

## Microdoses de metformina aumentam as reservas de glicogênio em músculo esquelético de ratos

Carlos Alberto da Silva  
Rinaldo Roberto de Jesus Guirro  
Karina Maria Cancellero  
Franciléia Gideone Barros  
Rita de Cássia Chaim Menezes  
Fabiana Forti

*Programa de Pós-graduação em Fisioterapia - Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade Metodista de Piracicaba SP*

**Resumo:** Recentes estudos realizados em ratos e humanos diabéticos mostraram que o tratamento com metformina promove uma expressiva redução na glicemia devido à elevação na captação muscular de glicose mesmo na ausência da insulina. Há evidências da relação entre a metformina, a enzima hexoquinase, o sistema de captação de glicose e a síntese de glicogênio. O objetivo deste estudo foi avaliar o conteúdo de glicogênio dos músculos sóleo e gastrocnêmio de ratos tratados com microdoses de metformina durante 15 dias ( $1,6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  e  $3,2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Os resultados mostraram que a metformina na concentração  $1,6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  não interferiu no conteúdo muscular de glicogênio, no entanto, promoveu elevação de 78% nas reservas de glicogênio na concentração de  $3,2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , sem promover alteração na glicemia e lactatemia. Assim, este estudo sugere que a microdose de metformina na concentração de  $3,2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  eleva o conteúdo muscular de glicogênio e pode melhorar o desempenho físico e/ou modificar o período de exaustão.

**Palavras-chave:** Metformina, glicogênio, músculo, desempenho físico.

### *Microdose of metformin enhances glycogen reserves in rat skeletal muscle*

**Abstract:** Recently, studies in diabetic rats and humans have shown that metformin treatment promotes a reduction of glycaemia by enhancing glucose uptake even in the absence of insulin. There is evidence of a relationship between metformin, hexokinase activity, glucose uptake, and glycogen synthesis. The purpose of this study was to evaluate the muscle glycogen reserves of rats treated with microdoses of metformin for 15 days ( $1.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  or  $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Our study showed that a  $1.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  dose of metformin does not have an effect on glycogen synthesis, but a  $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of metformin increases the muscle glycogen reserves by 78% ( $p < 0.05$ ). We did not observe a hypoglycemic or a hyperlactemic effect. We concluded that a micro dose of metformin ( $3.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) increases glycogen content and could enhance exercise performance and changes in exhaustion period.

**Keywords:** Metformin, glycogen, muscle, performance.

### Introdução

A homeostasia energética das fibras musculares é mantida às custas das interações metabólicas entre as vias que coordenam a captação e o metabolismo de diferentes substratos energéticos destacando-se os ácidos graxos livres e a glicose, que são substratos preferencialmente metabolizados.

Com relação à captação de glicose, é sabido que as fibras musculares apresentam isoformas de transportadores de glicose do tipo GLUT 1, responsáveis pela captação basal e GLUT 4, cuja população é variável dependendo da ação da insulina, da atividade metabólica tecidual ou ainda da atividade contrátil (LAWRENCE; ROACH, 1997).

Dentro de um perfil endócrino, a insulina promove a translocação do GLUT 4 de compartimentos túbulo-vesiculares citosólicos até a membrana, elevando com isso a magnitude da captação de glicose que pode ser oxidada e liberada na forma de lactato, alanina ou piruvato ou direcionada à síntese de glicogênio (HUNDAL et al., 1992, HUNDAL; INZUCCHI, 2003). No que tange às reservas de glicogênio, sabe-se que são extremamente importantes, pois apresentam relações diretas com a capacidade aeróbica ou de "endurance" do organismo, de forma que, alterações no perfil enzimático e/ou nestas reservas são responsáveis pela redução na eficiência muscular, bem como o desenvolvimento do estado de fadiga ou exaustão (SNYDER, 1998).

Dentre as substâncias utilizadas no tratamento de diabéticos não dependentes de insulina, a biguanida metformina destaca-se por exercer ação anti-hiperglicemiante representada pela redução na glicogenólise hepática concomitante à elevação na captação de glicose por tecidos periféricos e formação de reservas de glicogênio especialmente no tecido muscular (MEUILLET et al., 1997, 1999; HARDIE, 2003; VAGUE, 2003).

Recentes estudos realizados em fibras musculares isoladas constataram que a citocalasina B, substância bloqueadora do transporte de glicose, inibiu a captação de 2-deoxiglicose e 3-O-metilglicose induzida pela metformina sendo verificado que na presença de ciclohexamida, inibidor de síntese protéica, a captação de glicose transcorreu normalmente revelando que a metformina não eleva a expressão gênica dos transportadores, mas promove translocação destes, de reservatórios citosólicos em direção à membrana elevando com isso a captação da glicose (WULFFELE et al., 2004.; HENRY, 2003; BELL, 2004).

Por décadas a metformina tem sido administrada a diabéticos na dose de 12 mg/Kg peso. No entanto, recentemente observamos que microdoses de metformina modifica o perfil metabólico de eritrócitos de ratos normais e diabéticos modificando sua capacidade de reservar glicogênio (SILVA, 1997). Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar se microdoses de metformina alteram o padrão das reservas hepáticas e musculares de glicogênio.

### Material e métodos

Utilizamos ratos adultos machos Wistar obtidos do biotério da UNIMEP, Piracicaba, SP, os quais foram distribuídos em grupos experimentais sendo mantidos em gaiolas coletivas contendo 4 ratos cada.

Tabela 1. Distribuição dos animais em grupos experimentais.

GRUPO	Nº de animais
Controle	12
Metformina 1,6µg.ml <sup>-1</sup>	12
Metformina 3,2 µg.ml <sup>-1</sup>	12

### Tratamento e amostragem

Os grupos tratados com metformina receberam a droga diluída na água para beber, na concentração final de 1,6 ou 3,2 µg.ml<sup>-1</sup> durante 15 dias. Esta concentração foi administrada apoiada em estudos que demonstraram que ratos ingerem 10-11 ml de água/dia, sendo corrigida diariamente de acordo com a ingesta (SOARES et al.,1993). Após o período, os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/Kg) e o sangue coletado da veia porta sendo prontamente

centrifugado e o plasma isolado. Amostras do fígado e dos músculos sóleo e gastrocnêmio foram isoladas e retiradas para avaliação bioquímica do conteúdo de glicogênio segundo Lo et al (1970).

Para a determinação da concentração plasmática de glicose e lactato foram utilizados métodos enzimáticos colorimétricos (SIGMA diagnósticos).

### Teste de tolerância à glicose

Para realização do teste de tolerância à glicose, via intravenosa, os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg/Kg de peso, i.p). Após a anestesia, foi realizada uma incisão e localizada a veia femoral. Com o auxílio de seringas utilizadas para injetar insulina, uma amostra de sangue (0,3ml) foi coletada para determinação da glicemia inicial (tempo zero). Em seguida, foi administrada uma sobrecarga de glicose (1g/Kg de peso) e outras amostras foram coletadas aos cinco, dez, quinze, trinta, quarenta e cinco e sessenta minutos após a sobrecarga de glicose. As amostras de sangue foram centrifugadas para determinação da glicemia e lactatemia. A análise das áreas sob a curva foi realizada no software Origin.

### Análise Estatística

A avaliação estatística foi feita através de Análise de Variância seguida do teste de Tukey. Em todos os cálculos foi fixado o nível crítico em p<0,05 (5%). Na comparação das curvas do teste de tolerância à glicose utilizamos o método proposto por Tai (1994).

### Resultados

A figura 1 mostra a ação da metformina sobre o conteúdo hepático de glicogênio em que se pode observar que a biguanida na concentração de 1,6 µg.ml<sup>-1</sup> promoveu elevação de 41% no conteúdo dos hepatócitos (2,07 ± 0,02 mg/100mg controle x 2,93 ± 0,01 mg/100mg tratado) enquanto na presença de 3,2 µg.ml<sup>-1</sup> o conteúdo de glicogênio foi elevado em 91% (2,07 ± 0,02 mg/100mg controle x 3,95 ± 0,01mg/100mg tratado, p<0,05).

Após observar modificação no conteúdo hepático de glicogênio, passamos a avaliar as reservas musculares de glicogênio. Pode-se observar nas figuras 2 e 3 que a metformina na concentração de 1,6 µg.ml<sup>-1</sup> não promoveu modificações nas reservas musculares de glicogênio, uma vez que, o grupo tratado não difere do controle. Por outro lado, a biguanida na concentração de 3,2 µg.ml<sup>-1</sup> promoveu uma significativa elevação nas reservas glicogênicas atingindo 78% no sóleo (0,20 ± 0,01 mg/100mg controle x 0,36 mg/100mg ± 0,03 tratado) e 83% no gastrocnêmio (0,35 ±

*Motriz, Rio Claro, v.10, n.2, p.73-78, mai./ago. 2004*

0,02 mg/100mg controle x  $0,64 \pm 0,04$  mg/100mg tratado). Estes resultados mostram que na concentração de  $3,2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a biguanida foi efetiva em estimular a síntese de glicogênio tanto nos músculos brancos quanto nos vermelhos.

Frente à observação de aumento no conteúdo tecidual de glicogênio na presença de microdoses de metformina questionou-se a existência de alterações na glicemia. Neste sentido, a figura 4 mostra que não houve hipoglicemia frente às concentrações estudadas. Outro efeito merecedor de destaque está vinculado à formação de ácido láctico, fato observado na presença de outras biguanidas, como por exemplo, a fenformina. Neste sentido, a figura 5 mostra que o tratamento não promoveu hiperlactatemia, reforçando a viabilidade do tratamento por não induzir acidose.

Uma vez observada a ação metabólica, avaliamos se haveria alterações na massa muscular, sendo escolhido para o estudo, o músculo sóleo. Na figura 6 pode-se observar que não houve mudanças no peso, descartando que a metformina possa ter desencadeado um possível efeito anabólico dentro do período observado.

Frente à ação das microdoses sobre o metabolismo tecidual realizamos um teste de tolerância à glicose nas mesmas condições experimentais. Na figura 7 pode-se observar que metformina na concentração  $1,6 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  não alterou a taxa de captação de glicose. No entanto, na concentração de  $3,2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  houve elevação de 18% na taxa de captação de glicose passando de  $22,231 \text{mg}/\text{dl}/70 \text{min}$  no grupo controle para  $18,142 \text{mg}/\text{dl}/70 \text{min}$  no grupo tratado. Estes resultados reforçam que metformina altera a constante de captação de glicose pelos tecidos periféricos, principais sítios de ação das biguanidas o que imprime a substância à característica anti-hiperglicemiante.

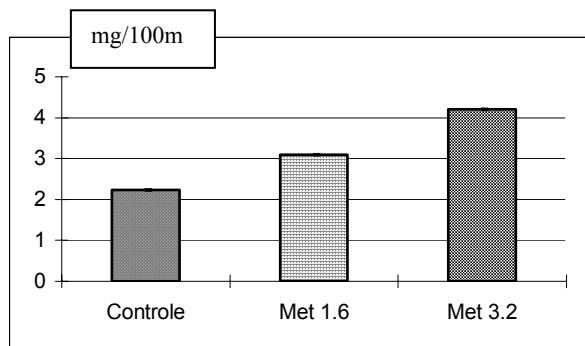


Figura 1. Concentração hepática de glicogênio (mg/100mg) de ratos controle e tratados com metformina  $1,6 \mu\text{g}/\text{ml}$  e  $3,2 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Os valores correspondem à média  $\pm$  epm,  $n=6$ ,  $*p<0,05$  comparado ao controle.

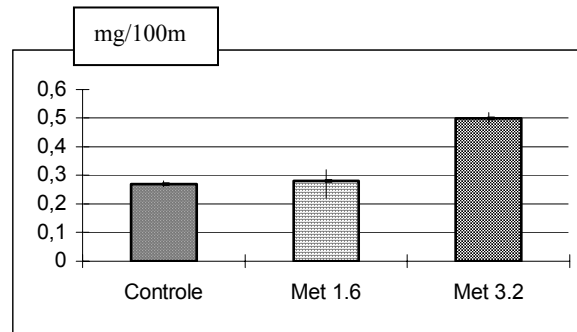


Figura 2. Concentração de glicogênio (mg/100mg) no músculo sóleo de ratos controle e tratados com metformina  $1,6 \mu\text{g}/\text{ml}$  e  $3,2 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Os valores correspondem à média  $\pm$  epm,  $n=6$ ,  $*p<0,05$  comparado ao controle.

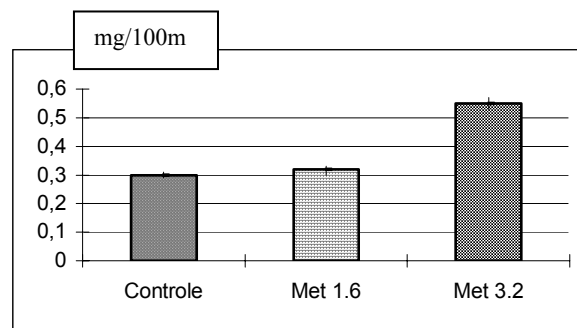


Figura 3. Concentração de glicogênio (mg/100mg) nos músculos gastrocnêmio de ratos controle e tratados com metformina  $1,6 \mu\text{g}/\text{ml}$  e  $3,2 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Os valores correspondem à média  $\pm$  epm,  $n=6$ ,  $*p<0,05$  comparado ao controle.

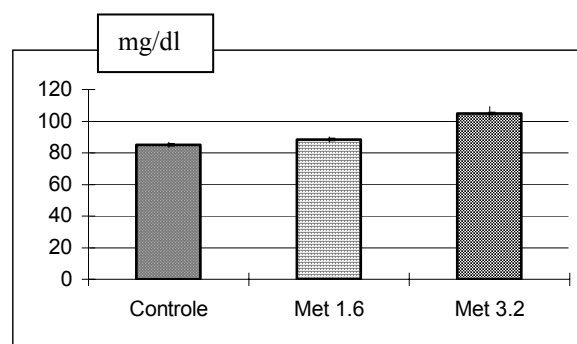


Figura 4. Concentração plasmática de glicose (mg/dl) de ratos controle e tratados com metformina  $1,6 \mu\text{g}/\text{ml}$  e  $3,2 \mu\text{g}/\text{ml}$ . Os valores correspondem à média  $\pm$  epm,  $n=6$ ,  $*p<0,05$  comparado ao controle.

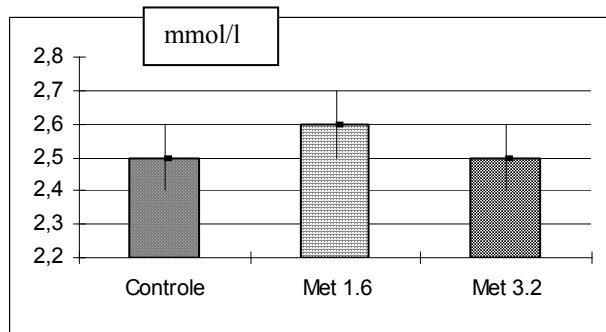


Figura 5. Concentração plasmática de lactato (mmol/l) de ratos controle e tratados com metformina 1,6  $\mu\text{g/ml}$  e 3,2  $\mu\text{g/ml}$ . Os valores correspondem à média  $\pm$  epm, n=6, \* p<0,05 comparado ao controle.

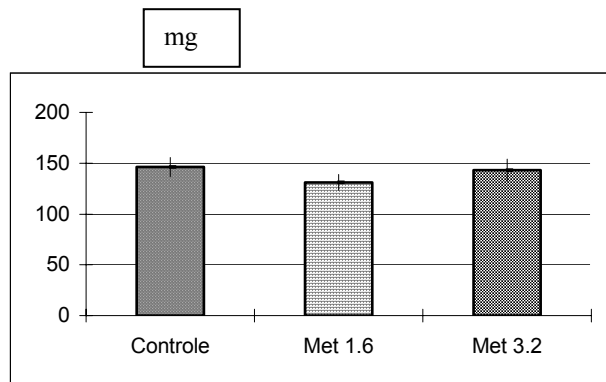


Figura 6. Peso tecidual (mg) do músculo sóleo normal ou tratados com metformina 1,6  $\mu\text{g/ml}$  e 3,2  $\mu\text{g/ml}$ . Os valores correspondem à média  $\pm$  epm, n=6, \*p<0,05 comparado ao controle.

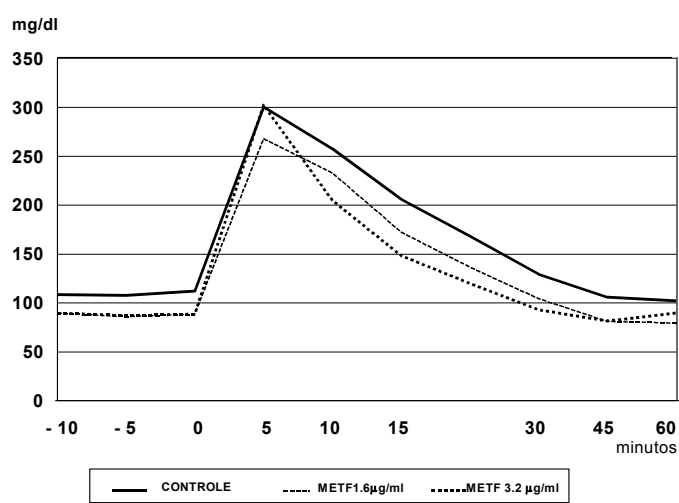


Figura 7. Teste de tolerância à glicose em ratos controle e tratados com metformina 1,6  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  e 3,2  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ . Os tempos -10 e -5 representam o período que antecedeu o início do experimento. Os valores correspondem às médias  $\pm$  epm, n= 6.

## Discussão

Diminuição da resistência à atividade física tem sido mostrada quando as reservas de glicogênio são depletadas, deflagrando o processo de fadiga (HERMANSEN et al., 1967; SNYDER, 1998).

Neste trabalho observamos que a biguanida mesmo quando administrada em microdoses elevou o conteúdo hepático de glicogênio e se fundamenta na capacidade que a biguanida tem em ativar as vias pós-receptor da insulina, elevação na afinidade da insulina ao receptor, elevação na captação de glicose e elevação na atividade da enzima glicogênio sintetase (FANTUS; BRUSSEAU, 1986; GOODYEAR et al., 1991; DEFRONZO, 1999; HUNDAL; INZUCCHI, 2003).

Observamos que a metformina na concentração de 1,6  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  não modificou o conteúdo muscular de glicogênio. No entanto, na concentração de 3,2  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  promoveu elevação nas reservas, sendo sugestiva a existência de uma correlação entre esta microdose administrada e sensibilidade de ativação das vias pós-receptor da insulina, melhorando o perfil energético da fibra (KARLSON; SALTIN, 1971; RAPIN et al., 1991).

Uma vez que há modificações no perfil metabólico, avaliamos modificações na massa tecidual do músculo sóleo e verificamos que não há efeito anabólico, possivelmente porque a ação da biguanida está vinculada às vias sinalizadoras da insulina que coordenam o metabolismo tecidual da glicose (WIERNSPERGER; BAILEY, 1999).

A utilização sistemática das biguanidas no tratamento de diabéticos tem merecido cuidados especiais, uma vez que já foi observada elevação nas concentrações plasmáticas de ácido láctico gerando efeitos colaterais nos pacientes (WIERNSPERGER; BAILEY, 1999; LALAU; RACE, 2000; SALPETER et al., 2003). Neste sentido, nosso trabalho mostra que não há hiperlactemia frente à administração de microdoses. Estas observações nos levam a descartar uma possível ação tóxica desencadeada pelo tratamento.

Como a principal ação anti-hiperglicemiante da metformina se fundamenta na elevação da captação periférica de glicose, realizamos um teste de tolerância à glicose (GTT) em ratos normais e em tratados com metformina (1,6 e 3,2  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ). A figura 7 mostra que o tratamento com metformina 3,2  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  induziu um aumento na velocidade de redução da glicemia, visto que a área sob a curva foi de 18.142 mg/dl/70 min, enquanto na condição controle a área foi de 22.231 mg/dl/70 min, sugerindo que a biguanida altera o

comportamento secretório das células  $\beta$  pancreáticas frente a uma sobrecarga de glicose e indiretamente pode modificar a captação tecidual da hexose (GUMA et al., 1995; LORD et al., 1985).

Quanto à modificação da resposta das células beta, observa-se que não há hipoglicemia, pois não existe diferença entre o grupo controle e o tratado. Possivelmente, a explicação seja o fato da ação da metformina ser diretamente proporcional à elevação da glicemia justificando sua eficácia no tratamento do diabetes mellitus.

### Conclusão

Sabendo-se que o desempenho de atletas tem relações diretas com o conteúdo de glicogênio, nosso estudo mostra que a administração de microdoses da biguanida foi efetiva em promover aumento no conteúdo tecidual de glicogênio sem promover efeito tóxico. No entanto, se fazem necessários maiores estudos para verificarmos há um efeito ergogênico ligado à metformina.

### Referências

- BELL, D. S. Type 2 diabetes mellitus: what is the optimal treatment regimen? **American Journal of Medicine**, San Francisco - USA, v.116, Suppl. 5A, p.23S-29S, 2004.
- DEFRONZO, R. A. Insulin resistance, Type 2 Diabetes and Metformin. **Drugs**, Stanford – USA, v.58, suppl. 1, p.U5-U6, 1999.
- FANTUS, G.; BRUSSEAU, K. Mechanism of action of metformin: insulin receptor and post-receptor effects *in vivo* and *in vitro*. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Washington, USA, v.63, n.4, p.898-905, 1986.
- GOODYEAR, L. J.; HIRSCHMAN, M. F.; SMITH, R. J.; HORTON, E. S. Glucose transporter number, activity, and isoform content in plasma membranes in red and white skeletal muscles. **American Journal of Physiology**, Bethesda, USA, v.261, n.5, p.E556-E561, 1991.
- GUMA, A.; ZIERATH, J. R.; WALLBERG-HENRIKSON, H.; KLIP, A. Insulin induces translocation of GLUT-4 glucose transporters in human skeletal muscle. **American Journal of Physiology**, Bethesda - USA, v.268, n.31, p.E613-E622, 1995.
- HARDIE, D. G. Mini review: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. **Endocrinology**, Chevy Chase – USA, v.144, n.12, p.5179-83, 2003.
- HENRY, R. R. Insulin resistance: from predisposing factor to therapeutic target in type 2 diabetes. **Clinical Therapeutics**, Hillsborough – USA, v.25, Suppl B, p.B47-63, 2003.
- HERMANSEN, L.; HULTMAN, E.; SALTIN, B. Muscle glycogen during prolonged severe exercise. **Acta Physiologica Scandinavica**, Stockholm, Sweden, v.71, n.2-3, p.129-139, 1967.
- HUNDAL, H. S.; RAMLAL, T.; REYES, R.; LEITER, L. A.; KLIP, A. Cellular mechanism of metformin action involves glucose transporter translocation from an intracellular pool to the plasma membrane in L6 muscle cells. **Endocrinology**, Chevy Chase – USA, v.131, p.1165-1173, 1992.
- HUNDAL, R. S.; INZUCCHI, S. E. Metformin: new understandings, new uses. **Drugs**, Stanford, USA, v.63, n.18, p.1879-94, 2003.
- KARLSONN, J.; SALTIN, B. Diet, Muscle glycogen and endurance performance. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, USA, v.31, n.2, p.203-206, 1971.
- LALAU, J. D.; RACE, J. M. Metformin and lactic acidosis in diabetic humans. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, Derby – UK, v.2, n.3, p.131-7, 2000.
- LAWRENCE, J. C.; ROACH, P. J. New insights into the role and mechanism of glycogen synthase activation by insulin. **Diabetes**, Washington, USA, v.46, n.4, p.541-547, 1997.
- LO, S.; RUSSELL, J. C.; TAYLOR, A. W. Determination of glycogen in small tissue samples. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, USA, v.28, n.2, p.234-236, 1970.
- LORD, J. M.; PUAH, J. A.; ATKINS, T. W.; BAILEY, C. J. Post-receptor effect of metformin on insulin action in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Baltimore, USA, v.37, n.11, p.821-823, 1985.
- MEUILLET, E.; WIERNSPERGER, N.; HUBERT, P. et al. Biguanide effects on insulin signaling. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, USA, v. 827, p.546-549, 1997.
- RAPIN, J. R.; LESPINASSE, C.; YOA, R.; WIERNSPERGER, N. Erythrocyte glucose consumption in insulin-dependent diabetes: Effect of metformin *in vitro*. **Diabetes & Metabolism**, Chantilly, France, v.17, n.1BIS, p.164-167, 1991.
- SALPETER, S. R., GREYBER, E., PASTERNAK, G. A., SALPETER, E. E. Risk of fatal and nonfatal lactic acidosis with metformin use in type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. **Archives of Internal Medicine**, Leicestershire – UK, v.163, n.21, p.2594-602, 2003.
- SILVA, C. A. **Participação dos eritrócitos na regulação da glicemia**. armazenamento e mobilização de glicogênio em eritrócitos de ratos normais e diabéticos e suas relações com o metabolismo de carboidratos no fígado. 180p., Tese Doutorado em Ciências Biológicas - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

SNYDER, A. C. Overtraining and glycogen depletion hypothesis. **Medicine and Science in Sports Exercise**, Philadelphia – USA, v.30, n.7, p.1146-1150, 1998.

SOARES, J. M. C.; DUARTE, J. A. R.; CARVALHO, J. The possible role of intracellular Ca<sup>2+</sup> accumulation for the development of immobilization atrophy. **International Journal of Sports Medicine**, Stuttgart, USA, v.14, n.8, p.437-439, 1993.

TAI, M. M. A mathematical model for the determination of total area under glucose tolerance and other metabolic curves. **Diabetes Care**, Heidelberg, Germany, v.17, n.2, p.152-154, 1994.

VAGUE, P. Is metformin more than an oral hypoglycaemic agent? **Diabetes & Metabolism**, Bethesda – USA, v.29, n.4 pt.2, Pt 2, p.6S5-7, 2003.

WIERNSPERGER, M. E.; DETAILLE, D.; DEVOS, P. Cellular and molecular mechanisms involved in insulin's potentiator glycogen synthase activity by metformin. **Biochemical Pharmacology**, Southampton- USA, v.58, n.9, p.1475-1486, 1999.

WIERNSPERGER, M. E.; BAILEY, J. C.. The antihyperglycaemic effect of metformin. **Drugs**, Stanford – USA, v.58, n.1, p.31-39, 1999.

WULFFELE, M. G.; KOOY, A.; ZEEUW, D.; STEHOUWER, C. D.; GANSEVOORT, R. T. Effect of metformin on blood pressure, plasma cholesterol and triglycerides in type 2 diabetes mellitus: a systematic. **Journal of Internal Medicine**, Stockholm – Sweden, v.256, n.1, p.1-14, 2004.

Agradecimento: UNIMEP, PIBIC/CNPq.

Endereço:

Carlos Alberto Silva  
UNIMEP Faculdade de Ciências da Saúde – PPG - FT  
Rodovia do Açúcar, Km 156 – Taquaral  
Piracicaba S.P  
13400-901  
e-mail: [casilva@unimep.br](mailto:casilva@unimep.br)

*Manuscrito recebido em 14 de janeiro de 2004.*

*Manuscrito aceito em 16 de setembro de 2004.*