17</b> - Área de adipócitos nos ratos tratados com diferentes dietas .....	28



<b>Figura 18</b> - Expressão de genes lipogénicos no tecido adiposo epididimal com diferentes dietas .....	29
<b>Figura 19</b> - Variação de peso corporal em relação ao peso inicial após tratamento de 6 meses com metformina.....	30
<b>Figura 20</b> - Variação de IMC durante o estudo.....	32
<b>Figura 21</b> - Efeito da metformina no IMC em pacientes não diabéticos (variação em percentagem).....	34

## **Índice de Tabelas**

<b>Tabela 1</b> - Características dos ensaios clínicos incluídos na meta-análise.....	21
<b>Tabela 2</b> - Resultados dos estudos individuais incluídos na meta-análise.....	22
<b>Tabela 3</b> - Características dos ensaios analisados.....	33
<b>Tabela 4</b> - População em estudo no ensaio de fertilidade.....	38
<b>Tabela 5</b> - Resultados das gravidezes na população estudada.....	39
<b>Tabela 6</b> - Taxas de ovulação, gravidez e aborto.....	41

## Índice de Abreviaturas

ACC - Acetil CoA carboxilase

ADP - Adenosina difosfato, do inglês *adenosine diphosphate*

AMP - Adenosina monofosfato, do inglês *adenosine monophosphate*

AMPK - Proteína quinase ativada pela adenosina 5'-monofosfato, do inglês *5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase* Ang II - Angiotensina II

ApoB - Apolipoproteína B

ApoE - Apolipoproteína E

AT1R - Recetor da Angiotensina II tipo 1, do inglês *Angiotensin II receptor type 1*

ATP - Adenosina trifosfato, do inglês *adenosine triphosphate*

C/EBP $\alpha$  - Proteínas ligantes de potenciação CCAAT, do inglês *CCAAT-enhancer-binding proteins*

COSI- Childhood Obesity Surveillance Initiative

CREB - Proteína de ligação a elemento de resposta ao AMP cíclico, do inglês *cyclic AMP response element binding protein*

DNA - Ácido desoxirribonucleico, do inglês *deoxyribonucleic acid*

FAS - Ácido gordo sintetase, do inglês *fatty acid synthase*

GAPDH - Gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase endógena, do inglês *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*

GLP-1 - Péptido semelhante ao glucagon 1, do inglês *Glucagon-like peptide-1*

HDL - Lipoproteína de alta densidade, do inglês *high-density lipoprotein*

HFD - Dieta rica em gorduras, do inglês *high fat diet*

HOMA - Modelo de avaliação homeostático, do inglês *Homeostasis Model Assessment*

HPrAD-vis - Pré-adipócitos viscerais humanos, do inglês *Human visceral preadipocytes*

ICSI - Injeção intracitoplasmática de espermatozoides, do inglês *Intracytoplasmic sperm injection*

IL-4 - Interleucina-4

IL-6 - Interleucina-6

IMC - Índice de massa corporal

INSL-3 - Péptido semelhante a insulina 3, do inglês *insulin-like peptide 3*

LCHFD - Dieta baixa em hidratos de carbono e rica em gordura, do inglês *low-carbohydrate high-fat diet*

LCHFD+MET - Dieta baixa em hidratos de carbonos e rica em gorduras + metformina, do inglês *low-carbohydrate high-fat diet + metformin*

LDL - Lipoproteína de baixa densidade, do inglês *Low-density lipoprotein*

LFD - Dieta baixa em gorduras, do inglês *low fat diet*

LH - Hormona luteínizante, do inglês *luteinizing hormone*

LKB-1 - Quinase serina/treonina 11

MNC - Células mononucleares periféricas, do inglês *mononuclear cells*

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro, do inglês *messenger Ribonucleic acid*

NADH - Nicotinamida adenina dinucleótido reduzida

NF- $\kappa$ B - Fator nuclear Kappa- $\beta$

NO - Óxido nítrico, do inglês *nitric oxide*

OMS - Organização Mundial de Saúde

OTC - Transportador de catiões orgânicos

PCOS - Síndrome do ovário policístico, do inglês *polycystic ovary syndrome*

Pi- Fosfato inorgânico

PPAR $\gamma$  - Recetor  $\gamma$  ativado pelo proliferador peroxissômico

ROS - Espécies reativas de oxigénio, do inglês *reactive oxygen species*

SIRT1 - Sirtuína 1

SOD 1 - Superóxido dismutase 1

SREBP1 - Proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1, do inglês *Sterol regulatory element-binding protein-1*

ST - Dieta padrão do inglês *standart diet*

ST+MET - Dieta padrão + metformina, do inglês *standart diet + metformin*

TG - Triglicérides

Thr - Tirosina

TNF- $\alpha$  - Fator tumoral necrótico- $\alpha$

TORC2 - Transdutor de proteína 2 regulada por CREB, do inglês *transducer of regulated CREB protein 2*

VLDL - Lipoproteína de muito baixa densidade

## I - Introdução

A metformina é um fármaco do grupo das biguanidas que foi testado pela primeira vez em seres humanos na década de 1950. Só mais tarde foi aprovado pelas Autoridades do Medicamento e é atualmente o fármaco mais prescrito para o tratamento da diabetes tipo 2 (Bailey, 2017).

É geralmente bem tolerado, apresentando como principais efeitos adversos diarreia, náuseas, dores abdominais e acidose láctica. Está contraindicado em pacientes com disfunção renal, insuficiência cardíaca congestiva, acidose metabólica, desidratação, sepsis, doença hepática e abuso alcoólico. É eficaz na redução da produção de glucose hepática e na sensibilização da ação da insulina. Outras vantagens da sua utilização incluem o baixo custo, o facto de não aumentar o risco de hipoglicemia quando usado em monoterapia, a sua ação favorável no peso corporal e a existência de evidência de um efeito cardiovascular positivo (Nathan e Sullivan, 2014).

O seu mecanismo de ação não é claro, mas sabe-se que atua na diabetes mellitus por reduzir a produção de glucose hepática e melhorar a sensibilização à insulina, sendo que o objetivo da sua prescrição entre pessoas com diabetes mellitus tipo 2 é reduzir os riscos vasculares associados a esta doença (Griffin *et al.*, 2017).

Nas últimas décadas tem-se assistido à utilização *off-label* deste fármaco em situações onde a resistência à insulina está também envolvida, como são exemplos, a obesidade e a síndrome do ovário policístico (PCOS), patologias com elevado impacto nas sociedades atuais. Aproximadamente 78 milhões de adultos e 12,5 milhões de crianças e adolescentes são obesas nos Estados Unidos da América (Malin e Kashyap, 2014). Relativamente aos números em Portugal, segundo o relatório de Childhood Obesity Surveillance Initiative (COSI) 2016, 11,7% das crianças entre os 6 e os 8 anos sofrem de obesidade (COSI, 2016). A obesidade é responsável por 2,8 milhões de mortes por ano mundialmente, devido a uma prevalência crescente de complicações vasculares, cancro e diabetes mellitus tipo 2 associadas a esta patologia (Malin e Kashyap, 2014). A síndrome do ovário policístico (PCOS) é o distúrbio endócrino mais comum em mulheres em idade reprodutora. Afeta entre 6 a 21% das mulheres sendo claro que leva

a consequências graves a curto e longo prazo associadas à resistência à insulina e à obesidade (Naderpoor *et al.*, 2015). Ainda, segundo Lashen, a PCOS, para além dos seus efeitos na reprodução, tem um impacto a longo prazo no risco de desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólica, assim como no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Lashen, 2010).

Assim, além do uso na diabetes mellitus, a metformina tem apresentado outras utilidades, nomeadamente no tratamento de PCOS (Zahra *et al.*, 2016), na redução do peso corporal (Harborne *et al.*, 2005) e na proteção vascular, melhorando o perfil lipídico e reduzindo lesões ateroscleróticas (Asai *et al.*, 2016).

### **1.1 - Enquadramento**

A metformina é o fármaco antidiabético mais vendido sendo também usado noutras patologias. Atualmente, o farmacêutico é confrontado com um cada vez maior número de casos de utentes a utilizar este fármaco e que o questionam acerca da sua eficácia e segurança nas diferentes utilizações terapêuticas. É o dever deste profissional de saúde esclarecer os utentes, informando-os dos efeitos farmacológicos possíveis e alertando-os para os possíveis efeitos secundários, garantindo deste modo o aumento da adesão à terapêutica e a promoção do uso devido e racional do medicamento.

Com a realização desta dissertação pretende-se conhecer as ações farmacológicas da metformina e o modo como estas podem contribuir para novas utilizações terapêuticas. O objetivo principal é a realização de uma revisão bibliográfica que incide essencialmente sobre as potenciais aplicações terapêuticas da metformina, para além da diabetes mellitus tipo 2. Partindo deste objetivo principal, foi estudada a evolução histórica desta molécula bem como a sua caracterização, incluindo as suas características farmacocinéticas e os mecanismos de ação propostos. Posteriormente, efetuou-se uma análise e discussão das evidências clínicas relativas à eficácia e perfil de segurança desta molécula noutras patologias que não a diabetes, nomeadamente em doenças cardiovasculares, na perda de peso e na PCOS.

## 1.2 - Metodologia

Para a elaboração deste trabalho de revisão, foi realizada uma pesquisa bibliográfica, no período decorrido entre Novembro de 2017 e Julho de 2018, recorrendo a motores de busca na área da saúde, como: “*PubMed*”, “*Springer*”, “*Wiley*”, “*Science Direct*”, para além do motor de busca “*Google Académico*”, tendo-se obtido artigos de jornais e revistas científicas. A pesquisa e seleção das referências bibliográficas mais adequadas para cada capítulo da dissertação, foi efetuada usando como palavras-chave em inglês: “*metformin*”, “*cardiovascular diseases*”, “*obesity*”, “*polycystic ovary syndrome*”. Através da pesquisa efetuada foram selecionados os artigos científicos compreendidos com data de publicação entre 1991 e 2017, tendo sido dada maior relevância às publicações de maior impacto e mais atuais, com um número elevado de participantes e dando preferência aos artigos completos e originais.

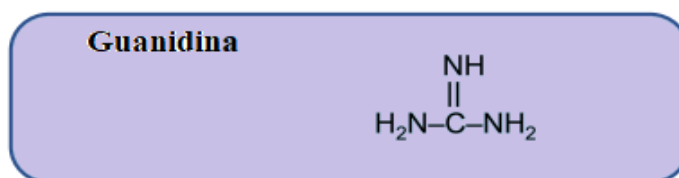


## II - Metformina

### 2.1 - Perspetiva histórica

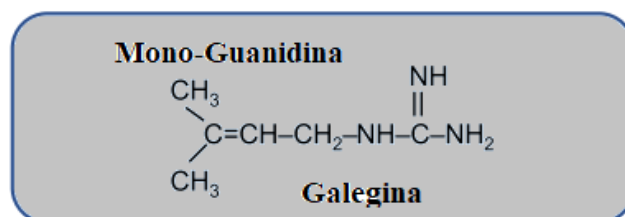
A história da metformina pode ser rastreada ao uso da planta *Galega Officinalis* descrita na Europa medieval para combater estados epilépticos, febris e pestilentos, tendo sido mais tarde recomendada para o tratamento dos sintomas característicos da diabetes mellitus como a poliúria e a polidipsia (Bailey, 2017).

Em meados do século XIX, as análises à composição química da planta revelaram que as vagens imaturas de *Galega Officinalis* eram ricas em guanidina (Figura 1) e outros compostos análogos (Bailey, 2017).

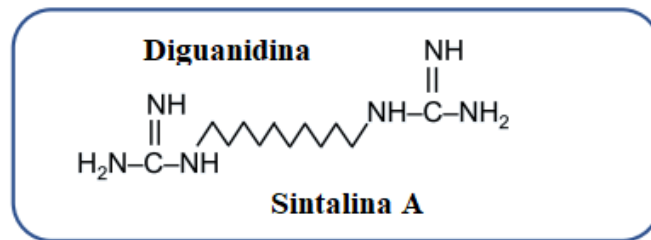


**Figura 1** - Estrutura química da guanidina (adaptada de Bailey, 2017).

Em 1918, relatou-se que a guanidina diminuía os níveis de glucose no sangue dos animais, levando posteriormente ao aparecimento de mono derivados da guanidina, como a galegina (Figura 2), e de diguanidinas como a sintalina A (Figura 3). Esta descoberta levou à introdução destes compostos no tratamento da diabetes que, no entanto, desiludiram devido à toxicidade apresentada (Bailey, 2017).

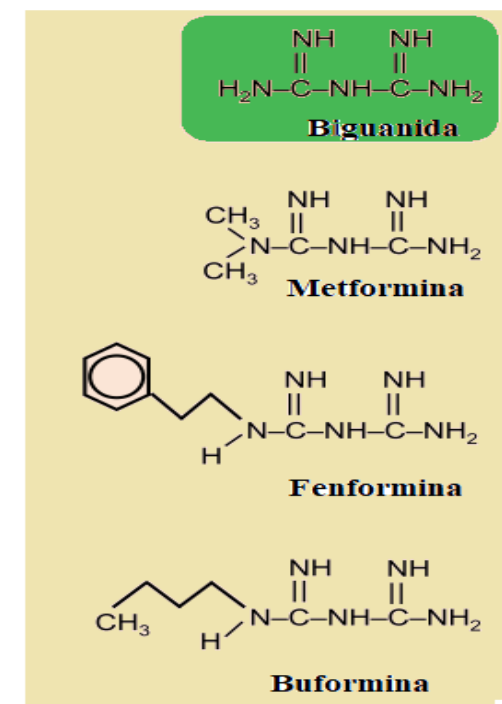


**Figura 2** - Estrutura química da galegina (adaptada de Bailey, 2017).



**Figura 3** - Estrutura química da sintalina A (adaptada de Bailey, 2017).

É em 1879 que Bernhard Rathke sintetiza uma biguanida através da fusão de duas guanidinas. Este avanço levou a que em 1922 Werner e Bell sintetizassem uma dimetilbiguanida, a metformina (Figura 4). Foi apenas em 1929 que ficou demonstrado o poder para a diminuição da glucose no sangue pela metformina e outras biguanidas, tendo, no entanto, sido na altura descartado o seu potencial terapêutico devido às enormes quantidades necessárias para atingir uma redução significativa de glucose em modelos não diabéticos (Bailey, 2017).



**Figura 4** - Estruturas químicas de biguanidas: metformina, fenformina e buformina (adaptada de Bailey, 2017).

As biguanidas caíram no esquecimento até que, em 1956, Jean Sterne transformou o seu potencial numa realidade. O seu estudo inicial, principalmente em indivíduos tratados com insulina, indicou que a metformina poderia substituir em alguns casos a insulina e noutros permitia baixar a dose de insulina necessária, sem que houvesse uma hipoglicemia grave (Bailey, 2017).

Na mesma década de 1950, outros grupos científicos investigaram os compostos derivados da guanidina, levando a uma redescoberta de fenformina e da buformina (Figura 4). Estes compostos eram eficazes a reduzir a glucose sanguínea, tendo sido comprovado a maior eficácia da fenformina em relação a outras biguanidas. No entanto, o elevado risco de acidose láctica da fenformina e buformina tornou-se evidente, levando à sua retirada do mercado em 1978 (Bailey, 2017).

Relativamente à metformina, o risco de acidose láctica era muito menor e era principalmente atribuído ao seu uso inapropriado em doentes cuja função renal se encontrava comprometida de forma crónica. No entanto, a reputação da metformina ficou manchada por associação às outras biguanidas, levando a que se ponderasse a sua descontinuação (Bailey, 2017).

Durante a década de 1980, surgiu uma nova informação científica relevante que demonstrou a capacidade da metformina em reduzir a gliconeogénese hepática e aumentar o consumo de glucose periférica (Bailey, 2017).

Perante estes dados, em 1986, a *Food and Drug Administration* (FDA) solicitou uma reavaliação da metformina através de ensaios clínicos rigorosos e extensos efetuados em parceria com a *Lipha Pharmaceuticals* e cientistas clínicos independentes que articularam com a FDA (Bailey, 2017).

Foi então que a 29 de dezembro de 1994 que a FDA aprovou o seu uso clínico. Desde então a metformina conquistou o seu espaço e tornou-se no fármaco mais prescrito mundialmente para a redução de glucose, estando incluído na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial de Saúde (OMS) (Bailey, 2017), sendo prescrito mundialmente a mais de 100 milhões de pacientes (Rena *et al.*, 2013).

## 2.2 - Farmacocinética

A metformina é uma base hidrófila com uma biodisponibilidade de  $55 \pm 16\%$ . É administrada por via oral e é absorvida maioritariamente no intestino delgado, sendo excretada sem alterações na urina. Possui um volume de distribuição de 63-276 litros e o tempo de semi-vida durante múltiplas doses em pacientes com função renal normal é de aproximadamente 5 horas, com uma *clearance* de  $510 \pm 130$  mL/min e  $1140 \pm 330$  mL/min em pacientes normais e diabéticos com função renal normal. A absorção intestinal, a recaptação hepática e a excreção renal são mediadas por transportadores de cationes orgânicos (OTC). Quanto à acidose láctica, o seu mais temido efeito secundário, é recomendável que as concentrações plasmáticas sejam mantidas abaixo de 2,5 mg/L para minimizar este risco (Graham *et al.*, 2011).

## 2.3 - Mecanismo de ação

Embora tenha sido introduzida na década de 1950, o mecanismo de ação concreto da metformina continua por elucidar. Sabe-se que os seus efeitos farmacológicos levam a uma redução na resistência à insulina, sendo descrita como uma molécula capaz de sensibilizar a insulina no plasma (Viollet *et al.*, 2012).

A ação primária da metformina é a diminuição da gliconeogénese no fígado através da sua inibição (Figura 5). Esta ação alvo nos hepatócitos deve-se ao facto de estes terem maior quantidade de OTC1, que facilitam a entrada celular de metformina no fígado levando à sua acumulação neste órgão (Viollet *et al.*, 2012). A metformina é anormalmente hidrofílica e é improvável que interaja com membranas de forma significativa, sendo por isso necessário transportadores para atravessar a membrana (Rena *et al.*, 2013).

Assim que entra no compartimento citosólico, a mitocôndria passa a ser o alvo e foi demonstrado que a metformina inibe a cadeia respiratória mitocondrial ao nível do complexo I sem afetar as outras etapas na maquinaria mitocondrial (Viollet *et al.*, 2012). A inibição mitocondrial fornece uma explicação plausível para o desenvolvimento de acidose láctica, já que a inibição da cadeia respiratória leva a uma acumulação de lactato derivado da glicólise. Quando comparado com fenformina e buformina, o risco

de acidose láctica é inferior porque a inibição mitocondrial causada é metformina-dependente o que leva a admitir que é autolimitada e pode explicar o porquê de ser menos tóxica que outros inibidores do complexo I (Rena *et al.*, 2013).

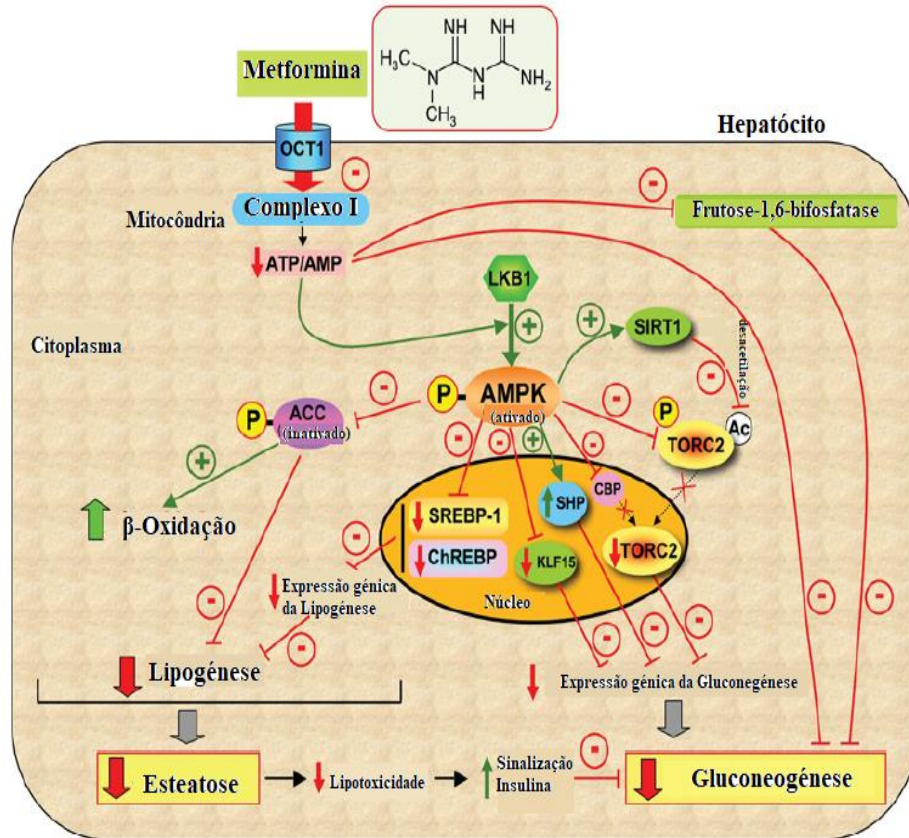
Esta propriedade do fármaco leva a uma redução da oxidação de nicotinamida adenina dinucleótido reduzida (NADH), do bombeamento de prótons através da membrana mitocondrial e do consumo de oxigénio, levando a um abaixamento do gradiente de prótons e por último a uma redução da síntese de Adenosina Trifosfato (ATP) através de Adenosina Difosfato (ADP) e fosfato inorgânico (Pi) (Viollet *et al.*, 2012).

Zhou *et al.* verificaram que a ativação da enzima Proteína quinase ativada pela adenosina 5'-monofosfato (AMPK) estaria intimamente ligada aos efeitos da metformina (Zhou *et al.*, 2001).

A AMPK é vista como um indicador de combustível sistémico sendo composta por três subunidades, uma alfa catalítica e duas regulatórias (beta e gama), tendo estas duas subunidades pelo menos duas isoformas (Zhou *et al.*, 2001).

A AMPK é ativada por um aumento intracelular da razão AMP/ATP resultando num balanço negativo entre produção de ATP e o seu consumo. A ativação de AMPK envolve a ligação de AMP à subunidade gama, levando a uma alteração conformacional que ativa alostericamente a enzima e inibe a desfosforilação de tirosina (Thr). A ativação de AMPK necessita de fosforilação em Thr por uma quinase *upstream* identificada como Quinase serina/treonina 11 (LKB-1), que é ainda mais estimulada pelo ativador alostérico de AMP (Zhou *et al.*, 2001).

Mais ainda, foi demonstrado que a razão ADP/ATP pode também desempenhar um papel regulatório na ligação de AMPK aos domínios das subunidades gama. A AMPK ativada desvia o estado da célula de um estado anabólico para o estado catabólico, desligando o consumo de ATP e levando a um restauro do equilíbrio energético. Esta regulação envolve a transcrição de fatores que modulam a expressão genética, resultando numa inibição da síntese de glucose e lípidos, e na promoção da oxidação de ácidos gordos e glucose (Zhou *et al.*, 2001).



**Figura 5** - Potenciais mecanismos de ação da metformina na gliconeogénese hepática (adaptada de Viollet *et al.*, 2012).

Um mecanismo alternativo proposto para o efeito inibitório da metformina é através da gliconeogénese mediada por Transdutor da proteína 2 regulada por proteína de ligação (TORC2) a elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB), envolvendo um aumento de atividade hepática de Sirtuína 1 (SIRT1). A SIRT1 tem sido relatada como capaz de desacetilar o TORC2 resultando na sua degradação, este que tem sido identificado como um regulador chave na produção de glucose hepática. Notou-se também que possivelmente uma redução do estado energético hepático, e não a ativação de AMPK, pode constituir o principal fator para que os efeitos da metformina na regulação de produção de glucose hepática se verifiquem (Viollet *et al.*, 2012).

Como o ritmo de produção de glucose hepática está ligada ao metabolismo energético hepático (são necessários 6 ATP para produzir uma molécula de glucose), a interrupção do principal fornecedor de energia nos hepatócitos (fosforilação oxidativa mitocondrial)

através da inibição do complexo I teria um efeito profundo no fluxo através da gluconeogénese (Viollet *et al.*, 2012).

Para além disto, a AMP tende a aumentar quando a ATP baixa e isso pode ser também uma explicação para a inibição de gluconeogénese pela metformina através da regulação alostérica de enzimas como a frutose-1,6-bifosfatase (Viollet *et al.*, 2012).

A redução de lípidos hepáticos induzida pela metformina é consistente com um aumento da oxidação de ácidos gordos e também com a inibição de lipogénese, presumivelmente mediada pela ativação de AMPK. Na verdade a AMPK coordena as mudanças no metabolismo hepático e portanto a ativação de AMPK pela metformina induz a fosforilação e a inativação de Acetil CoA Carboxilase (ACC), um importante mediador para a síntese de ácidos gordos. Para além do mais a AMPK inibe a expressão de genes lipogénicos, como a expressão da enzima ácido gordo sintetase (FAS) e participa na regulação génica da lipogénese através da inibição da proteína de ligação ao elemento regulador de esterol 1 (SREBP1) (Viollet *et al.*, 2012).

#### **2.4 - Efeitos secundários**

Os efeitos secundários mais frequentes da metformina são gastrointestinais e incluem náusea, dor abdominal, flatulência, diarreia, indigestão (10-50% pacientes) e acidose láctica (rara). A má absorção de vitamina B12 também tem sido descrita, sendo aconselhável uma suplementação da mesma (Nathan e Sullivan, 2014).

#### **2.5 - Contraindicações**

A metformina está contraindicada em pacientes com disfunção renal, insuficiência cardíaca congestiva, acidose metabólica, desidratação, sepsis, doença hepática e abuso alcoólico (Nathan e Sullivan, 2014).

#### **2.6 - Utilizações**

Para além dos seus efeitos anti-hiperglicémicos, a metformina tem apresentado outras utilidades, nomeadamente na proteção vascular, reduzindo lesões ateroscleróticas (Asai

*et al.*, 2016), no melhoramento do perfil lipídico (Harborne *et al.*, 2005) e no tratamento de PCOS (Zahra *et al.*, 2016). Estes efeitos serão discutidos nos capítulos seguintes.



### III - A metformina nas doenças cardiovasculares

A aterotrombose, definida como uma placa de aterosclerose, é uma das principais causas de morte no mundo. Alguns fatores de risco como a diabetes, *stress* oxidativo, dislipidemia (níveis elevados de lipoproteína de baixa densidade, lipoproteína de muito baixa densidade, colesterol total e valores reduzidos de lipoproteína de alta densidade), obesidade e altas concentrações séricas de fibrogénio e proteína C-reativa estão intimamente relacionados com o desenvolvimento da doença (Ghatak *et al.*, 2011).

A hiperglicemia parece não ser o fator mais determinante para um risco aumentado de doenças cardiovasculares entre pacientes com diabetes tipo 2. Os estudos demonstraram a influência de um conjunto de outros fatores de risco anormais, como os acima referidos, denominando-se o conjunto síndrome metabólica. De facto, alguns destes indicadores da síndrome metabólica como a insulinémia (serve como marcador de resistência à insulina), elevados níveis de alipoproteína B (Apo B) (usado como marcador de concentração de lipoproteínas aterogénicas) e partículas LDL são indicadores de risco aumentado de doença coronária isquémica (Després, 2003).

A alipoproteína E (ApoE) tem um papel fulcral no metabolismo lipídico. Uma deficiência nesta proteína envolve a acumulação de lipoproteínas no plasma, levando ao desenvolvimento de aterosclerose. Esta alipoproteína é maioritariamente sintetizada no fígado, mas também em outras células nomeadamente macrófagos, que têm um papel importante na aterogénese. Nos macrófagos, a regulação do gene ApoE, depende de potenciadores sendo que na sua ausência o promotor não é capaz de regular a transcrição *in vivo* do gene. Na presença de endotoxinas, a expressão de ApoE é diminuída nos macrófagos levando a que um potencial efeito benéfico de ApoE em lesões ateroscleróticas seja mitigado pelo impacto modulatório de fatores inflamatórios, sendo portanto necessário um fármaco que atenuie os efeitos inflamatórios para que a regulação de ApoE seja compensada para normalizar o efluxo de colesterol na placa aterosclerótica (Stavri *et al.*, 2015).

Segundo Wang *et al.* os pacientes com diabetes mellitus tipo 2 apresentam maior suscetibilidade para desenvolver doença aterosclerótica em comparação com doentes

que não sofram dessa doença. A hiperglicemia em diabéticos é um dos fatores principais no desenvolvimento de aterosclerose, promovendo uma libertação de espécies reativas de oxigénio (ROS), danificando alguns componentes celulares como o ácido desoxirribonucleico (DNA), levando à morte prematura da célula, a uma redução do óxido nítrico (NO) e originando lesões endoteliais. As ROS produzidas na mitocôndria são críticas para a disfunção endotelial dado que aceleram as lesões vasculares, tendo-se provado que a administração de antioxidantes que têm como alvo a mitocôndria, reduzem as lesões ateroscleróticas em ratos ApoE<sup>-/-</sup> (Wang *et al.*, 2016).

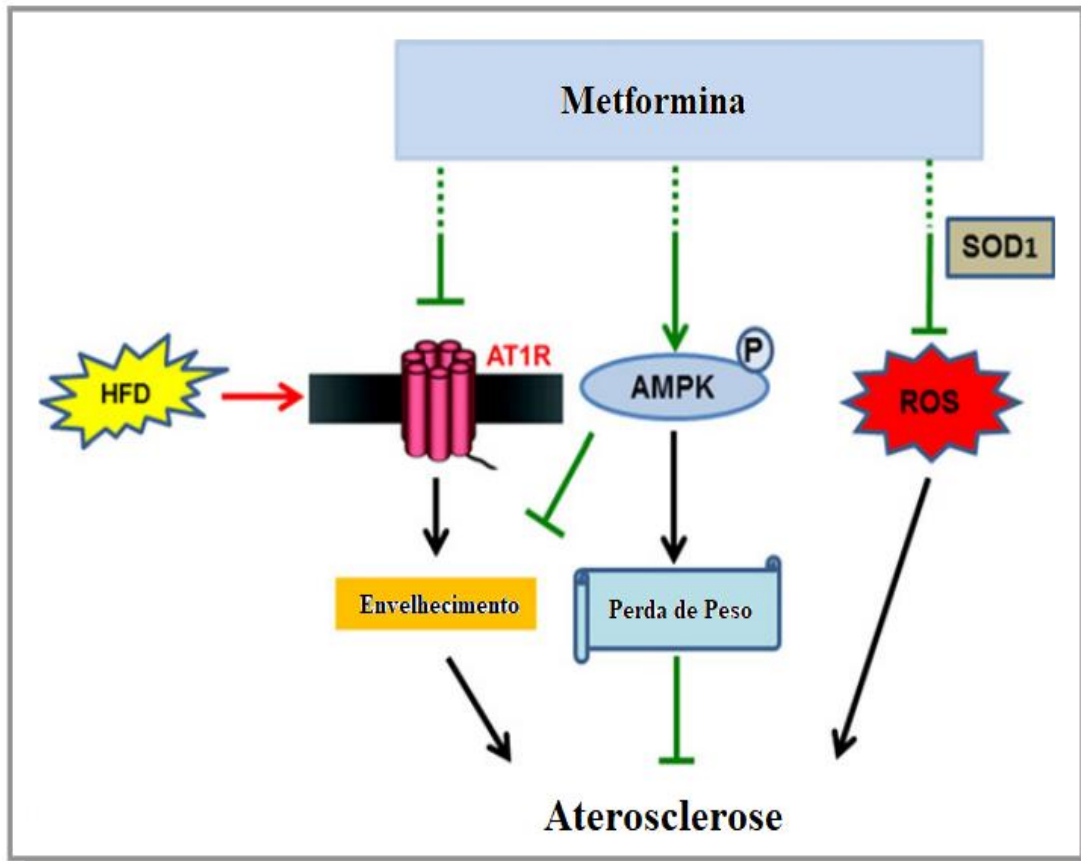
Segundo Forouzandeh *et al.* a Angiotensina II (Ang II) tem um papel importante na regulação de estímulos e sinais que acabam por levar ao envelhecimento vascular e à aterogénese. Vários estudos têm indicado que a Ang II, através da sua ligação ao recetor da Ang II tipo 1 (AT1R), está envolvida no desenvolvimento de doenças vasculares, tendo sido provado que a interrupção de AT1R por bloqueadores do recetor de Ang II aumentam a longevidade em ratos (Forouzandeh *et al.*, 2014).

O estudo publicado por Forouzandeh *et al.* utilizou ratos ApoE<sup>-/-</sup> com metformina injetada intraperitonealmente, correspondente a 2 g/dia em humanos, durante 2 ou 4 semanas tendo os ratos sido alimentados com uma dieta padrão (ST) ou com uma dieta aterogénica (HFD). Também se estudou o efeito da Ang II nos ratos que foram injetados com Ang II durante 10 dias, tendo a dose sido equivalente a pacientes com hipertensão vascular (100 mg/kg) (Forouzandeh *et al.*, 2014).

De acordo com os resultados, demonstrou-se que a metformina é capaz de diminuir a expressão de AT1R nas aortas dos ratos e que atenua o envelhecimento vascular e a aterosclerose provocada por uma dieta rica em gorduras (HFD) estando este efeito cardioprotetor da metformina associado à regulação negativa de AT1R em ratos com uma HFD.

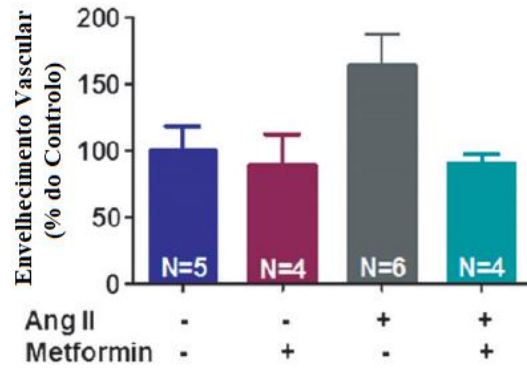
Ao inibir AT1R, a metformina consegue atenuar muitas das vias que levam a aterosclerose incluindo aquelas provocadas por HFD e que resultam num envelhecimento vascular. Para além disso, através da ativação de AMPK a metformina pode levar a uma perda de peso mudando o estado das células de anabólico para catabólico, conduzindo ao consumo de energia. A metformina é também capaz de estimular a superóxido dismutase 1 (SOD1), uma enzima antioxidante. Neste sentido, os

autores propuseram um modelo para o mecanismo de ação cardioprotetor da metformina (Figura 6).



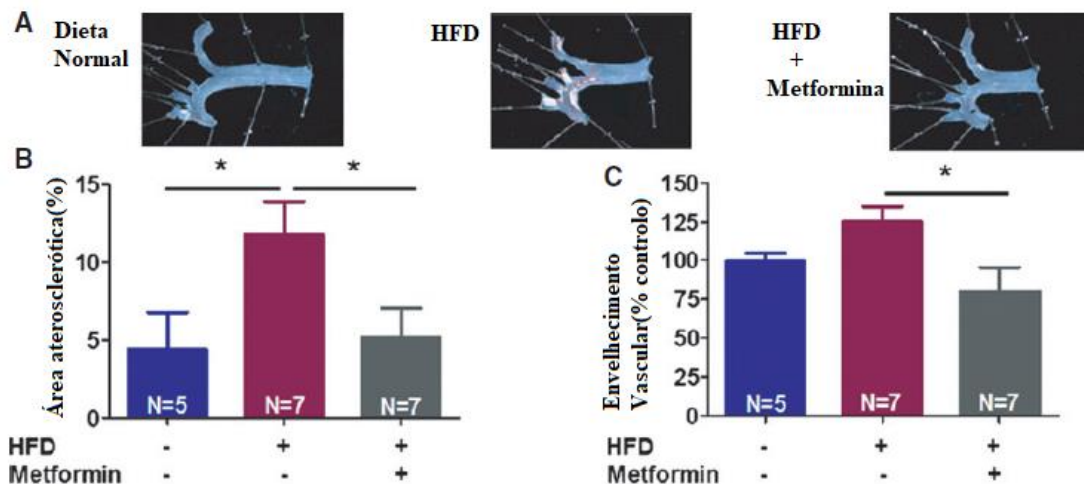
**Figura 6** - Mecanismo de ação proposto para efeitos cardiovasculares protetores da metformina (adaptada de Forouzandeh *et al.*, 2014).

Os resultados do estudo da avaliação da metformina no envelhecimento vascular na presença de Ang II em comparação com o grupo controlo demonstraram que o envelhecimento vascular foi reduzido na presença da metformina, conforme se pode constatar na Figura 7.



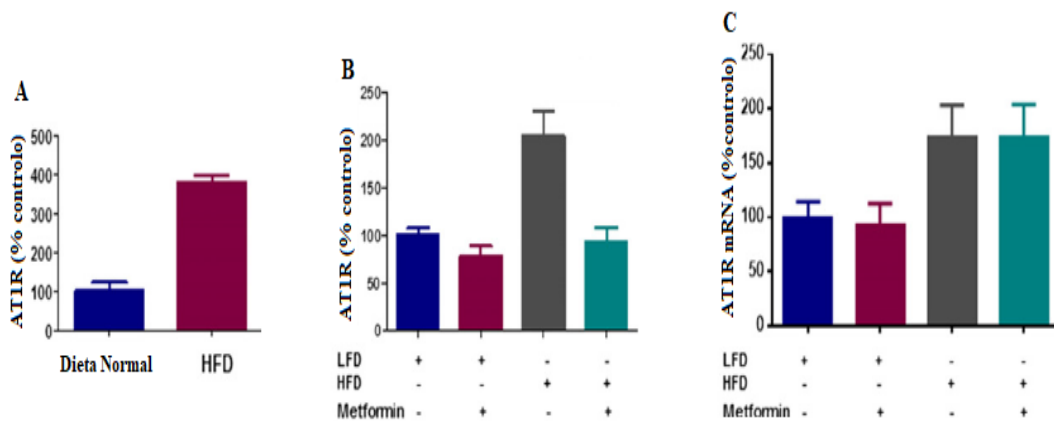
**Figura 7** - Efeitos da Ang II e da metformina no envelhecimento vascular em ratos ApoE<sup>-/-</sup>. A Ang II foi administrada por um período 10 dias e a metformina administrada durante 7 dias de forma concomitante para averiguar os efeitos atenuantes da metformina. (-) - Ausência de administração; (+) - Administração; (N) – número de ratos; (adaptada de (Forouzandeh *et al.*, 2014).

Para verificar se a metformina é capaz de atenuar o envelhecimento vascular e a aterosclerose os ratos foram alimentados com HFD, tendo sido administrada metformina intraperitonealmente durante 2 semanas (Figura 8. B, C). Verificou-se que a metformina foi capaz de reduzir quer a área aterosclerótica, quer o envelhecimento vascular (Figura 8).



**Figura 8** – Efeitos da metformina na área aterosclerótica e no envelhecimento vascular. (A) Imagens da aorta dos ratos com dieta normal, dieta HFD e HFD com metformina; (B) Efeito da metformina na área aterosclerótica; (C) Efeito da metformina no envelhecimento vascular (adaptada de Forouzandeh *et al.*, 2014).

Existem provas que Ang II, através do seu efeito em AT1R, aumenta a velocidade de envelhecimento vascular e que ao bloquear AT1R é possível aumentar a longevidade dos ratos. O envelhecimento vascular induzido por Ang II é portanto um evento associado à ativação de AT1R. Verificou-se que o envelhecimento vascular das aortas dos ratos sujeitos a uma dieta HFD está associado a um aumento proteico de AT1R, quando comparado com ratos submetidos a uma dieta normal, tendo este aumento sido reduzido pela metformina, levando os níveis de AT1R a normalizar. Também se verificou que a expressão ao nível do ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) foi aumentada por uma dieta HFD. No entanto, a metformina não foi capaz de reduzir a expressão de AT1R ao nível de mRNA, sendo por isso sugerido que a diminuição proteica de AT1R se deve principalmente à degradação dos seus recetores proteicos (Figura 9) (Forouzandeh *et al.*, 2014).



**Figura 9** – Efeitos da metformina em AT1R. (A) - Expressão de AT1R em ratos alimentados com uma dieta normal e HFD (dieta rica em gorduras), (B) - Expressão de AT1R em ratos alimentados com dieta baixa em gordura (LFD), LFD + metformina, HFD, HFD + metformina, (C) - Expressão de mRNA de AT1R em LFD, LFD + metformina, HFD e HFD + metformina, (-) - Ausência de administração, (+) - Administração (adaptada de Forouzandeh *et al.*, 2014).

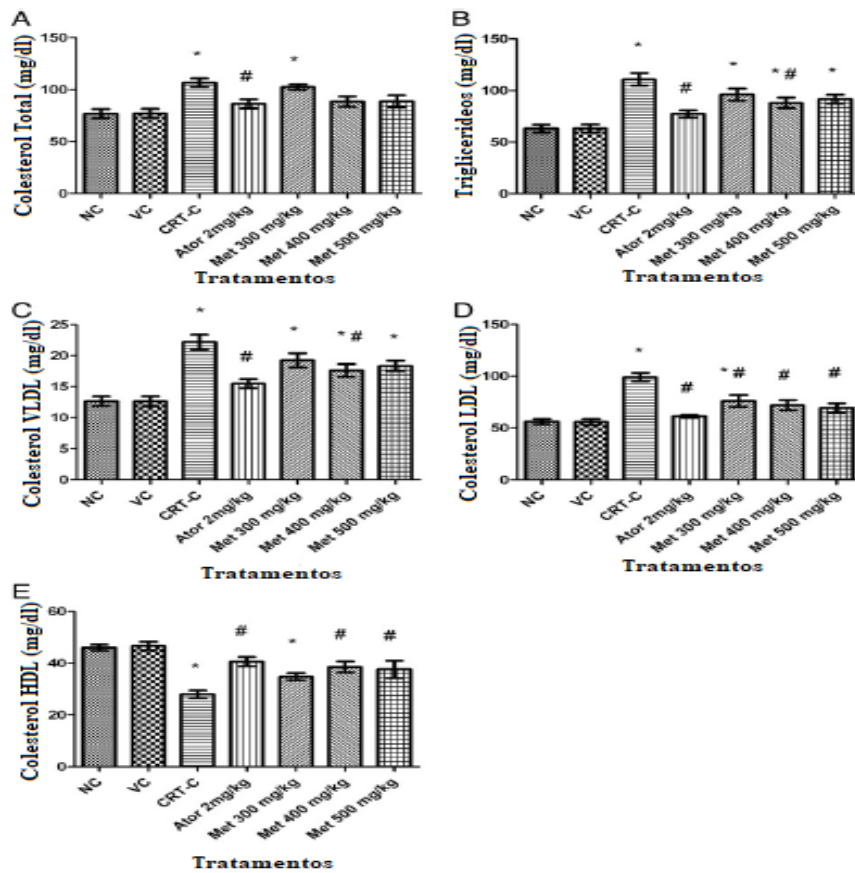
Ghatak *et al.* levaram a cabo uma investigação onde se pretendia estudar o potencial da metformina em vários fatores de risco aterotrombóticos designadamente os parâmetros de perfil lipídico em ratos hiperlipidémicos. Nesta investigação usaram-se ratos onde a hipercolesteremia foi induzida com citron-x 100 sendo estes tratados com diferentes

dosagens de metformina e atorvastatina para efeitos comparativos. Ao grupo de controlo normal foi administrado uma solução salina durante 25 dias. O grupo de controlo veículo foi administrado com carboximetilcelulose com uma concentração de 0,5% durante 25 dias (este controlo serve para determinar se a solução onde os fármacos são veiculados causa algum efeito). O grupo dos ratos expostos apenas a citron-x 100, foram tratados com uma solução salina durante 25 dias e com uma injeção de citron-x 100 ao 25º dia. Os grupos de ratos expostos a metformina foram tratados com uma solução de metformina durante 25 dias, tendo sido injetados com citron-x 100 ao 25º dia. Ao grupo de ratos tratados com atorvastatina foi-lhes administrado durante 25 dias uma solução de atorvastatina e ao 25º dia uma solução de citron-x 100 (Ghatak *et al.*, 2011).

Os parâmetros lipídicos avaliados foram: colesterol total, triglicerídeos (TG), níveis de VLDL, níveis de LDL e níveis em HDL.

Os animais tratados apenas com citron-x 100 mostraram um aumento sérico de colesterol total, LDL, TG e VLDL e uma redução significativa em HDL, quando em comparação com o grupo controlo.

A administração de metformina numa concentração de 400 mg/kg permitiu reduzir os níveis de TG, LDL e VLDL. O LDL foi também reduzido quando a metformina foi administrada na dosagem 500 mg/kg, tendo-se verificado um aumento significativo em HDL nos animais administrados com metformina a 400 e 500 mg/kg conforme descrito na Figura 10.

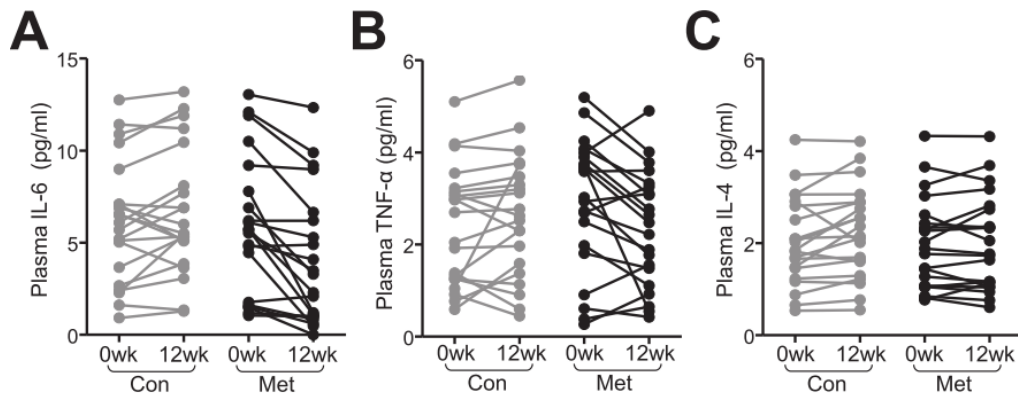


**Figura 10** - Efeitos da metformina no perfil lipídico. (A) - Colesterol Total, (B) - TG, (C) - VLDL, (D) - LDL, (E) – HDL. Cada grupo contém 8 ratos. NC- controlo normal, VC- controlo veículo, CRT-C – controlo citron-x 100, Met- suspensão aquosa de metformina, Ator- Atorvastatina. \* - indica diferença significativa em relação ao controlo normal, # - indica diferença significativa em relação ao grupo controlo citron x-100 (adaptada de Ghatak *et al.*, 2011).

Vários estudos demonstram que os linfócitos e os macrófagos estão envolvidos na inflamação aterosclerótica das paredes das artérias. A ativação de fatores nucleares como Kappa  $\beta$  (NF- $K\beta$ ) induz a ativação de mediadores pro-inflamatórios e citocinas como interleucina-6 (IL-6) e fatores tumorais necróticos  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) (Xu *et al.*, 2015).

As células mononucleares periféricas (MNC) são representativas do estado de inflamação geral, tendo sido demonstrado que estão envolvidas no processo inflamatório e podem refletir os estados de aterosclerose e pro-inflamatório (Xu *et al.*, 2015).

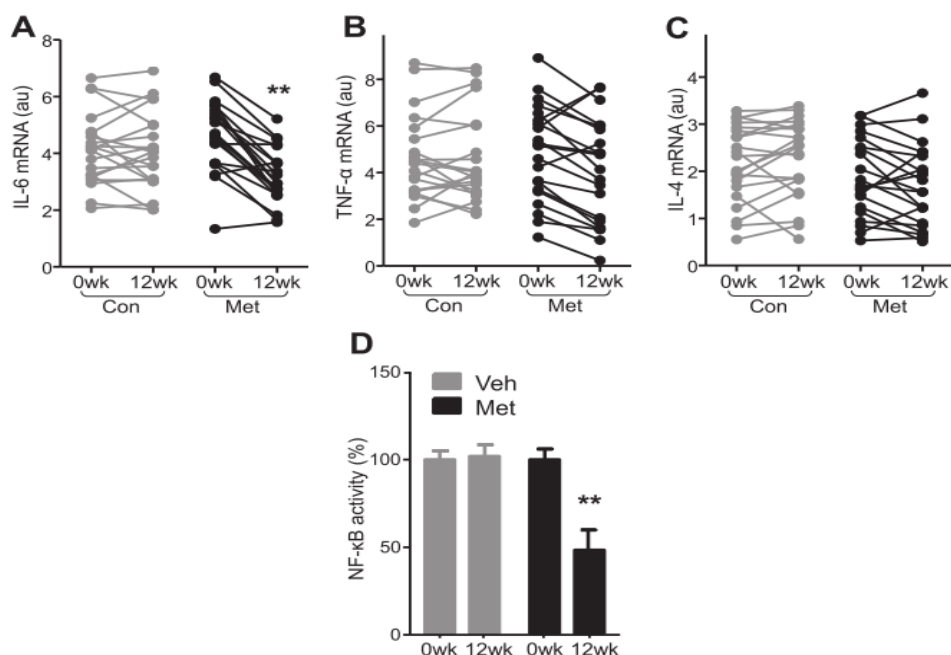
Xu *et al.* desenvolveram um estudo onde pretendiam investigar se a metformina possui propriedades anti-inflamatórias nas MNC em pacientes com a artéria carótida em estado aterosclerótico. Foi analisada a concentração de mediadores pro-inflamatórios e a sua expressão em MNC tendo também sido investigado a ligação de NF- $\kappa$ B ao núcleo de MNC e a sua atividade. Este estudo continha dois grupos de 21 pessoas (21 de controlo e 21 de metformina) tendo os pacientes sido seguidos durante 12 semanas (Xu *et al.*, 2015). Para verificar se a metformina foi capaz de atenuar o estado pro-inflamatório em pacientes com aterosclerose, foram medidos os níveis plasmáticos de IL-6, TNF- $\alpha$ , e Interleucina-4 (IL-4) antes e depois do tratamento com metformina (Xu *et al.*, 2015). Após 12 semanas de tratamento foram medidos os parâmetros no plasma tendo-se verificado uma redução de IL-6 e TNF- $\alpha$ , mas não havendo alterações em IL-4 (Figura 11).



**Figura 11** - Concentração plasmática de fatores pro-inflamatórios após 12 semanas de tratamento. (A) IL-6, (B) TNF- $\alpha$  e (C) IL-4 (adaptada de Xu *et al.*, 2015).

Também foi avaliado se o efeito da metformina nos mediadores pro-inflamatórios no plasma podia estar relacionado com a sua expressão em mRNA nas MNC. Na presença de metformina verificou-se uma redução nos fatores IL-6 e TNF- $\alpha$ , não se tendo verificado diferenças significativas em IL-4. A atividade de ligação de NF- $\kappa$ B ao DNA foi também alvo de análise de maneira a verificar se a metformina conseguia afetar a transcrição de NF- $\kappa$ B em MNC. Verificou-se uma redução de atividade de ligação de NF- $\kappa$ B ao DNA após a administração de metformina conforme indica a Figura 12 (Xu *et al.*, 2015).





**Figura 12** - Modificações na expressão de mRNA nas MNC após tratamento de metformina durante 12 semanas. (A) – expressão mRNA IL-6, (B) expressão de mRNA TNF- $\alpha$ , (C) - expressão de mRNA IL-4, (D) – atividade de ligação de NF-K $\beta$  em MNC, Met- Metformina, Veh- controlo veiculo (adaptada de Xu *et al.*, 2015).

A inflamação vascular é um dos processos fundamentais que leva ao desenvolvimento de aterosclerose, sendo que os fatores pro-inflamatórios têm um papel importante no desenvolvimento desta inflamação. A IL-6 e o TNF- $\alpha$  são citocinas pro-inflamatórias clássicas enquanto a IL-4 é uma citocina anti-inflamatória. Este estudo demonstrou que a administração de metformina é capaz de reduzir as concentrações plasmáticas e a expressão génica de IL-6 e TNF- $\alpha$  ao nível de mRNA, no entanto, não reduziu IL-4 e a principal razão para este resultado pode dever-se a este promotor não conter a sequência de NF-K $\beta$  (Xu *et al.*, 2015).

Lamanna *et al.* publicaram um estudo de meta-análise onde se pretendia verificar os efeitos da metformina na incidência dos eventos cardiovasculares e mortalidade (Lamanna *et al.*, 2011). Todos os estudos que envolvessem comparação com placebo, terapêuticas para baixar a glucose ou inexistência de terapêutica foram incluídos desde que o estudo tivesse uma duração mínima de 52 semanas, tendo os eventos cardiovasculares sido definidos como fatais ou não fatais, enfarte do miocárdio e doença arterial periférica ou outras mortes cardiovasculares. Um total de 35 ensaios foram selecionados que incluíam 7171 participantes tratados com metformina e 11301

participantes tratados com um comparador onde se verificaram 451 e 775 eventos cardiovasculares, respetivamente. Dos ensaios selecionados, 8 não descreveram eventos cardiovasculares significativos e 15 não descreveram eventos cardiovasculares tendo sido portanto excluídos da análise. A meta-análise incidiu portanto em 12 estudos com 5455 participantes tratados com metformina e 8996 participantes tratados com comparativos sendo que 2 desses estudos foram realizados em participantes não diabéticos e 10 realizados em diabéticos (Lamanna *et al.*, 2011). As características dos ensaios incluídos na meta-análise encontram-se descritas na Tabela 1 e os resultados dos estudos individuais na Tabela 2.

**Tabela 1** - Características dos ensaios clínicos incluídos na meta-análise. (adaptada de Lamanna *et al.*, 2011).

Estudo	Seguimento (semanas)	Comparador	Dosagem Metformina (mg/dia)	Tamanho da amostra (Metformina/Comparador)	Adicionalmente	Idade média (anos)	Homens (%)	Média Hemoglobina glicosilada (%)
[1]	52	Placebo	1.700	16/19	Nenhum	57,5	54,2	8,9
[2]	52	Insulina	2.550	25/25	SU	67,0	24,0	12,4
[3]	52	Pioglitazona	2.000	597/597	Nenhum	56,5	55,2	8,7
[4]	104	Placebo	1.700	50/50	Nenhum	53,7	40,0	9,0
[5]	208	Glibenclamida	2.000	1454/1441	Nenhum	57,0	56,9	7,3
	208	Rosiglitazona	2.000	1454/1456	Nenhum	57,0	56,9	7,3
[6]	220	Placebo	2.000	196/194	Nenhum	61,5	45,6	7,9
[7]	260	Rosiglitazona	2.550	1122/1103	SU	59,7	49,8	8,0
[8]#	556	SU/Insulina	2.550	342/951	Nenhum	58	60,0	7,5
	556	Nenhum	2.550	342/411	Nenhum	58	60,0	7,5
[8]# bis	343	Nenhum	2.550	268/269	SU	59	60,0	7,5
[9]	52	Placebo	2.000	49/51	DMI*	45,5	64,0	9,5
[10]	156	Nenhum	500	262/269	IGT	45,0	79,2	6,2
[11]	156	Placebo	1.700	1073/1082	IGT	50,3	32,4	5,9

\*- Adicionalmente a Sulfonilureia; # -Estudo dividido em duas partes. DM1-Diabetes Mellitus tipo 1; IGT- Intolerância à glucose; SU- Sulfonilureia [1] - Hermann *et al.*, 2001, [2] - Klein, 1991, [3] - Scherthaner *et al.*, 2004, [4] - Teupe e Bergis, 1991, [5] - Kahn *et al.*, 2006, [6] - Kooy *et al.*, 2009, [7] - Home *et al.*, 2009, [8] - (UKPDS), 1998, [9] - Lund *et al.*, 2008, [10] - Ramachandran *et al.*, 2006, [11] - Knowler *et al.*, 2002

**Tabela 2** - Resultados dos estudos individuais incluídos na meta-análise. (adaptada de Lamanna *et al.*, 2011).

Estudo	Morbilidade Cardiovascular (Metformina/Comparador)	Enfarte do Miocárdio (Metformina/Comparador)	Ataques súbitos (mg/dia)	Falha Cardíaca Crónica (Metformina/Comparador)	Mortalidade por todas as causas (Metformina/Comparador)	Mortalidade Cardiovascular (Metformina/Comparador)
[1]	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0
[2]	2/0	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0
[3]	23/22	NR/NR	NR/NR	NR/NR	2/3	NR/NR
[4]	1/0	1/0	0/0	0/0	0/0	0/0
[5]	58/41	23/18	19/17	19/9	31/31	NR/NR
	58/62	23/27	19/16	19/22	31/34	NR/NR
[6]	46/45	28/25	9/9	3/4	9/6	3/1
[7]	169/163	NR/NR	NR/NR	NR/NR	72/54	NR/NR
[8] #	57/211	39/139	12/60	11/NR	50/190	25/NR
	57/105	39/73	12/23	11/17	50/89	25/53
[8] # bis	71/73	31/33	15/13	9/6	46/30	25/13
[9]	2/5	NR/NR	NR/NR	NR/NR	0/0	0/0
[10]	5/6	NR/NR	NR/NR	NR/NR	1/2	0/1
[11]	16/42	NR/NR	NR/NR	NR/NR	NR/NR	1/6

# - Estudo dividido em duas partes; NR-Não reportado, [1] - Hermann *et al.*, 2001, [2] - Klein, 1991, [3] - Schernthaner *et al.*, 2004, [4] - Teupe e Bergis, 1991, [5] - Kahn *et al.*, 2006, [6] - Kooy *et al.*, 2009, [7] - Home *et al.*, 2009, [8] - (UKPDS), 1998, [9] - Lund *et al.*, 2008, [10] - Ramachandran *et al.*, 2006, [11] - Knowler *et al.*, 2002.

No geral, a metformina não produziu qualquer efeito significativo nos eventos cardiovasculares, tanto nos ensaios em diabéticos como não diabéticos. No entanto, a metformina foi associada a uma redução significativa de eventos cardiovasculares em comparação com o placebo ou ausência de terapia, não se tendo verificado tal efeito em ensaios comparativos com outros fármacos. Este fármaco foi capaz de reduzir a morbilidade cardiovascular apenas em ensaios que envolviam pacientes com idade inferior a 30 anos e naqueles que excluíaam pacientes com mais de 65 anos (Lamanna *et al.*, 2011).

Com esta meta-análise, usando a meta-regressão e o sistema de probabilidades Mantel-Henzel, os autores concluíram que o efeito da metformina é maior em eventos cardiovasculares quando os ensaios são de grande duração e que limitam a idade de

inclusão no ensaio, significando assim que a metformina parece ser mais benéfica em ensaios de longa duração envolvendo participantes mais novos.

Assim, apesar das suas propriedades interessantes, estes autores concluíram que a metformina não aparenta ter efeitos relevantes em eventos cardiovasculares, para além da sua propriedade de baixar a glucose sanguínea. Curiosamente, a metformina foi associada a uma redução do risco cardiovascular quando comparada com placebo ou ausência de terapia, tendo, no entanto, este efeito desaparecido quando se comparava com outros fármacos em ensaios, explicando assim a falta de efeitos benéficos adicionais quando comparado com outros fármacos com propriedades para baixar a glucose sanguínea. Também não há registo da metformina ter exercido efeitos protetores cardiovasculares em ensaios clínicos em não diabéticos (Lamanna *et al.*, 2011).

#### **IV - A metformina na perda de peso**

A lipogénese é o processo em que os ácidos gordos são sintetizados usando a glucose derivada do metabolismo dos hidratos de carbono como principal substrato. A obesidade é caracterizada por uma deposição de gordura corporal especialmente na zona intra-abdominal. A obesidade é também responsável por provocar doenças como a diabetes tipo 2, aterosclerose, hipertensão, esteatose e osteoartrite (de Oliveira Santana *et al.*, 2016).

Assim sendo, é importante identificar os mecanismos moleculares que se encontram associados ao desenvolvimento da obesidade (de Oliveira Santana *et al.*, 2016).

A metformina inibe a gluconeogénese e afeta o metabolismo lipídico hepático. Este fármaco pode reduzir a expressão de genes envolvidos na lipogénese como as enzimas FAS e ACC (envolvidas na regulação do metabolismo de ácidos gordos) reduzindo assim a síntese de ácidos gordos e TG, enquanto aumenta a oxidação de ácidos gordos. Estes efeitos da metformina parecem ser promovidos pela regulação negativa de SREBP1, envolvido na síntese de colesterol (de Oliveira Santana *et al.*, 2016).

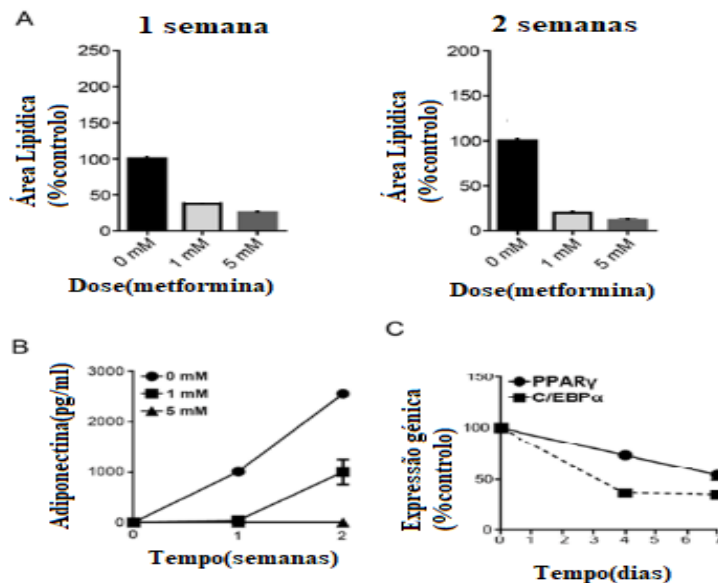
O Recetor  $\gamma$  ativado pelo proliferador peroxissómico (PPAR $\gamma$ ), que serve como regulador de armazenamento lipídico e regulador do metabolismo de glucose, tem um papel importante no metabolismo lipídico promovendo a regulação de enzimas responsáveis pela adipogénese e consumo de ácidos gordos. O PPAR $\gamma$  depois de se cruzar com outras substâncias suprime a transcrição de SREBP1 reduzindo portanto a expressão enzimática de ACC e FAS. Pensa-se que esta inibição ocorre através da ativação de AMPK (de Oliveira Santana *et al.*, 2016).

De acordo com Fujita *et al.* a diferenciação de pré-adipócitos está associada à acumulação de gotículas de gordura nas células passando a células de gordura maduras ou adipócitos quando são expostas a um excesso de energia ingerido. Os adipócitos secretam vários tipos de adipocinas, que são citoquinas e onde se inclui a adiponectina. A diferenciação de adipócitos de células estaminais do estroma mesenquimal é caracterizada por alterações em genes como de PPAR $\gamma$  e proteínas ligantes de potenciação CCAAT (C/EBP $\alpha$ ) sendo estes representativos da regulação em pré-

adipócitos durante o processo de diferenciação de pré-adipócitos a adipócitos maduros (Fujita *et al.*, 2016).

Fujita *et al.* efetuaram um estudo onde se pretendia demonstrar que a metformina inibe a diferenciação de pré-adipócitos. Usaram-se pré-adipócitos viscerais humanos (HPrAD-vis) que foram pré incubados em meio de crescimento e depois em meio de cultura diferenciador com metformina durante 1 ou 2 semanas (Fujita *et al.*, 2016).

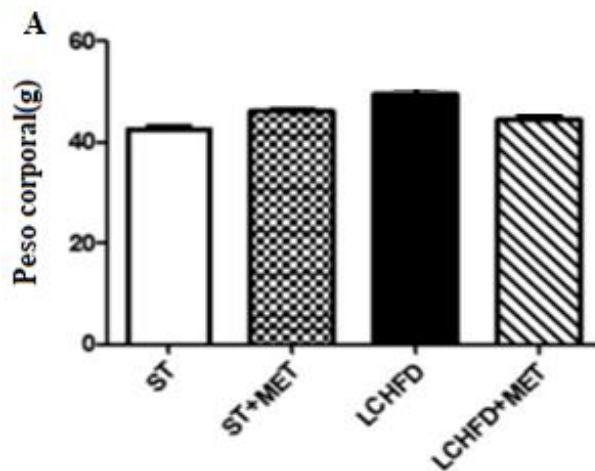
A metformina (1 mM e 5mM) foi capaz de reduzir a acumulação de gotículas lipídicas em pré-adipócitos em 1 e 2 semanas sendo que uma maior concentração de metformina resultou em uma maior redução de acumulação de gotículas lipídicas (Figura 13.A). Foi capaz de reduzir a concentração de adiponectina ao fim de 2 semanas (Figura 13.B), sendo que a concentração 1 mM mostrou-se tão eficaz como 5 mM ao fim da primeira semana mas menos eficaz ao final de 2 semanas, não tendo demonstrado qualquer efeito inibitório no crescimento celular. A metformina 1 mM mostrou-se também capaz de reduzir a expressão génica de PPAR $\gamma$  e C/EBP $\alpha$  ao fim de 1 semana (Figura 13.C).



**Figura 13** - Efeito da metformina na maturação de HPrAD-vis. (A) - Área relativa de células tratadas com e sem metformina tendo as células sido cultivadas durante 1 ou 2 semanas. (B) - A secreção de adiponectina de células HPrAD-vis diminui com a administração de metformina tendo as células sido cultivadas durante 1 ou 2 semanas com e sem metformina. (C) - A expressão de genes envolvidos na diferenciação e maturação de pré-adipócitos é diminuída pela metformina, as células foram incubadas durante 1 semana com e sem metformina (adaptada de Fujita *et al.*, 2016).

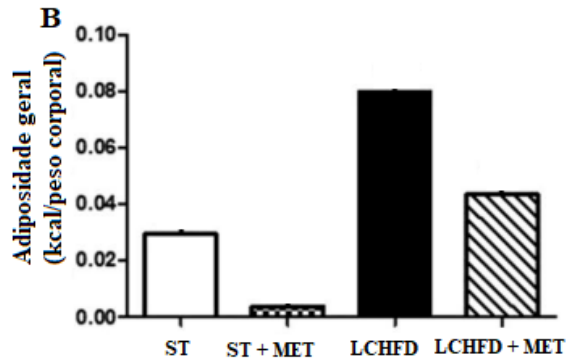
No ano de 2016, de Oliveira Santana *et al.* publicaram um estudo que pretendia avaliar se a metformina é capaz de atenuar a obesidade em ratos. O estudo envolveu o uso de 28 ratos (divididos em grupos de 7) que foram alimentados durante 4 meses com as seguintes dietas: ST, Dieta baixa em hidratos de carbono e rica em gorduras (LCHFD), Dieta padrão com metformina (ST+MET), Dieta baixa em hidratos de carbono, rica em gorduras e com metformina (LCHFD+MET). A obesidade nos ratos foi induzida por uma dieta de LCHFD durante 8 semanas. A metformina foi administrada oralmente durante 2 meses, após o período de indução de obesidade (de Oliveira Santana *et al.*, 2016).

A dieta LCHFD+MET foi capaz de reduzir o peso corporal dos ratos quando comparados com os alimentados apenas com LCHFD. O peso também diminuiu nos ratos alimentados com ST e ST+MET quando comparados com os alimentados com LCHFD conforme indicado na Figura 14.



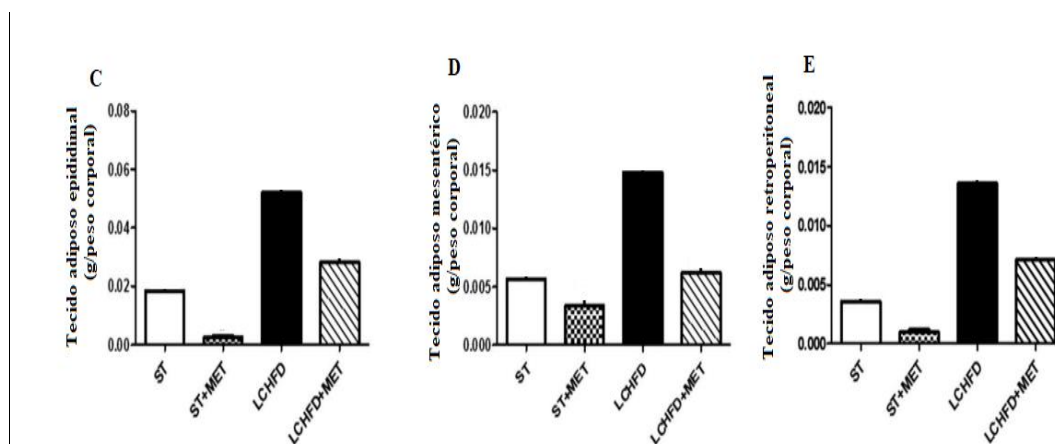
**Figura 14** - Peso corporal dos ratos após diferentes dietas. ST (dieta padrão), ST+MET (dieta padrão + metformina), LCHFD (dieta baixa em hidratos de carbono e rica em gordura), LCHFD+MET (dieta baixa em hidratos de carbono e rica em gordura + metformina) (adaptada de Oliveira Santana *et al.*, 2016).

Relativamente à adiposidade este estudo demonstrou que os ratos alimentados com ST+MET e LCHFD+MET tiveram uma adiposidade geral inferior quando comparados com ST e LCHFD conforme indicado na Figura 15.



**Figura 15** - Adiposidade geral nos ratos tratados com diferentes dietas. ST (dieta padrão), ST+MET (dieta padrão + metformina), LCHF (dieta baixa em hidratos de carbono e rica em gordura), LCHF+MET (dieta baixa em hidratos de carbono e rica em gordura + metformina) (adaptada de Oliveira Santana *et al.*, 2016).

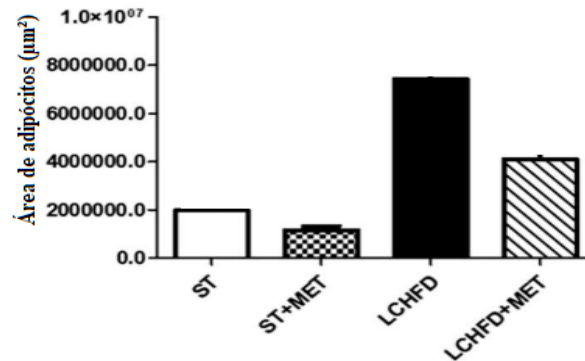
As principais fontes de gordura visceral, gordura epididimal, gordura mesentérica e gordura retroperitoneal, foram avaliadas de forma a medir a gordura total nos ratos (Figura 16). Os que foram alimentados com LCHF apresentaram maior porção de massa adiposa quando comparados com os outros grupos, podendo-se inferir que a metformina foi capaz de reduzir o peso das massas adiposas para níveis similares a ratos alimentados com ST.



**Figura 16** - Principais fontes de gordura visceral nos ratos. (C) - gordura epididimal, (D) - gordura mesentérica, (E) - gordura retroperitoneal. ST (dieta padrão), ST+MET (dieta padrão + metformina), LCHF (dieta baixa em hidratos de carbono e rica em gordura), LCHF+MET (dieta baixa em hidratos de carbono e rica em gordura + metformina) (adaptada de Oliveira Santana *et al.*, 2016).

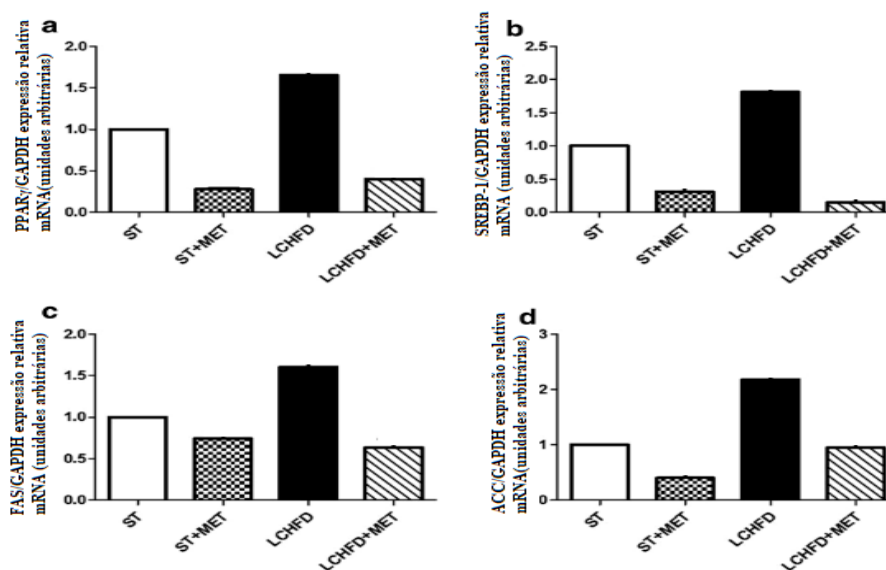


A análise histológica realizada ao nível dos tecidos demonstrou que a metformina reduziu o diâmetro dos adipócitos de LCHF+MET quando comparados com LCHF, ST, e ST+MET demonstrando assim os benefícios do tratamento de metformina na hipertrofia de adipócitos encontrado na obesidade e também em peso normal conforme demonstrado na Figura 17.



**Figura 17-** Área de adipócitos nos ratos tratados com diferentes dietas. ST (dieta padrão), ST+MET (dieta padrão + metformina), LCHF (dieta baixa em hidratos de carbono e rica em gordura), LCHF+MET (dieta baixa em hidratos de carbono e rica em gordura + metformina) (adaptada de Oliveira Santana *et al.*, 2016).

A expressão de genes que estão relacionados com a adipogénese foi também medida usando gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase endógena (GAPDH) como controlo interno. Observou-se que PPAR $\gamma$ , SREBP1, FAS, e ACC tiveram a sua expressão reduzida no tecido adiposo epididimal nos ratos alimentados com LCHF+MET. Além disso, verificou-se uma redução na expressão de PPAR $\gamma$  e SREBP1 no grupo ST+MET comparado com o grupo ST, demonstrando assim a ação da metformina na adipogénese conforme demonstrado na Figura 18.



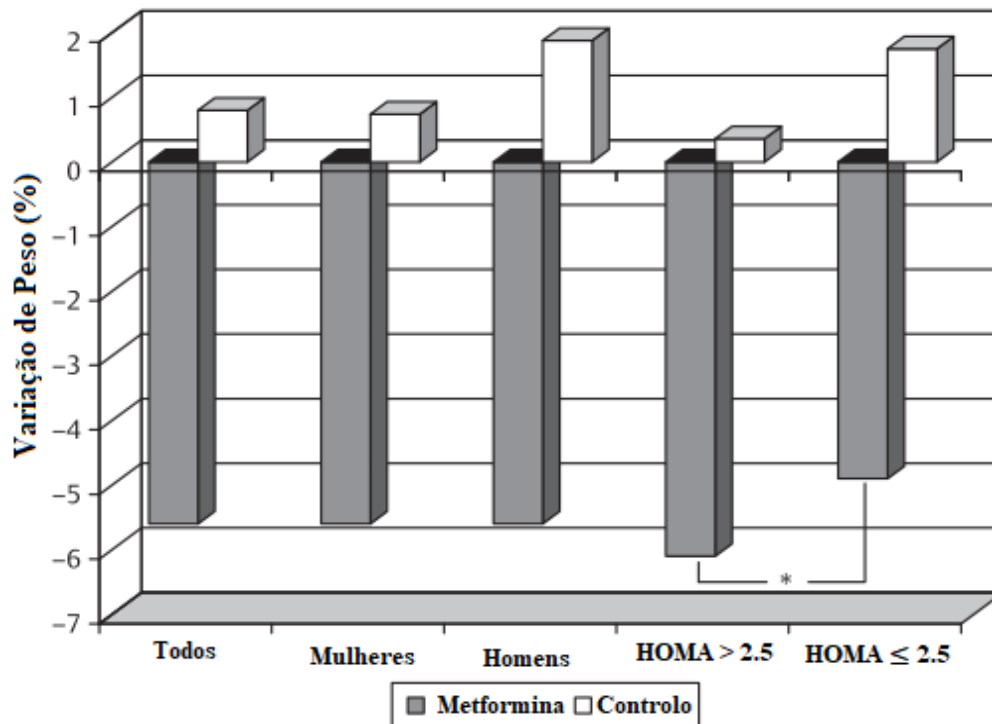
**Figura 18** - Expressão de genes lipogénicos no tecido adiposo epididimal com diferentes dietas. ST (dieta padrão), ST+MET (dieta padrão + metformina), LCHF (dieta baixa em hidratos de carbono e rica em gordura), LCHF+MET (dieta baixa em hidratos de carbono e rica em gordura + metformina) (adaptada de Oliveira Santana *et al.*, 2016).

Segundo Seifarth *et al.* existem apenas alguns fármacos capazes de ter um efeito de perda de peso com um perfil de efeitos secundários favorável como os análogos de péptido semelhante a glucagon 1 (GLP-1), nomeadamente a liraglutida (Seifarth *et al.*, 2013). Também segundo estes autores a obesidade em indivíduos não diabéticos está ligada a uma resistência à insulina e portanto os efeitos da metformina na perda de peso poderiam estar associados a uma melhoria neste estado de resistência (Seifarth *et al.*, 2013).

Para comprovar esta hipótese Seifarth *et al.* levaram a cabo um estudo que procurava testar a eficácia da metformina na redução do peso em pacientes não diabéticos e obesos em um ambiente ambulatorio. Neste estudo, o grau de resistência à insulina dos pacientes foi avaliado através da medida do índice de modelo de avaliação homeostático (HOMA), sendo que os pacientes que apresentassem um índice superior a 2,5 foram considerados resistentes à insulina. Os pacientes admitidos neste estudo possuíam um Índice de Massa Corporal (IMC) superior a 27 kg/m<sup>2</sup> e o teste de tolerância à glucose a que foram submetidos antes do estudo foi considerado normal. Os pacientes foram seguidos durante 6 meses, tendo participado 199 indivíduos (179 mulheres e 20

homens), sendo que 154 pacientes foram incluídos no grupo de metformina (138 mulheres e 16 homens), com uma dose média diária de metformina de 2230 mg, e os restantes 45 pacientes foram alocados no grupo controlo (41 mulheres e 4 homens) (Seifarth *et al.*, 2013).

Foi observado uma perda de peso de pelo menos 10% em 16,2% e pelo menos 5% em 47,4% dos 154 pacientes tratados com metformina (Figura 19). No grupo tratado com metformina a perda de peso foi significativa quando comparado com o controlo, com uma perda de peso média durante os 6 meses de  $5,8 \pm 7,0$  kg ( $5,6 \pm 6,5\%$ ) registando uma amplitude desde a perda de 35 kg a um aumento de 13 kg. A perda de peso no grupo de pacientes resistentes à insulina ( $\text{HOMA} \geq 2,5$  n=111) foi mais significativa do que no grupo não resistente à insulina ( $\text{HOMA} \leq 2,5$  n=43) (Seifarth *et al.*, 2013).



**Figura 19** - Variação de peso corporal em relação ao peso inicial após tratamento de 6 meses com metformina (adaptado de Seifarth *et al.*, 2013).

Estes autores concluíram que a eficácia da metformina na redução do peso se deve em parte ao grau de resistência a insulina. A associação entre o ganho de peso e resistência a insulina é clara contribuindo para um aumento de obesidade abdominal. No entanto, é ainda uma incógnita se a resistência à insulina leva à obesidade ou se é uma consequência desta. Ao melhorar o perfil de resistência à insulina é possível reduzir o

peso corporal através de alguns mecanismos, como por exemplo a redução de hipoglicemia causada por uma secreção pós-prandial lenta com um pico de insulina retardado, a inibição da produção de glucose hepática e a inibição da absorção de glucose intestinal. A gordura abdominal tende a reter a sensibilidade à insulina ao contrário do músculo-esquelético e hepático o que leva a um aumento de gordura abdominal em pacientes com resistência a insulina. A metformina melhora a sensibilidade periférica à insulina, o que reduz a hipersecreção pancreática de insulina. Como consequência, o recetor de insulina da gordura abdominal é exposto a níveis inferiores de insulina que podem resultar em uma absorção inferior energética pela gordura abdominal e portanto reduzir a massa gorda (Seifarth *et al.*, 2013).

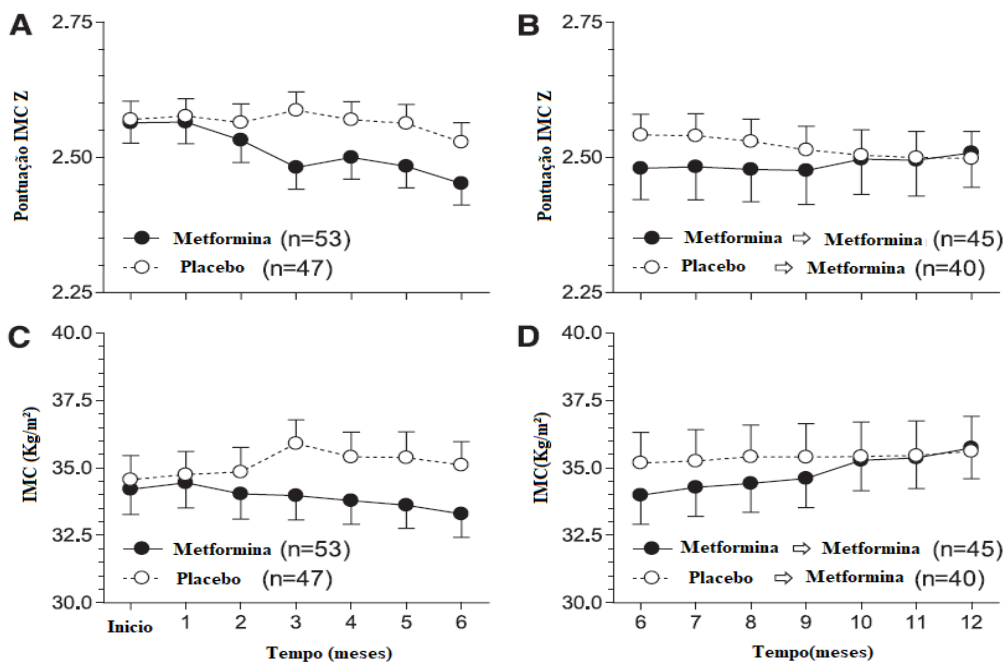
A prevalência de obesidade pediátrica tem aumentado desde a década de 1970, sendo que atualmente 19,6% das crianças entre 6 e 11 anos são consideradas obesas nos Estados Unidos da América (Yanovski *et al.*, 2011). Relativamente a Portugal, 11,7% das crianças entre 6 e 8 anos de idade sofrem de obesidade (COSI, 2016). O excesso de gordura corporal em crianças está associado a uma resistência à insulina, que pode levar a um desenvolvimento de anormalidades metabólicas e ao desenvolvimento de diabetes tipo 2, estando também relacionada com a síndrome metabólica em adultos (Yanovski *et al.*, 2011).

Yanovski *et al.* realizaram um estudo cujo objetivo era determinar se a metformina era responsável pela perda de peso e melhoria das morbilidades relacionadas com a obesidade em crianças obesas e insulino-resistentes. O estudo foi realizado com 100 crianças obesas (IMC  $34 \pm 6,6$  kg/m<sup>2</sup>) resistentes à insulina com idades entre os 6 e 12 anos às quais foram administrados ou 1000 mg de metformina (n=53), duas vezes ao dia perfazendo um total de 2000 mg diárias, ou placebo (n=47), tendo todos os participantes sido incluídos em um programa de perda de peso acompanhados por um nutricionista. Dos participantes, 85% completaram o ensaio de 6 meses, tendo a estes sido proposto continuar numa segunda fase dos ensaios durante outros 6 meses onde a metformina seria atribuída a todos os participantes. Na segunda fase do ensaio 67% dos 85% pacientes iniciais concluíram o estudo (Yanovski *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos durante a primeira fase da experiência, em que se usou placebo e metformina, mostraram que ambos os grupos conseguiram uma redução de IMC Z (que é uma medida relativa de IMC ajustada para crianças considerando a sua idade e o seu

sexo). No entanto, o grupo metformina conseguiu uma diminuição mais significativa em relação ao grupo placebo com uma diferença entre ambos de -0,07 pontos de IMC Z. Em relação ao IMC a diferença entre grupos foi favorável à metformina, com uma diferença de -1,09 kg/m<sup>2</sup> e a diferença de peso corporal entre grupos foi de -3,38 kg com o diferencial também favorável ao grupo metformina. A circunferência corporal e espessura de pele diminuíram no grupo tratado com metformina, apesar de não se ter verificado uma diferença em relação à gordura intra-abdominal entre grupos.

Na segunda fase da experiência em que ambos os grupos passaram a tomar metformina, o grupo que tomava placebo nos primeiros 6 meses conseguiu uma redução significativa no IMC Z. Os pacientes que foram tratados continuamente com metformina registaram um aumento insignificante em IMC Z quando comparado com os seus valores aos 6 meses, tendo aumentado o seu IMC absoluto, sendo este consistente com o desenvolvimento das crianças. Os pacientes examinados ao final de 12 meses conseguiram um IMC Z inferior ao seu IMC Z inicial (Figura 20).



**Figura 20** – Variação de IMC durante o estudo. A- Pontuação IMC Z durante o primeiro semestre de ensaio com placebo ou metformina; B- Pontuação IMC Z durante o segundo semestre de ensaio em que ambos os grupos receberam metformina; C- IMC durante o primeiro semestre de ensaio com placebo ou metformina; D- IMC durante o segundo semestre de ensaio em que ambos os grupos receberam metformina (adaptada de Yanovski *et al.*, 2011).

Os autores deste estudo concluíram que a metformina produziu ligeiras variações em IMC Z, e quando comparado com o placebo influenciou algumas melhorias na gordura e peso corporal, não tendo no entanto sido capaz de influenciar a gordura intra-abdominal (Yanovski *et al.*, 2011).

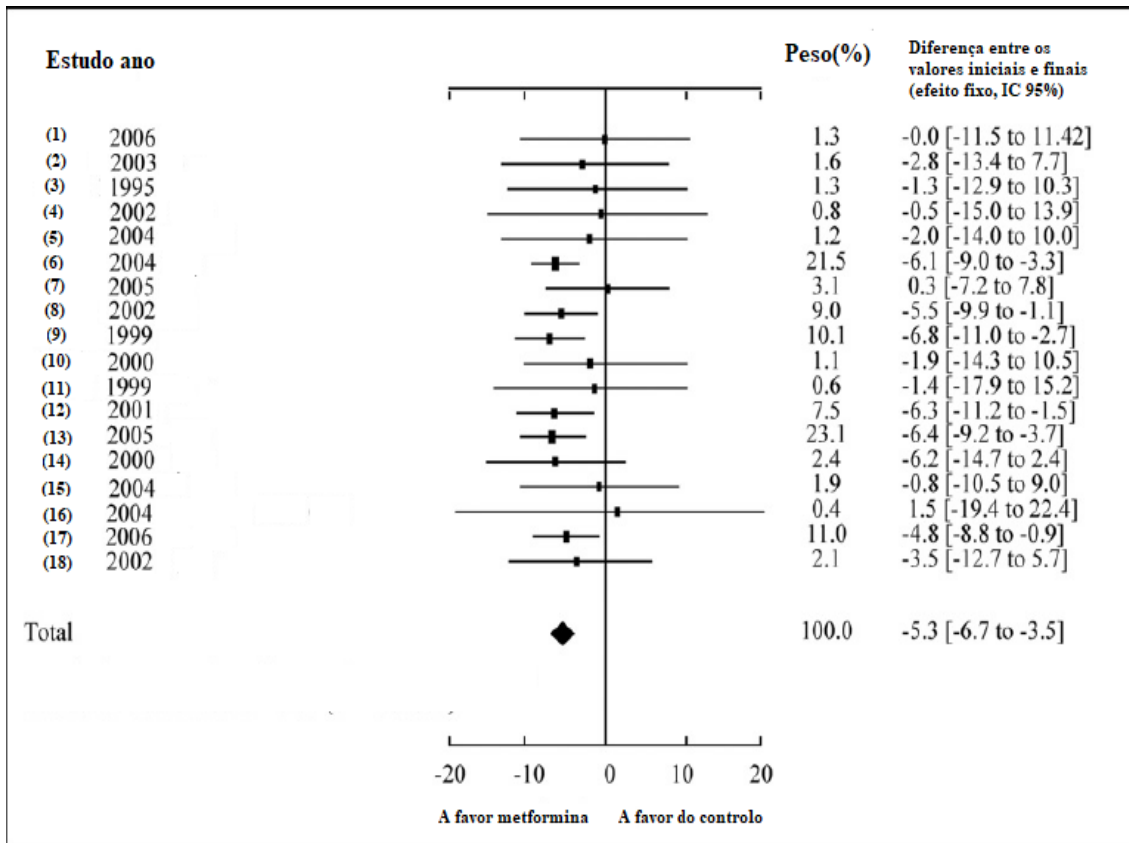
Salpeter *et al.* publicaram uma meta-análise que avaliava os efeitos de metformina em indivíduos não diabéticos e nos quais tinham sido medidos vários parâmetros metabólicos, entre os quais o IMC. Os ensaios clínicos incluídos nesta meta-análise foram analisados entre 1966 e 2006, tendo uma duração mínima de 8 semanas e que comparavam a metformina com placebo ou ausência de tratamento (Salpeter *et al.*, 2008). Foram seleccionados 31 ensaios com 4570 participantes, estando as características do ensaio representadas na Tabela 3.

**Tabela 3** - Características dos ensaios analisados (adaptada de Salpeter *et al.*, 2008).

Ensaio	Número de Ensaio	Participantes no Estudo	Duração (anos)	Idade(±DP) tratamento controlo	IMC(±DP) tratamento controlo
Todos os ensaios	31	4570	1.8	45.7 (9.5) 45.1 (9.2)	32.3 (4.0) 32.7 (3.6)
Com PCOS conhecido	14	620	0.4	22.9 (3.1) 27.8 (3.2)	33.9 (4.7) 34.1 (4.0)
Sem PCOS conhecido	18	3950	2.0	48.3 (6.9) 47.7 (6.7)	32.1 (3.8) 32.5 (3.3)
Com Obesidade	20	3393	1.8	46.2 (10.1) 45.7 (9.9)	34.3 (1.6) 34.4 (1.7)
Sem Obesidade	8	966	1.9	44.4 (7.2) 44.2 (7.4)	25.5 (1.2) 26.8 (1.7)

PCOS= Síndrome do ovário policístico IMC= Índice de massa corporal DP= Desvio Padrão

Nos ensaios que avaliaram o IMC notou-se que o grupo da metformina, quando comparado com os grupos placebo ou ausência de tratamento, reduziu este parâmetro em 5,3%, conforme indicado na Figura 21 (Salpeter *et al.*, 2008).



**Figura 21** - Efeito da metformina no IMC em pacientes não diabéticos (variação em percentagem). IC- Intervalo de confiança. (1) Bridger *et al.*, 2006, (2) Chou *et al.*, 2003, (3) Crave *et al.*, 1995, (4) Fleming *et al.*, 2002, (5) Gambineri *et al.*, 2004, (6) Hoeger *et al.*, 2004, (7) James *et al.*, 2005, (8) Kocak *et al.*, 2002, (9) Li *et al.*, 1999, (10) Moghetti *et al.*, 2000, (11) Morel *et al.*, 1999, (12) Ng *et al.*, 2001, (13) Orchard *et al.*, 2005, (14) Pasquali *et al.*, 2000, (15) Rodriguez *et al.*, 2004, (16) Rodriguez-Moctezuma *et al.*, 2005, (17) Srinivasan *et al.*, 2006, (18) Sturrock *et al.*, 2002 (adaptada de Salpeter *et al.*, 2008).

## V - A metformina na síndrome do ovário policístico

A PCOS também conhecida como síndrome de Stein-Leventhal, foi primeiramente descrita em 1935 como um distúrbio menstrual, infertilidade e uma sobreprodução de testosterona e obesidade, estando fortemente associada à síndrome metabólica. A PCOS é o distúrbio endócrino mais comum e a principal causa de infertilidade em mulheres em idade reprodutora. Estima-se que 5-10 % das mulheres em idade reprodutora sofram deste distúrbio (Nathan e Sullivan, 2014).

Os Critérios de Roterdão para diagnóstico de PCOS incluem: hiperandrogenismo (clínico ou bioquímico), irregularidade no ciclo menstrual (anovulação ou oligovulação) e ovários policísticos (Nathan e Sullivan, 2014). Um ovário é considerado policístico se for maior que 10 cm<sup>3</sup> ou se possuir mais de 12 folículos que meçam mais de 2-9 mm em diâmetro (Nathan e Sullivan, 2014).

As mulheres que sofram de PCOS têm um risco mais elevado de desenvolver gravidezes com complicações, nomeadamente diabetes gestacional, hipertensão gestacional ou pré-eclampsia e maior propensão para necessitar de tecnologia reprodutiva assistida (Nathan e Sullivan, 2014).

Zahra *et al.* referem que a resistência à insulina e hiperinsulinémia tem um papel chave no desenvolvimento de PCOS, tanto em mulheres obesas como não obesas. A insulina estimula a biossíntese intra ovariana de hormonas esteroides que interagem com hormona luteinizante (LH), que por sua vez resultam na diferenciação de células foliculares imaturas, levando a um aumento de secreção do ovário e crescimento folicular anómalo (Zahra *et al.*, 2016).

Lashen refere que a resistência à insulina tem um papel chave no desenvolvimento de PCOS e que a estratégia de tratamento deve andar à volta da redução de resistência à insulina e hiperinsulinémia, o que justifica a grande atenção que a metformina tem recebido em relação ao tratamento desta patologia (Lashen, 2010). Para além disso, PCOS não é apenas uma doença reprodutiva dado que decorre ao longo da vida com consequências a longo prazo, designadamente a alta morbilidade e mortalidade, diabetes



mellitus tipo 2, síndrome metabólica, doenças cardiovasculares e cancro do endométrio. Todas estas morbilidades têm sido associadas à resistência à insulina e obesidade, e não fazem parte dos critérios de diagnóstico de Roterdão. O cancro do endométrio é principalmente causado por anovulação e estimulação endometrial por estrogénio durante um longo período de tempo, sendo que as mulheres que sofrem de PCOS têm cerca de 5,3 vezes maior probabilidade de desenvolver cancro do endométrio (Lashen, 2010).

Zahra *et al.* afirma também que o péptido semelhante a insulina 3 (INSL-3) e a visfatina participam de forma importante em várias doenças patofisiológicas. O INSL-3 e a visfatina são duas hormonas que parecem ter uma ligação íntima com o desenvolvimento de PCOS. O INSL-3 é expresso nas células teca dos folículos ováricos e no *corpus luteum* sendo que as mulheres que sofrem de PCOS geralmente apresentam uma maior retenção folicular em diferentes estágios de diferenciação quando a expressão de INSL-3 nas células teca está no seu máximo. Já a visfatina é uma citocina que imita as ações da insulina, tendo um papel importante no metabolismo da glucose estando ligada a vários estados inflamatórios e relacionada com as células  $\beta$  (Zahra *et al.*, 2016).

O tratamento de mulheres que sofram de PCOS com metformina resulta numa diminuição de insulina assim como dos níveis de testosterona total e livre, levando a uma melhoria das manifestações clínicas de hiperandrogenismo (Nathan e Sullivan, 2014).

Nathan e Sullivan referem que no geral o aborto prematuro afeta entre 30-50% das gravidezes de mulheres que sofrem de PCOS, sendo esta taxa 3 vezes superior a mulheres que não sofram de PCOS, afirmando que a terapia com metformina melhora a taxa de ovulação e a taxa de gravidezes de sucesso em mulheres que sofram de PCOS (Nathan e Sullivan, 2014).

Al-Biate realizou um estudo que pretendia avaliar a eficácia da metformina na redução de abortos precoces em mulheres grávidas com PCOS. Este estudo envolveu 106 mulheres não diabéticas que engravidaram enquanto tomavam metformina. As pacientes foram divididas em dois grupos, o grupo metformina que tomava 1000 mg/dia (n=56) e continuou o tratamento e o grupo que descontinuou metformina (n=50). A taxa de

aborto precoce no grupo metformina foi de 8,9% (5/56) e no grupo controlo 36% (18/50). No grupo metformina 25/56 mulheres já tinham tido abortos precoces e no grupo controlo houve 20/50 mulheres na mesma situação, sendo que na altura nenhuma delas estava a tomar metformina. O autor concluiu que a metformina foi associada a uma redução de abortos precoces em mulheres que sofram de PCOS (Al-Biate, 2015).

Várias investigações têm mostrado que a metformina é capaz de melhorar os resultados associados ao ciclo menstrual e melhorar a função ovulatória em mulheres que sofram de PCOS. Lord *et al.* realizaram uma meta-análise na qual investigaram os efeitos de fármacos capazes de sensibilizar a insulina comparando-os com placebo, ausência de tratamento ou agentes de indução de ovulação. A meta-análise envolveu 13 ensaios clínicos com 543 mulheres tendo os resultados demonstrado que a metformina possui capacidade para melhorar os resultados clínicos. A meta-análise mostrou que 46% das mulheres que receberam metformina foram capazes de ovular contrastando com 24% das mulheres que receberam placebo. Relativamente às mulheres que receberam metformina + clomifeno 76% ovularam enquanto que a percentagem de ovulação naquelas que receberam apenas clomifeno foi de 42%. Os autores concluem que a metformina apresenta potencial para ser encarada como um fármaco de primeira linha no que respeita à ovulação, no entanto a eficácia é maior quando associada a clomifeno. Os autores recomendam que a metformina seja usada como um adjuvante na modificação do estilo de vida maximizando assim os seus efeitos relacionados com PCOS (Lord *et al.*, 2003).

Kjotrod *et al.* estudaram os efeitos da metformina na taxa de gravidez clínica em mulheres não obesas com PCOS antes e durante o uso de tecnologia reprodutiva assistida. Para este estudo foram recrutadas 149 mulheres de oito centros de tratamento de fertilidade com um IMC <28 kg/m<sup>2</sup> e idade inferior a 38 anos que tinham estado a tentar sem sucesso a reprodução durante pelo menos um ano. As participantes foram divididas e tratadas com 2000 mg metformina/dia (n=74) ou placebo (n=75) durante 12 semanas antes e durante o protocolo de reprodução assistida sendo esses fertilização *in vitro* ou por injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Na sétima semana foi testada a existência de gravidez usando o ultrassonografia para avaliação de gestação intrauterina (com batimento cardíaco) (Kjotrod *et al.*, 2011). As características da população podem ser verificadas na Tabela 4.

**Tabela 4** - População em estudo no ensaio de fertilidade (adaptada de Kjotrod *et al.*, 2011).

<b>População</b>	<b>Número de Participantes</b>	<b>Metformina n(%)</b>	<b>Placebo n(%)</b>
<b>Intenção de tratar</b>	149	74 (49.7)	75 (50.3)
<b>Gravidez Espontânea</b>	23	15 (65.2)	8 (34.8)
<b>População de tecnologia reprodutiva assistida</b>	112	56 (50.0)	56 (50.0)

Das 149 mulheres, 23 atingiram a gravidez antes de iniciarem o tratamento de fertilização e 112 iniciaram a estimulação gonadotrófica. No total, 71 pacientes iniciaram fertilização *in vitro* (metformina n=40; placebo n=31) e 31 pacientes iniciaram ICSI (metformina n=11, placebo n=20) tendo 5 pacientes iniciado ambos os procedimentos (metformina n=3, placebo n=2) (Kjotrod *et al.*, 2011).

Kjotrod *et al.* observaram um total de 62 gravidezes clínicas na população que tinha intenção de tratar, sendo que no grupo metformina foram atingidas 37/74 (50%) e no grupo placebo 25/75 (33,3%). Em ambos os grupos houve um aborto pelo que um total de 60 nados vivos foram observados nesta população sendo que 36/74 (48,6%) no grupo metformina e no grupo placebo 24/75 (32,0%). Na população de gravidezes espontâneas, foram observadas 15/74 (20,3%) no grupo metformina e 8/75 (10,7%) no grupo placebo. Na população de tecnologia reprodutiva assistida, obteve-se um nível semelhante nas gravidezes bioquímicas para ambos os grupos metformina e placebo 24/56 (42,9%) tendo ocorrido 10 abortos (metformina n=3; placebo n=7), tendo 5 sido gravidezes bioquímicas (metformina n=2; placebo n=3) e os restantes 5 abortos que ocorreram antes das 12 semanas de gravidez (metformina n=1; placebo n=4) (Kjotrod *et al.*, 2011). Na Tabela 5 é possível verificar os resultados das gravidezes.

**Tabela 5** - Resultados das gravidezes na população estudada. (adaptada de Kjotrod *et al.*,2011).

Resultado	Metformina n(%)	Placebo n(%)	Diferença (95 % IC)%
<b>1 População intenção de tratar</b>			
Gravidez clínica	37/74 (50.0)	25/75 (33.3)	16.7 (1.1 to 32.3)
Nados vivos	36/74 (48.6)	24/75 (32.0)	16.7 (1.1 to 32.2)
<b>2 População de gravidez espontânea</b>			
Gravidez clínica espontânea	15/74 (20.3)	8/75 (10.7)	9.6 (-1.9 to 21.1)
<b>3 População tecnologia reprodutiva assistida</b>			
Gravidez bioquímica	24/56 (42.9) <sup>a</sup>	24/56 (42.9) <sup>b</sup>	0.0 (-18.3 to 18.3)
Gravidez clínica <sup>c</sup>	22/56 (39.3)	17/56 (30.4)	8.9 (-8.6 to 26.5)
Nados vivos	21/56 (37.5)	16/56 (28.6)	8.9 (-8.4 to 26.3)

IC- Intervalo de confiança, a) duas gravidezes bioquímicas, um aborto clínico; b) três gravidezes bioquímicas, três casos de gestação intrauterina não viável na semana 7; uma gravidez ectópica, um aborto na semana 10; c) Definido por prova de ultrassonografia de uma gestação intrauterina viável na semana 7 seguido de transferência do embrião.

Os autores concluíram que o pré-tratamento com metformina melhora a taxa de gravidez espontânea em mulheres não obesas com PCOS, mas não afeta significativamente os resultados de fertilização *in vitro* e ICSI. Demonstraram também um aumento considerável de gravidezes clínicas e taxa de nados vivos usando um fármaco seguro e barato. Sugerem também que o tratamento com metformina durante pelo 12 semanas antes e durante a fertilização *in vitro* e ICSI, vale a pena considerar como estratégia para abordar mulheres não obesas com PCOS sendo também importante otimizar a dieta e estilo de vida. Os autores realçam também o facto do uso de metformina ter sido continuado durante a fase lútea sem efeitos deletérios nas gravidezes (Kjotrod *et al.*, 2011).

Legro *et al.* executaram um ensaio clínico em que colocavam a hipótese do tratamento com metformina de libertação prolongada em mulheres inférteis com PCOS ser mais provável resultar em um nado vivo comparativamente com o tratamento com citrato de clomifeno, fármaco de 1ª linha para tratamento de infertilidade. Colocaram também a hipótese de a combinação das duas terapias resultar numa maior taxa de natalidade. Para este ensaio clínico, 626 mulheres foram distribuídas de forma aleatória por três grupos, grupo clomifeno (n=209), grupo metformina (n=208), grupo terapia combinada (n=209). As mulheres foram instruídas para manter relações sexuais com intervalos de 2-3 dias, tendo os níveis de progesterona sido medidos semanalmente e mensalmente realizado um exame médico, teste de gravidez urinário e análises sanguíneas. As pacientes foram tratadas até seis ciclos ou 30 semanas tendo a medicação sido descontinuada assim que se comprovou a gravidez. Os principais resultados analisados no ensaio foram a taxa de natalidade, taxa de abortos, nascimento de apenas um feto e ovulação (Legro *et al.*, 2007).

A taxa de natalidade foi mais baixa no grupo metformina que no grupo clomifeno e no grupo de terapia combinada, não se tendo verificado vantagens no uso de terapia combinada em relação ao grupo clomifeno (tendo os autores verificado que nas participantes com IMC <30 kg/m<sup>2</sup> a taxa de natalidade foi superior) (Legro *et al.*, 2007).

A taxa de ovulação foi mais elevada no grupo de terapia combinada do que nos grupos metformina e clomifeno. O número de ovulações por participante foi de 2,22±1,8 no grupo clomifeno, 1,43±1,72 no grupo metformina e 2,80±2,04 no grupo terapia combinada não se tendo traduzido um maior número de ovulações em uma taxa de natalidade superior. É considerada uma ovulação quando o nível sérico de progesterona sérico é > 5 ng/mL durante um ciclo. Durante o estudo não se verificou ovulação em 52/209 (24,9%) mulheres no grupo clomifeno, 93/208 (44,7%) no grupo metformina e 35/209 (16,7%) no grupo terapia combinada. As taxas de conceção e nados vivos por ciclo em que ocorreu ovulação e por participante foram maiores no grupo clomifeno e no grupo terapia combinada do que no grupo metformina (Legro *et al.*, 2007). Os resultados do ensaio clínico podem ser verificados na Tabela 6.

**Tabela 6** - Taxas de ovulação, gravidez e aborto (adaptada de Legro *et al.*, 2007).

Variável	Grupo Clomifeno (n=209)	Grupo Metformina (n=208) <i>no./total no. (%)</i>	Grupo Terapia Combinada (n=209)	Diferença absoluta entre terapia combinada e Metformina % (95 % IC)
<b>Ovulação</b>	462/942 (49.0)	296/1019 (29.0)	582/964 (60.4)	31.4 (24.7 to 38.0)
<b>Concepção</b>	62/209 (29.7)	25/208 (12.0)	80/209 (38.3)	26.3 (18.4 to 34.2)
<b>Gravidez</b>	50/209 (23.9)	18/208 (8.7)	65/209 (31.1)	22.4 (15.0 to 29.8)
Feto único	47/50 (94.0)	18/18 (100.0)	63/65 (96.9)	-3.1 (-7.3 to 1.1)
Gémeos	2/50 (4.0)	0	2/65 (3.1)	-3.1 (-10.1 to 16.3)
Tripos	1/50 (2.0)	0	0	0 (-12.7 to 12.7)
Outros	0	0	0	0 (-12.7 to 12.7)
<b>Nados Vivos</b>	47/209 (22.5)	15/208 (7.2)	56/209 (26.8)	19.6 (12.6 to 26.6)
<b>Abortos</b>				
Abortos totais em participantes que conceberam	16/62 (25.8)	10/25 (40.0)	24/80 (30.0)	-10.0 (-31.7 to 11.7)
Abortos no primeiro trimestre	14/62 (22.6)	10/25 (40.0)	20/80 (25.0)	-14.5 (-35.9 to 6.9)
Fator bioquímico ou ausência de batimento cardíaco fetal	10/62 (16.1)	7/25 (28.0)	13/80 (16.2)	-11.7 (-31.1 to 7.7)
Gravidez ectópica	2/62 (3.2)	0	2/80 (2.5)	2.5 (-7.8 to 12.8)
Aborto após observação de ritmo cardíaco	2/62 (3.2)	3/25 (12.0)	5/80 (6.2)	-5.7 (-19.5 to 8.1)
Aborto no segundo trimestre	2/62 (3.2)	0	4/80 (5.0)	5.0 (-5.7 to 15.7)
<b>Eventos entre ciclos ovulatórios</b>				
Concepção	62/462 (13.4)	25/296 (8.4)	80/582 (13.7)	5.4 (1.2 to 9.6)
Gravidez de feto único	47/462 (10.2)	18/296 (6.1)	63/582 (10.8)	4.7 (1.0 to 8.4)
Nados vivos de gravidez de feto único	47/462 (10.2)	15/296 (5.1)	56/582 (9.6)	4.5 (1.0 to 8.0)
<b>Eventos entre pacientes que ovularam</b>				
Concepção	62/157 (39.5)	25/115 (21.7)	80/174 (46.0)	24.3 (13.7 to 34.9)
Gravidez de feto único	47/157 (29.9)	18/115 (15.7)	63/174 (36.2)	20.5 (10.7 to 30.3)
Nados vivos de feto único	47/157 (29.9)	15/115 (13.0)	56/174 (32.2)	19.2 (9.9 to 28.5)

em que: IC - Intervalo de Confiança

Os autores concluíram que a terapia de clomifeno como primeira linha terapêutica para tratamento de infertilidade em mulheres com PCOS deve manter esse estatuto, no entanto sublinham que não se deve excluir as potencialidades que a metformina apresenta (Legro *et al.*, 2007).

Shigiyama *et al.* relataram um caso de uma mulher de 32 anos infértil, que notou alguns sinais de hiperandrogenismo, como acne, hirsutismo e irregularidade menstrual nos últimos 3 anos. Tinha iniciado tratamento para infertilidade um ano antes com clomifeno não tendo conseguido atingir uma gravidez. Durante o seu exame médico para iniciar novo tratamento para infertilidade foi diagnosticada com PCOS. Como esta

patologia normalmente está associada a resistência à insulina, foi analisada para a existência de diabetes tendo sido diagnosticada com diabetes mellitus tipo 1 num estado inicial com resistência moderada a insulina. O seu IMC era 21 kg/m<sup>2</sup> sendo consistente desde os 20 anos de idade indicando portanto que não sofria de obesidade. O seu desejo de engravidar levou a que para além de terapia com insulina tivesse iniciado terapia com metformina na esperança de melhorar os sintomas de hiperandrogenismo e resistência à insulina. Os seus folículos ovários foram observados no dia 25 do ciclo menstrual antes de iniciar o tratamento com metformina e no dia 15 do ciclo seguinte após início da terapia verificaram-se melhorias assinaláveis ao nível do seu distúrbio menstrual nomeadamente na ovulação. Após o primeiro mês de tratamento com metformina e insulina, foi iniciado tratamento com clomifeno durante 3 meses resultando numa gravidez. Embora o clomifeno seja o fármaco de primeira linha para tratamento de disfunção do ovário, a metformina também tem ganho reputação, tendo mostrado ser capaz de melhorar a anovulação e o ciclo menstrual em mulheres com PCOS devido à sua capacidade de sensibilizar a insulina e hiperandrogenismo. A adição de metformina a insulina é capaz de reduzir a quantidade de insulina necessária e melhorar os sintomas hiperandrogénicos em pacientes com PCOS e diabetes mellitus tipo 1. Os autores concluíram que a metformina foi eficaz no tratamento de PCOS com diabetes mellitus tipo 1 principalmente devido ao facto de diminuir as consequências de resistência a insulina e hiperinsulinemia que exarceba PCOS através de hiperandrogenismo, facilitando a função do clomifeno (Shigiyama *et al.*, 2016).

Huang *et al.* realizaram um estudo onde pretendiam avaliar se a diminuição de sinais relacionados com PCOS usando metformina levaria a uma melhoria da qualidade de vida. O estudo envolveu participantes com idades entre os 18 e 45 anos, com uma idade média de 28,3 anos, diagnosticadas com PCOS que receberam tratamento com metformina durante 6 meses tendo sido examinadas mensalmente. Foram recrutadas para o estudo 109 participantes (56% com obesidade e 80% com hiperandrogenismo). A qualidade de vida foi avaliada em entrevistas usando questionários da OMS e específicos para PCOS, envolvendo pontuações atribuídas às respostas recolhidas. Os questionários foram realizados antes, durante e depois do tratamento com metformina. Os tópicos que figuravam nos questionários eram emocionais/psicológicos, crescimento capilar/hirsutismo, peso corporal e menstruação, sendo a pontuação mais baixa

sinónimo de uma qualidade de vida inferior e uma pontuação mais elevada sinónimo de qualidade de vida superior (Huang *et al.*, 2016).

Os resultados mostraram que no geral as pacientes com PCOS tiveram pontuações muito baixas no início das entrevistas no aspeto psicológico verificando-se assim o impacto de PCOS na qualidade de vida dos pacientes. As pacientes obesas tiveram pontuações muito inferiores quando comparadas com pacientes de peso normal. À medida que o tratamento e as entrevistas foram avançando, e os questionários repetidos, verificou-se uma melhoria dos resultados nos domínios psicológicos e sociais, tendo-se registado grandes melhorias no aspeto físico. As pacientes hiperandrogénicas tiveram pontuações inferiores às que não sofriam de hiperandrogenismo, tendo os resultados nos domínios psicológico, social e físico melhorado a par com o tratamento de metformina. Registaram-se melhorias na acne e no hirsutismo. As pacientes com PCOS tiveram uma pontuação inferior no peso corporal e uma pontuação maior no que respeita ao crescimento capilar, significando que os distúrbios psicológicos tiveram maior impacto no peso corporal do que no crescimento capilar no que à qualidade de vida diz respeito (Huang *et al.*, 2016).

Os autores concluíram que a metformina pode ser importante na melhoria de qualidade de vida melhorando aspetos psicológicos relacionados com acne e hirsutismo especialmente para pacientes obesas e que sofriam de hiperandrogenismo (Huang *et al.*, 2016).

Embora PCOS seja o distúrbio endócrino mais comum em mulheres, tem sido difícil para os centros de investigação atingir um número de amostra significativo que não envolva controvérsia. Para além do mais realizar uma meta-análise que não sofra de heterogeneidade significativa tem-se revelado difícil para os estudos multicentro provavelmente devido a falta de financiamento (Lashen, 2010).



## VI - Conclusão

Embora o mecanismo de ação concreto da metformina continue por desvendar, é certo que não existe apenas um efeito, sendo a ação deste fármaco multifatorial.

As doenças cardiovasculares são uma das principais causas de morte mundial. Nos ensaios em animais, a metformina demonstrou potencial para reduzir alguns dos fatores associados a estas doenças como AT1R e os indicadores do perfil lipídico, tendo também evidenciado propriedades para mitigar fatores pró-inflamatórios. Quando a análise incidiu em seres humanos, a metformina, em comparação com o placebo, foi capaz de afetar positivamente os eventos cardiovasculares, particularmente em pacientes mais jovens e ensaios de maior duração. No entanto, quando comparada com fármacos com função de reduzir a glicemia como a rosiglitazona ou pioglitazona, os seus efeitos benéficos desapareceram, sugerindo que os potenciais efeitos protetores da metformina se devam principalmente à sua propriedade de baixar a glucose sanguínea.

A obesidade, responsável por milhões de mortes e morbilidades associadas à doença, é um problema de saúde pública que necessita de ser gerido. Estudos em ratos comprovaram a capacidade da metformina em reduzir a acumulação de gotículas lipídicas, os genes lipogénicos e o peso corporal. Esta molécula mostrou também alguma capacidade no controlo de obesidade humana, levando em alguns casos à perda de peso significativa, mostrando aptidão para reduzir o IMC em obesos e eficácia em indivíduos resistentes à insulina. Este último facto está intimamente ligado ao desenvolvimento de obesidade e a metformina reduz esse estado de resistência. Apesar das vantagens enumeradas, este fármaco não conseguiu reduzir a gordura abdominal que é um fator essencial no desenvolvimento da obesidade.

A PCOS é o distúrbio endócrino mais comum em mulheres em idade reprodutora, estando fortemente associada a uma resistência à insulina, tendo como consequências a anovulação, abortos precoces e hirsutismo. O tratamento de mulheres que sofrem de PCOS com metformina, quando comparado com placebo, mostrou uma redução nas taxas de aborto precoce melhoria nas taxas de ovulação e diminuição de hirsutismo. Contudo, quando comparada com o citrato de clomifeno revela dificuldades em destacar-se deste fármaco de primeira linha para o tratamento de infertilidade. Ainda assim, a terapia combinada metformina e clomifeno mostrou ser vantajosa.

As doenças cardiovasculares, a obesidade e a PCOS estão associadas a uma resistência à insulina, devendo as estratégias, especialmente para as duas últimas, concentrar-se neste aspeto que é essencial para o desenvolvimento destas patologias. Estas doenças podem ser melhoradas com uma mudança no estilo de vida associada à terapêutica com metformina, principalmente quando esta é administrada a pacientes mais jovens. Apesar do potencial apresentado não é ainda inequívoca a sua eficácia, sendo necessário um maior aprofundamento dos estudos para entender o seu efeito farmacológico e otimizar o seu uso.

Assim sendo, na atualidade a pergunta que se coloca é: Metformina, uma (des)ilusão ou uma molécula mágica? A resposta permanece ainda incerta.

## VII - Referências bibliográficas

- (UKPDS), U. P. D. S. (1998). *Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34)*. *The Lancet*, 352(9131), pp. 854-865.
- Al-Biate, M. A. (2015). *Effect of metformin on early pregnancy loss in women with polycystic ovary syndrome*. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 54(3), pp. 266-269.
- Asai, A., Shuto, Y., Nagao, M., Miyazawa, T., Sugihara, H. e Oikawa, S. (2016). *Antiatherogenic effect of metformin in two mouse lines with different susceptibility to glucose intolerance*. *Atherosclerosis*, 252, pp. e149.
- Bailey, C. J. (2017). *Metformin: historical overview*. *Diabetologia*, 60(9), pp. 1566-1576.
- Bridger, T., Macdonald, S. e Baltzer, F. (2006). *Randomized Placebo-Controlled Trial of Metformin for Adolescents With Polycystic Ovary Syndrome*. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 160(3), pp. 241-246.
- Chou, K. H., Corleta, H., Capp, E. e Spritzer, P. M. (2003). *Clinical, Metabolic and Endocrine Parameters in Response to Metformin in Obese Women with Polycystic Ovary Syndrome: A Randomized, Double-Blind and Placebo-Controlled Trial*. *Horm Metab Res*, 35(2), pp. 86-91.
- COSI 2016. Childhood Obesity Surveillance Initiative. [Em linha]. Disponível em <[http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/4857/9/COSI%202016\\_V2\\_20fev2018.pdf](http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/4857/9/COSI%202016_V2_20fev2018.pdf)> [Consultado em 27-07-2018].
- Crave, J. C., Fimbel, S., Lejeune, H., Cugnardey, N., Déchaud, H. e Pugeat, M. (1995). *Effects of diet and metformin administration on sex hormone-binding globulin, androgens, and insulin in hirsute and obese women*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 80(7), pp. 2057-2062.

de Oliveira Santana, K. N., Lelis, D. F., Mendes, K. L., Lula, J. F., Paraiso, A. F., Andrade, J. M., Feltenberger, J. D., Cota, J., da Costa, D. V., de Paula, A. M., Guimaraes, A. L. e Santos, S. H. (2016). *Metformin Reduces Lipogenesis Markers in Obese Mice Fed a Low-Carbohydrate and High-Fat Diet. Lipids*, 51(12), pp. 1375-1384.

Després, J. (2003). *Potential contribution of metformin to the management of cardiovascular disease risk in patients with abdominal obesity, the metabolic syndrome and type 2 diabetes. Diabetes Metab*, pp.

Fleming, R., Hopkinson, Z. E., Wallace, A. M., Greer, I. A. e Sattar, N. (2002). *Ovarian Function and Metabolic Factors in Women with Oligomenorrhea Treated with Metformin in a Randomized Double Blind Placebo-Controlled Trial The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(2), pp. 569-574.

Forouzandeh, F., Salazar, G., Patrushev, N., Xiong, S., Hilenski, L., Fei, B. e Alexander, R. W. (2014). *Metformin beyond diabetes: pleiotropic benefits of metformin in attenuation of atherosclerosis. J Am Heart Assoc*, 3(6), pp. e001202.

Fujita, K., Iwama, H., Oura, K., Tadokoro, T., Hirose, K., Watanabe, M., Sakamoto, T., Katsura, A., Mimura, S., Nomura, T., Tani, J., Miyoshi, H., Morishita, A., Yoneyama, H., Okano, K., Suzuki, Y., Himoto, T. e Masaki, T. (2016). *Metformin-suppressed differentiation of human visceral preadipocytes: Involvement of microRNAs. Int J Mol Med*, 38(4), pp. 1135-1140.

Gambineri, A., Pelusi, C., Genghini, S., Morselli-Labate, A. M., Cacciari, M., Pagotto, U. e Pasquali, R. (2004). *Effect of flutamide and metformin administered alone or in combination in dieting obese women with polycystic ovary syndrome. Clinical Endocrinology*, 60(2), pp. 241-249.

Ghatak, S. B., Dhamecha, P. S., Bhadada, S. V. e Panchal, S. J. (2011). *Investigation of the potential effects of metformin on atherothrombotic risk factors in hyperlipidemic rats. Eur J Pharmacol*, 659(2-3), pp. 213-223.

Graham, G. G., Punt, J., Arora, M., Day, R. O., Doogue, M. P., Duong, J. K., Furlong, T. J., Greenfield, J. R., Greenup, L. C., Kirkpatrick, C. M., John E. Ray, J. E., Timmins, P. e Williams, K. M. (2011). *Clinical Pharmacokinetics of Metformin*. *Clinical Pharmacokinetics*, 50(2), pp. 81-98.

Griffin, S. J., Leaver, J. K. e Irving, G. J. (2017). *Impact of metformin on cardiovascular disease: a meta-analysis of randomised trials among people with type 2 diabetes*. *Diabetologia*, 60(9), pp. 1620-1629.

Harborne, L. R., Sattar, N., Norman, J. E. e Fleming, R. (2005). *Metformin and Weight Loss in Obese Women with Polycystic Ovary Syndrome: Comparison of Doses*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(8), pp. 4593-4598.

Hermann, L. S., Kalén, J., Katzman, P., Lager, I., Nilsson, A., Norrhamn, O., Sartor, G. e Ugander, L. (2001). *Long-term glycaemic improvement after addition of metformin to insulin in insulin-treated obese type 2 diabetes patients*. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 3(6), pp. 428-434.

Hoeger, K. M., Kochman, L., Wixom, N., Craig, K., Miller, R. K. e Guzik, D. S. (2004). *A randomized, 48-week, placebo-controlled trial of intensive lifestyle modification and/or metformin therapy in overweight women with polycystic ovary syndrome: a pilot study*. *Fertil Steril*, 82(2), pp. 421-429.

Home, P. D., Pocock, S. J., Beck-Nielsen, H., Curtis, P. S., Gomis, R., Hanefeld, M., Jones, N. P., Komajda, M. e McMurray, J. J. V. (2009). *Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes in oral agent combination therapy for type 2 diabetes (RECORD): a multicentre, randomised, open-label trial*. *The Lancet*, 373(9681), pp. 2125-2135.

Huang, T., Chen, P. C., Wu, M. H. e Lin, C. Y. (2016). *Metformin improved health-related quality of life in ethnic Chinese women with polycystic ovary syndrome*. *Health Qual Life Outcomes*, 14(1), pp. 119.

James, A. P., Watts, G. F. e Mamo, J. C. (2005). *The effect of metformin and rosiglitazone on postprandial lipid metabolism in obese insulin-resistant subjects. Diabetes Obes Metab*, 7(4), pp. 381-389.

Kahn, S. E., Haffner, S. M., Heise, M. A., Herman, W. H., Holman, R. R., Jones, N. P., Kravitz, B. G., Lachin, J. M., O'Neill, M. C., Zinman, B. e Viberti, G. (2006). *Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy. N Engl J Med*, 355(23), pp. 2427-2443.

Kjotrod, S. B., Carlsen, S. M., Rasmussen, P. E., Holst-Larsen, T., Mellembakken, J., Thurin-Kjellberg, A., Haapaniemi, K., Morin-Papunen, L., Humaidan, P., Sunde, A. e von Düring, V. (2011). *Use of metformin before and during assisted reproductive technology in non-obese young infertile women with polycystic ovary syndrome: a prospective, randomized, double-blind, multi-centre study. Hum Reprod*, 26(8), pp. 2045-2053.

Klein, W. (1991). *Sulfonylurea-metformin-combination versus sulfonylurea-insulin-combination in secondary failures of sulfonylurea monotherapy. Results of a prospective randomized study in 50 patients. Diabete Metab*, 17(1 Pt 2), pp. 235-240.

Knowler, W., Barrett-Connor, E., Fowler, S. E., Hamman, R. F., Lachin, J. M., Walker, A. E. e Nathan, D. M. (2002). *Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. The New England Journal of Medicine*, 346(6), pp.

Kocak, M., Caliskan, E., Simsir, C. e Haberal, A. (2002). *Metformin therapy improves ovulatory rates, cervical scores, and pregnancy rates in clomiphene citrate-resistant women with polycystic ovary syndrome. Fertility and Sterility*, 77(1), pp. 101-106.

Kooy, A., Jager, J., Lehert, P., Bets, D., Wulffélé, M. G., Donker, A. J. e Stehouwer, D. A. (2009). *Long-term Effects of Metformin on Metabolism and Microvascular and Macrovascular Disease in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. Arch Intern Med.*, 169(6), pp. 616-625.

Lamanna, C., Monami, M., Marchioni, N. e Manucci, E. (2011). *Effect of metformin on cardiovascular events and mortality: a meta-analysis of randomized clinical trials. Diabetes, Obesity and Metabolism*, 13(3), pp. 221-228.

Lashen, H. (2010). *Role of metformin in the management of polycystic ovary syndrome. Ther Adv Endocrinol Metab*, 1(3), pp. 117-128.

Legro, R. S., Barnhart, H. B., Schlaff, W. D. e Carr, B. R. (2007). *Clomiphene, Metformin, or Both for Infertility in the Polycystic Ovary Syndrome. N Engl J Med*, 356(6), pp. 551-566.

Li, C. L., Pan, Y. C., Lu, J. M., Zhu, Y., Wang, J. H., Xia, F. C., Wang, H. Z. e Wang, H. Y. (1999). *Effect of metformin on patients with impaired glucose tolerance. Diabetic Medicine*, 16(6), pp. 477-481.

Lord, J. M., Flight, I. H. e Norman, R. J. (2003). *Insulin-sensitising drugs (metformin, troglitazone, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for polycystic ovary syndrome. Cochrane Database Syst Rev*, (2), pp.

Lund, S. S., Tarnow, L., Astrup, A. S., Hovind, P., Jacobsen, P. K., Alibegovic, A. C., Parving, I., Pietraszek, L., Frandsen, M., Rossing, P., Parving, H. H. e Vaag, A. A. (2008). *Effect of adjunct metformin treatment in patients with type-1 diabetes and persistent inadequate glycaemic control. A randomized study. PLoS One*, 3(10), pp. e3363.

Malin, S. K. e Kashyap, S. R. (2014). *Effects of metformin on weight loss: potential mechanisms. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 21(5), pp. 323-329.

Moggetti, P., Castello, R., Negri, C., Tosi, F., Perrone, F., Caputo, M., Zanolin, E. e Muggeo, M. (2000). *Metformin Effects on Clinical Features, Endocrine and Metabolic Profiles, and Insulin Sensitivity in Polycystic Ovary Syndrome: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled 6-Month Trial, followed by Open, Long-Term Clinical Evaluation. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(1), pp. 139-146.

Morel, Y., Golay, A., Perneger, T., Lehmann, T., Vadas, L., Pasik, C. e Reaven, G. M. (1999). *Metformin treatment leads to an increase in basal, but not insulin-stimulated, glucose disposal in obese patients with impaired glucose tolerance. Diabetic Medicine*, 16(8), pp. 650-655.

Naderpoor, N., Shorakae, S., de Courten, B., Misso, M. L., Moran, L. J. e Teede, H. J. (2015). *Metformin and lifestyle modification in polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. Hum Reprod Update*, 21(5), pp. 560-574.

Nathan, N. e Sullivan, S. (2014). *The Utility of Metformin Therapy in Reproductive-Aged Women with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). Current Pharmaceutical Biotechnology*, 15(1), pp. 70-83.

Ng, E. H. Y., Wat, N. M. S. e Ho, P. C. (2001). *Effects of metformin on ovulation rate, hormonal and metabolic profiles in women with clomiphene-resistant polycystic ovaries: a randomized, double-blinded placebo-controlled trial Human Reproduction*, 16(8), pp. 1625-1631.

Orchard, T. J., Temprosa, M., Goldberg, R., Haffner, S., Ratner, R., Marcovina, S. e Fowler, S. (2005). *The Effect of Metformin and Intensive Lifestyle Intervention on the Metabolic Syndrome: The Diabetes Prevention Program Randomized Trial. Ann Intern Med*, 142(8), pp. 611-619.

Pasquali, R., Gambineri, A., Biscotti, D., Vicennati, V., Gagliardi, L., Colitta, D., Fiorini, S., Cognigni, E., Filicori, M. e Morselli-Labate, A. M. (2000). *Effect of Long-Term Treatment with Metformin Added to Hypocaloric Diet on Body Composition, Fat Distribution, and Androgen and Insulin Levels in Abdominally Obese Women with and without the Polycystic Ovary Syndrome. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(8), pp. 2767-2774.

Ramachandran, A., Snehalatha, C., Mary, S., Mukesh, B., Bhaskar, A. D., Vijay, V. e Indian Diabetes Prevention, P. (2006). *The Indian Diabetes Prevention Programme*



*shows that lifestyle modification and metformin prevent type 2 diabetes in Asian Indian subjects with impaired glucose tolerance (IDPP-1). Diabetologia, 49(2), pp. 289-297.*

Rena, G., Pearson, E. R. e Sakamoto, K. (2013). *Molecular mechanism of action of metformin: old or new insights? Diabetologia, 56(9), pp. 1898-1906.*

Rodriguez-Moctezuma, J. R., Robles-Lopez, G., Lopez-Carmona, J. M. e Gutierrez-Rosas, M. J. (2005). *Effects of metformin on the body composition in subjects with risk factors for type 2 diabetes. Diabetes Obes Metab, 7(2), pp. 189-192.*

Rodriguez, Y., Giri, M., Feyen, E. e Christophe, A. B. (2004). *Effect of metformin vs. placebo treatment on serum fatty acids in non-diabetic obese insulin resistant individuals. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 71(6), pp. 391-397.*

Salpeter, S. R., Buckley, N. S., Kahn, J. A. e Salpeter, E. E. (2008). *Meta-analysis: metformin treatment in persons at risk for diabetes mellitus. Am J Med, 121(2), pp. 149-157 e142.*

Schernthaner, G., Matthews, D. R., Charbonnel, B., Hanefeld, M., Brunetti, P. e Quartet Study, G. (2004). *Efficacy and safety of pioglitazone versus metformin in patients with type 2 diabetes mellitus: a double-blind, randomized trial. J Clin Endocrinol Metab, 89(12), pp. 6068-6076.*

Seifarth, C., Schehler, B. e Schneider, H. J. (2013). *Effectiveness of metformin on weight loss in non-diabetic individuals with obesity. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 121(1), pp. 27-31.*

Shigiyama, F., Kumashiro, N., Rikitake, T., Usui, S., Saegusa, M., Kitamura, M., Uchino, H. e Hirose, T. (2016). *A case of lean polycystic ovary syndrome with early stage of type 1 diabetes successfully treated with metformin. Endocrine Journal, 63(2), pp. 193-198.*

Srinivasan, S., Ambler, G. R., Baur, L. A., Garnett, S. P., Tepsa, M., Yap, F., Ward, G. M. e Cowell, C. T. (2006). *Randomized, controlled trial of metformin for obesity and insulin resistance in children and adolescents: improvement in body composition and fasting insulin. J Clin Endocrinol Metab*, 91(6), pp. 2074-2080.

Stavri, S., Trusca, V. G., Simionescu, M. e Gafencu, A. V. (2015). *Metformin reduces the endotoxin-induced down-regulation of apolipoprotein E gene expression in macrophages. Biochem Biophys Res Commun*, 461(2), pp. 435-440.

Sturrock, N. D. C., Lannon, B. e Fay, T. N. (2002). *Metformin does not enhance ovulation induction in clomiphene resistant polycystic ovary syndrome in clinical practice. Br J Clin Pharmacol*, 53(5), pp. 469-473.

Teupe, B. e Bergis, K. (1991). *Prospective randomized two-years clinical study comparing additional metformin treatment with reducing diet in type 2 diabetes. Diabete Metab*, 17((1 Pt 2)), pp. 213-217.

Viollet, B., Guigas, B., Sanz Garcia, N., Leclerc, J., Foretz, M. e Andreelli, F. (2012). *Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. Clin Sci (Lond)*, 122(6), pp. 253-270.

Wang, Q., Zhang, M., Torres, G., Wu, S., Ouyang, C., Xie, Z. e Zou, M. (2016). *Metformin suppresses diabetes-accelerated atherosclerosis via the inhibition of Drp1 mediated mitochondrial fission. pp.*

Xu, W., Deng, Y. Y., Yang, L., Zhao, S., Liu, J., Zhao, Z., Wang, L., Maharjan, P., Gao, S., Tian, Y., Zhuo, X., Zhao, Y., Zhou, J., Yuan, Z. e Wu, Y. (2015). *Metformin ameliorates the proinflammatory state in patients with carotid artery atherosclerosis through sirtuin 1 induction. Transl Res*, 166(5), pp. 451-458.

Yanovski, J. A., Krakoff, J., Salaita, C. G., McDuffie, J. R., Kozlosky, M., Sebring, N. G., Reynolds, J. C., Brady, S. M. e Calis, K. A. (2011). *Effects of metformin on body*

*weight and body composition in obese insulin-resistant children: a randomized clinical trial. Diabetes, 60(2), pp. 477-485.*

Zahra, M., Shah, M., Ali, A. e Rahim, R. (2016). *Effects of Metformin on Endocrine and Metabolic Parameters in Patients with Polycystic Ovary Syndrome. Horm Metab Res, 49(2), pp. 103-108.*

Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J. e Moller, D. E. (2001). *Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. J Clin Invest, 108(8), pp. 1167-1174.*