



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Faculdade de Ciências Médicas

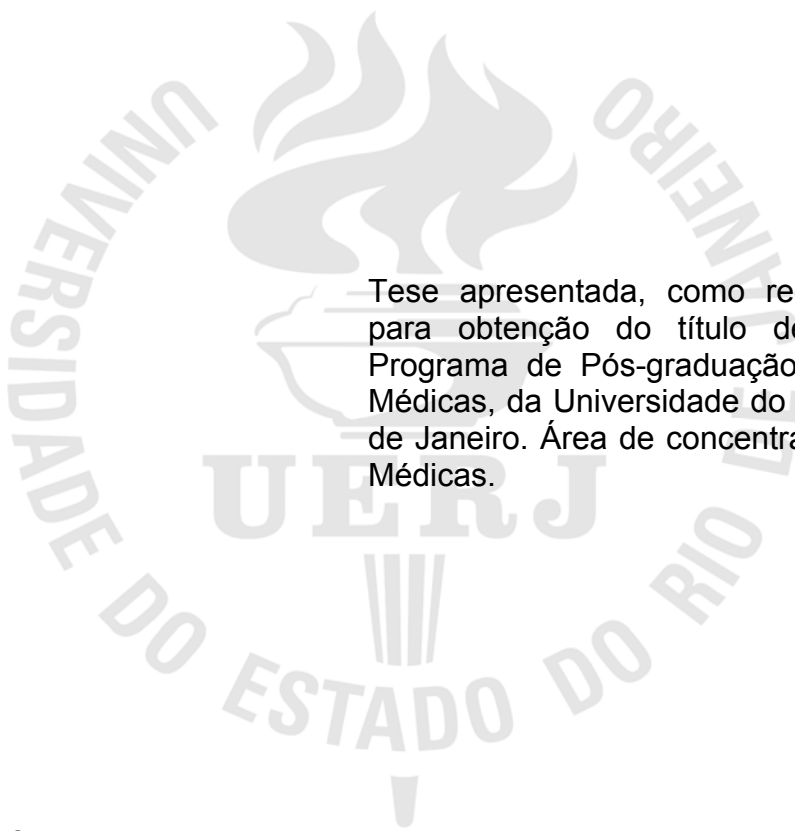
Adriana Burlá Klajman

**Efeito da metformina no remodelamento miocárdico e renal em  
ratos obesos com resistência à insulina**

Rio de Janeiro  
2011

Adriana Burlá Klajman

**Efeito da metformina no remodelamento miocárdico e renal em ratos obesos  
com resistência à insulina**



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Mario Fritsch Toros Neves

Rio de Janeiro  
2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

K63 Klajman, Adriana Burlá.

Efeito da metformina no remodelamento miocárdico e renal em ratos obesos com resistência à insulina / Adriana Burlá Klajman. 72 f. : il.

Orientador: Mario Fritsch Toros Neves.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. Metformina – Uso terapêutico. 2 Remodelação ventricular. 3. Resistência à insulina - Teses. 4. Fibrose endomiocárdica - Etiologia. 5. Obesidade – Fatores de risco. 6. Doenças cardiovasculares – Fatores de risco - Teses. 7. Nefropatias - Etiologia. I. Neves, Mario Fritsch Toros. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 615.747: 616-056.52

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Adriana Burlá Klajman

**Efeito da metformina no remodelamento miocárdico e renal em ratos obesos  
com resistência à insulina**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Ciências Médicas.

Aprovada em 03 de junho de 2011.

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Mario Fritsch Toros Neves (Orientador)  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof. Dr. Wille Oigman  
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

---

Prof. Dr. Antônio Felipe Sanjuliani  
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

---

Prof. Dr. Evandro Tinoco Mesquita  
Universidade Federal Fluminense

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Fernanda Medeiros  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2011

## DEDICATÓRIA

Aos meus amores, Charles, Daphne e Alan, que apesar das horas subtraídas de seu convívio, sempre me apoiaram.

Aos meus queridos pais, que estão sempre ao meu lado nos momentos decisivos da  
minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Prof. Dr. Mario Fritsch Toros Neves, da Disciplina de Clínica Médica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, pela sua extrema dedicação, sabedoria e paciência na orientação deste trabalho, sem a qual seria impossível o sucesso deste projeto.

Ao Prof. Dr. Wille Oigman, Professor Titular da Disciplina de Clínica Médica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, pela experiência transmitida, pelo incentivo e pela sua importante participação neste trabalho.

A Pr<sup>fa</sup> Zuleica Bruno Fortes Titular de Farmacologia da Universidade de São Paulo Pela experiência transmitida e pela sua participação fundamental neste trabalho.

A colega Núbia Lobato, por compartilhar seus animais e pela sua ajuda inestimável.

A Dr<sup>a</sup> Fernanda Medeiros pela amizade incondicional, apoio inestimável em todos os momentos.

Aos amigos e amigas da pós graduação, pertencentes à minha turma pela experiência compartilhada e pela amizade fortalecida durante nosso convívio.

A todos os colegas do da secretaria de clinica medica pelo auxílio em diversos momentos deste projeto e pelo companherismo.

Uma mente que tenha sido estirada por novas idéias nunca poderá recobrar sua forma original.

*Albert Einstein*

## RESUMO

KLAJMAN, Adriana Burlá. *Efeito da metformina no remodelamento miocárdico e renal em ratos obesos com resistência à insulina*. 2011. 72 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

Diversas evidências comprovam que a obesidade está associada a alterações estruturais e funcionais do coração em modelos humanos e animais. Outros estudos recentes também demonstram que a obesidade humana está associada com alterações na função e na estrutura vascular, especialmente em grandes e médias artérias. Estudos epidemiológicos têm confirmado que a obesidade é um fator de risco significativo para o aparecimento de proteinúria e de doença renal terminal em uma população normal. Com o objetivo de determinar as alterações morfológicas relacionadas ao remodelamento cardíaco, vascular e renal em um modelo experimental de obesidade induzida pelo glutamato monossódico (MSG) e os efeitos da metformina sobre estes achados, foram estudados 25 ratos divididos em cinco grupos: controle com 16 e 22 semanas (CON-16 e CON-22); obeso com 16 e 22 semanas (MSG-16 e MSG-22) e obeso + metformina (MET-22) 300mg/Kg/dia por via oral. A caracterização da resistência à insulina foi feita através da medida da insulina plasmática e cálculo do índice de HOMA-IR. As análises morfológicas e quantificação do colágeno miocárdico foram feitos pelo sistema de imagem Image Pro Plus analysis. A pressão arterial sistólica foi levemente maior no grupo MSG-22, adquirindo significância estatística quando comparada com o grupo MSG-16 ( $122 \pm 2$  vs  $108 \pm 2$  mmHg,  $p < 0,05$ ). Por outro lado, o grupo MET-22 mostrou níveis mais baixos de pressão arterial ( $118 \pm 1$  mmHg), sem alcançar diferença significativa. No grupo de animais obesos, foi observado aumento na relação média-lumen com 16 semanas ( $39,9 \pm 3,7$  vs  $30,2 \pm 2,0$  %,  $p < 0,05$ ) e com 22 semanas ( $39,8 \pm 1,3$  vs  $29,5 \pm 1,2$ %,  $p < 0,05$ ), que foi reduzida com o uso da metformina ( $31,5 \pm 0,9$ %). O depósito de colágeno na área perivascular no ventrículo esquerdo foi significativamente maior no grupo MSG-22 ( $1,39 \pm 0,06$  vs  $0,83 \pm 0,06$  % no CON-22,  $p < 0,01$ ), sendo atenuado pela metformina ( $1,02 \pm 0,04$ %). No rim, a área seccional transversa das arteríolas intrarrenais foi semelhante entre os grupos ( $18,5 \pm 2,2$  no CON-16;  $19,9 \pm 3,7$  no MSG-16;  $18,9 \pm 3,1$  no CON-22;  $21,8 \pm 1,5$  no MSG-22;  $20,2 \pm 1,4$  no MET-22). Foi observado aumento da área glomerular no grupo MSG-22 ( $141,3 \pm 4,5$  vs  $129,5 \pm 0,5$   $\mu\text{m}^2$ ), mas sem significância estatística. Em conclusão, nos ratos com obesidade induzida pelo MSG, com resistência à insulina, as alterações cardíacas foram mais proeminentes do que as alterações renais. No coração foram observados sinais de remodelamento vascular hipertrófico nas pequenas artérias intramiocárdicas e evidências de fibrose miocárdica mais proeminente na área perivascular, alterações que foram, pelo menos parcialmente, atenuadas com o uso de metformina durante seis semanas, mostrando que esta droga pode ser benéfica na prevenção de complicações cardíacas, vasculares e renais associadas com a obesidade.

Palavras-chave: Fibrose cardíaca. Resistência à insulina. Metformina. Obesidade. Doença renal. Remodelamento vascular.



## ABSTRACT

Many evidences show that obesity is associated to structural and functional changes in the heart of human and animal models. Recent studies also show that human obesity is associated with vascular structural and functional modifications, specially at large and medium-sized arteries. Epidemiological studies have confirmed that obesity is a significant risk factor for the development of proteinuria and end-stage renal disease in a normal population. With the objective to determinate morphological changes related to cardiac, vascular and renal remodeling in an experimental model of monosodium glutamate (MSG)-induced obesity and the effect of metformin at this finding. Twenty five rats were studied and divided into five groups: control with 16 e 22 weeks (CON-16 and CON-22); obese with 16 and 22 weeks (MSG-16 e MSG-22), and obese + metformin (MET-22) 300mg/Kg/day per oral. The characterization of insulin resistance was done through measurement of plasma insulin and calculation of HOMA-IR index. The morphological analysis and the quantification of myocardial collagen were carried out by Image Pro Plus analysis system. The systolic blood pressure was slightly higher in MSG-22 group, reaching statistical significance when compared to MSG-16 group ( $122\pm 2$  vs  $108\pm 2$  mmHg,  $p<0.05$ ). On the other hand, the MET-22 group demonstrated lower blood pressure levels ( $118\pm 1$  mmHg), without reaching statistical difference. The obese animals presented increase in media-to-lumen ratio with 16 weeks ( $39.9\pm 3.7$  vs  $30.2\pm 2.0$  %,  $p<0.05$ ) and with 22 weeks ( $39.8\pm 1.3$  vs  $29.5\pm 1.2$ %,  $p<0.05$ ), which was reduced with use of metformin ( $31.5\pm 0.9$ %). The collagen deposition in perivascular area of left ventricle was significantly greater in MSG-22 group ( $1.39\pm 0.06$  vs  $0.83\pm 0.06$  % in CON-22,  $p<0.01$ ), and attenuated by metformin ( $1.02\pm 0.04$ %). In the kidney, the media cross-sectional area of intrarenal arterioles was similar among the groups ( $18.5\pm 2.2$  in CON-16;  $19.9\pm 3.7$  in MSG-16;  $18.9\pm 3.1$  in CON-22;  $21.8\pm 1.5$  in MSG-22;  $20.2\pm 1.4$  in MET-22). An increase of glomerular area was observed in MSG-22 group ( $141.3\pm 4.5$  vs  $129.5\pm 0.5$   $\mu\text{m}^2$ ), but without statistical significance. In conclusion, rats with MSG-induced obesity and insulin resistance presented more pronounced cardiac changes than renal alterations. In the heart, there were evidences of hypertrophic vascular remodeling were observed in intramyocardial small arteries and perivascular fibrosis. These findings were, at least partially, attenuated by metformin for six weeks, suggesting that this drug may be beneficial for prevention of cardiac, vascular and renal complications associated with obesity.

Keywords: Cardiac fibrosis. Insulin resistance. Metformin. Obesity. Renal disease. Vascular remodeling.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Pressão arterial (PA) sistólica nos grupos obesos $\pm$ metformina e respectivos controles .....	26
Figura 2 –	Representação gráfica da média $\pm$ EPM da glicose plasmática nos grupos controles, obesos e com metformina .....	27
Figura 3 –	Representação gráfica da média $\pm$ EPM dos níveis de insulina plasmática nos grupos controles, obesos e com metformina .....	27
Figura 4 –	Representação gráfica da média $\pm$ EPM do índice HOMA-IR nos grupos controles, obesos e com metformina .....	28
Figura 5 –	Fotomicrografias de miocárdio de ratos controles (CON-16, CON-22), de ratos com obesidade induzida por glutamato monossódico (MSG-16, MSG-22) e de rato obeso tratado com metformina (MET-22) mostrando morfologia de pequenas artérias intramiocárdicas e fibrose perivascular. Coloração <i>Picro-sirius red</i> , objetiva 40x .....	29
Figura 6 –	Fotomicrografias de áreas subendocárdicas do miocárdio de ratos controles (CON-16, CON-22), de ratos com obesidade induzida por glutamato monossódico (MSG-16, MSG-22) e de rato obeso tratado com metformina (MET-22). Coloração <i>Picro-sirius red</i> , objetiva 40x .	31
Figura 7 –	Fotomicrografias do córtex renal de ratos controles (CON-16, CON-22), obesos (MSG-16, MSG-22) e tratado com metformina (MET-22). Coloração <i>Picro-sirius red</i> , objetiva 40x .....	33

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Caracterização da obesidade e morfologia das artérias intramiocárdicas nos grupos estudados.....	26
Tabela 2 –	Percentual de depósito de colágeno em diferentes áreas do miocárdio.....	30
Tabela 3 –	Morfologia de arteríolas intrarrenais e área glomerular.....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADOPT	<i>A Diabetes Outcome Progression Trial</i>
AMPK	Proteína quinase ativada por adenosina monofostafo
AST	Área seccional transversa
COX-2	Ciclooxigenase-2
DCV	Doenças cardiovasculares
DRC	Doença renal crônica
EPM	Erro padrão médio
GH	Hormônio do crescimento
HE	Hematoxilina-eosina
HOMA-IR	Homeostatic model assessment of insulin resistance
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de massa corporal
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MSG	Glutamato monossódico
NHANES	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
OLETF	Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty
PA	Pressão arterial
PPAR	Receptores proliferadores de peroxissoma-ativado
TGF	Fator transformador de crescimento
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alfa

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>1</b>	<b>DADOS DA LITERATURA</b> .....	13
1.1	<b>Epidemia da obesidade</b> .....	13
1.2	<b>Coração e vasos na obesidade</b> .....	14
1.3	<b>Obesidade e rim</b> .....	15
1.4	<b>Resistência periférica à insulina</b> .....	16
1.5	<b>O modelo de obesidade induzida por glutamato monossódico</b> .....	17
1.6	<b>Ações da metformina</b> .....	18
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	19
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	19
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	45
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	20
3.1	<b>Animais do estudo</b> .....	20
3.2	<b>Caracterização da obesidade</b> .....	20
3.2.1	<u>Evolução ponderal</u> .....	20
3.2.2	<u>Determinação do índice de Lee</u> .....	21
3.2.3	<u>Determinação do peso de gordura</u> .....	21
3.3	<b>Caracterização da resistência à insulina</b> .....	21
3.3.1	<u>Determinação da glicemia</u> .....	21
3.3.2	<u>Medida da insulina plasmática e cálculo do índice HOMA-IR</u> .....	22
<b>3.4</b>	<b>Protocolo experimental</b> .....	22
<b>3.5</b>	<b>Análise da estrutura do coração e vasos</b> .....	23
3.5.1	<u>Análise morfológica de pequenas artérias intramiocárdicas</u> .....	23
3.5.2	<u>Quantificação de colágeno no coração</u> .....	24
<b>3.6</b>	<b>Análise da morfologia renal</b> .....	24
3.7	<b>Análise estatística</b> .....	24
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	25
<b>4.1</b>	<b>Obesidade, pressão arterial e resistência à insulina</b> .....	25
<b>4.2</b>	<b>Estrutura dos vasos intramiocárdicos</b> .....	28
<b>4.3</b>	<b>Depósito de colágeno no coração</b> .....	30
<b>4.4</b>	<b>Morfologia dos glomérulos e das arteríolas intrarrenais</b> .....	32

5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	34
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	42
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	43
	<b>APÊNDICE</b> - Artigo submetido ao International Journal of Cardiology .....	52
	<b>ANEXO</b> – Certificados de trabalhos apresentados em congressos .....	70

## INTRODUÇÃO

### 1. DADOS DA LITERATURA

#### 1.1 Epidemia da obesidade

A epidemia de obesidade se tornou um grande problema de saúde pública, particularmente devido à sua associação com várias comorbidades, tais como doenças cardiovasculares e diabetes. Embora esta associação seja muito bem conhecida, em grande parte os mecanismos fisiopatológicos subjacentes não estão esclarecidos. Além disso, os fatores envolvidos na progressão da obesidade não complicada para obesidade associada a co-morbidades ainda devem ser elucidados.

O sobrepeso e a obesidade estão entre os fatores mais significativos para promoção de doenças em geral, provocando ou agravando diversas patologias, tanto de forma independente como em associação com outras co-morbidades (KOPELMAN, 2000).

Nas últimas duas décadas, alterações no modelo de fatores de risco para doenças cardiovasculares (DCV) têm sido evidentes na América do Norte e na Europa. Apesar de diversos investimentos terem sido feitos para redução do colesterol sérico (KIM *et al.*, 2006) e no controle da pressão arterial (ONG *et al.*, 2007), as prevalências de obesidade, síndrome metabólica e diabetes continuam a aumentar (FORD *et al.*, 2004; NARAYAN *et al.*, 2006). Em análises feitas pelo *US National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), a prevalência da obesidade na população americana, ajustada pela idade, aumentou de 55,9% em 1994 para 64,5% em 2000 e para 66,3% em 2004 (KANT & GRAUBARD, 2007).

O estudo Nurses' Health Study acompanhou prospectivamente mais de 100000 mulheres por 14 anos e mostrou que a taxa de mortalidade de mulheres com o índice de massa corporal (IMC) maior que 32 kg/m<sup>2</sup> foi mais do que o dobro da de mulheres com IMC menor que 19 kg/m<sup>2</sup> (MANSON *et al.*, 1995). Em outra análise deste mesmo estudo, mostrou-se que o risco de diabetes mellitus tipo 2 foi de 40, 54 e 93 para mulheres com IMC de 31,0 a 32,9 kg/m<sup>2</sup>, de 33,0 a 34,9 kg/m<sup>2</sup>, e

de 35,0 kg/m<sup>2</sup> ou mais, respectivamente, comparando com as mulheres com menos de 22 kg/m<sup>2</sup> de IMC. O estudo Health Professionals Follow-up Study, que acompanhou mais de 29.000 profissionais da área de saúde por 3 anos, concluiu que os indivíduos com IMC entre 25,0 e 28,9 kg/m<sup>2</sup> tinham 50% mais risco de doença cardiovascular, quando comparados com os de menos que 23 kg/m<sup>2</sup>. Além disso, os profissionais com IMC acima de 29 kg/m<sup>2</sup> tinham até o dobro de risco cardiovascular (SETTY *et al.*, 2007).

## 1.2 Coração e vasos na obesidade

Diversas evidências comprovam que a obesidade está associada a alterações estruturais e funcionais do coração em modelos humanos e animais (AVELAR *et al.*, 2007). Muitas dessas mudanças, tais como hipertrofia de ventrículo esquerdo, alargamento atrial esquerdo e disfunção subclínica da função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo são consideradas precursoras para formas mais evidentes de disfunção cardíaca e insuficiência cardíaca (MORRICONE *et al.*, 2002). Assim, assume-se que a obesidade de longa data acabará por levar à insuficiência cardíaca. No entanto, os estudos ainda não são conclusivos sobre o papel direto da obesidade no desenvolvimento de insuficiência cardíaca (HE *et al.*, 2001; WILHELMSEN *et al.*, 2001).

Outros estudos recentes também demonstram que a obesidade humana está associada com alterações na função e na estrutura vascular, especialmente em grandes e médias artérias (GRASSI *et al.*, 2010). Frequentemente, alterações nas estruturas das artérias subcutâneas de resistência, indicadas pelo aumento da relação média-lumem, são encontradas em pacientes hipertensos e/ou diabéticos. Estas alterações precoces podem representar um importante fator prognóstico para o aumento do risco da doença cardiovascular (DE CIUCEIS *et al.*, 2007).

Trabalhos experimentais foram realizados em humanos e em animais, demonstrando que o ganho de peso leva à expansão do volume extracelular, ao aumento do débito cardíaco e no fluxo sanguíneo para o tecido adiposo, assim como para o tecido não adiposo (OREN *et al.*, 1996).



Desde 1987, em estudos experimentais de aterogênese, o dano endotelial é o evento inicial. Um marcador precoce da disfunção é a redução da vasodilatação endotélio-dependente pela diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico (PALMER *et al.*, 1987). Diversos mecanismos relacionam a função endotelial com a resistência à insulina. Na verdade, há várias décadas já havia a hipótese de que a endoteliopatia precedia o diabetes mellitus tipo 2 (TOOKE & GOH, 1998).

### 1.3 Obesidade e rim

Diabetes e hipertensão arterial são as duas causas mais comuns de doença renal crônica (DRC), e não é surpreendente que o excesso de peso também esteja presente na DRC e no estágio final da doença renal. Vários estudos epidemiológicos têm confirmado que a obesidade é um fator de risco significativo para o aparecimento de proteinúria e de doença renal terminal em uma população normal (PRAGA & MORALES, 2006). Hsu e colaboradores mostraram, em um estudo de 25 anos de seguimento, que um maior IMC é reconhecido como um fator de risco independente para o desenvolvimento da fase final de doença renal (HSU *et al.*, 2009). Também parece haver uma forte correlação com hipertensão na evolução para insuficiência renal crônica (FOSTER *et al.*, 2008). Tendo em vista o rápido aumento da prevalência da obesidade em todo o mundo, diversos estudos longitudinais têm demonstrado que o risco de estágio final de doença renal associada à obesidade é semelhante ao risco associado à hipertensão ou diabetes (DOLL *et al.*, 2002; FOX *et al.*, 2004; DROYVOLD *et al.*, 2005; GELBER *et al.*, 2005; KRAMER *et al.*, 2005).

Tipicamente, glomerulopatia relacionada à obesidade se apresenta morfológicamente como glomeruloesclerose segmentar e focal. Porém, recentemente foi relatado um aumento dramático na incidência de glomerulopatia associada à obesidade com ou sem glomeruloesclerose (KAMBHAM *et al.*, 2001).

Estudos em ratos obesos do tipo Zucker (PARK & KANG, 1995) mostraram que a obesidade está associada ao aumento da taxa de filtração glomerular, ao aumento do fluxo plasmático renal efetivo e a alterações na estrutura glomerular, como por exemplo, expansão da matriz mesangial, que pode ser considerado como

um marcador precoce da disfunção renal. Entretanto, alteração hemodinâmica não é um pré-requisito para o desenvolvimento do dano renal (O'DONNELL *et al.*, 1985).

#### 1.4 Resistência periférica à insulina

Na obesidade, a principal alteração metabólica é caracterizada por elevados níveis de insulina plasmática em jejum e por uma resposta insulínica exagerada ao aporte de uma carga oral de glicose. Além disso, já está estabelecida uma correlação positiva entre medidas de resistência à insulina e obesidade central, que provoca liberação de insulina pós-hepática e, por conseguinte, aumento da concentração periférica da insulina, caracterizando a resistência periférica à insulina. (GRUNDY *et al.*, 2004).

A resistência à insulina é desenvolvida a partir da combinação entre suscetibilidade genética, efeitos ambientais e estilo de vida. Por exemplo, a sensibilidade à insulina pode ser reduzida como resultado de alterações em qualquer um dos genes que codifica a proteína da via de sinalização da insulina e/ou fatores que levam a níveis elevados de fatores que interferem com os componentes de sinalização da insulina (LEBOVITZ, 2001).

Como a gordura é um meio extremamente eficaz de armazenar energia, os seres humanos desenvolveram mecanismos que promovem o armazenamento de gordura durante períodos em que o alimento é abundante, e estimula a lipólise durante os períodos de escassez de alimentos. O equilíbrio entre esses processos está sujeito a mecanismos complexos de regulação. Estes incluem controle hormonal, como insulina e catecolaminas, assim como os receptores proliferadores de peroxissoma-ativado (PPAR) que também desempenham um papel central. Dos PPARs, que são ativadas por ácidos graxos, PPAR-gama controla o armazenamento de ácidos graxos no tecido adiposo e promove a diferenciação de adipócitos, enquanto PPAR-alfa está envolvido na regulação da oxidação de ácidos graxos nos tecidos como fígado, músculo, rim e coração (BARBIER *et al.*, 2002). Esta maximização da eficiência metabólica, conhecida como a hipótese "genótipo econômico", representa uma vantagem de sobrevivência nas sociedades onde a fome é regular e freqüente. Porém, na sociedade moderna

este genótipo está associado à obesidade e à resistência à insulina (LEV-RAN, 2001).

### **1.5 O modelo de obesidade induzida por glutamato monossódico**

Vários modelos animais já foram estudados na tentativa de esclarecer os mecanismos que contribuem para a lesão e disfunção cardíaca na obesidade. Ao avaliar os resultados dos estudos, é importante ter-se em mente que de forma semelhante à situação em seres humanos, a obesidade em modelos animais está associada com determinadas morbidades coincidentes tais como a tolerância reduzida à glicose, diabetes mellitus e hipertensão arterial.

A administração neonatal de glutamato monossódico (MSG) em roedores destrói 80 a 90% dos neurônios do núcleo arqueado, provocando também outras lesões estruturais ao nível do sistema nervoso central, resultando em várias anormalidades neuroendócrinas e metabólicas (DOLNIKOFF *et al.*, 2001). Quando adultos, esses animais desenvolvem uma síndrome de obesidade caracterizada pelo depósito de gordura em excesso e redução da massa magra, na ausência de hiperfagia (DAWSON *et al.*, 1989). Além disso, ocorre uma diminuição da função da taxa metabólica (POON & CAMERON, 1978), diminuição plasmática do hormônio do crescimento (GH) e do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (insulin-like growth factor-1 ou IGF-1) que contribuem para a redução da massa magra (KUBOTA *et al.*, 1994; PINTEROVA *et al.*, 2001). Adicionalmente, há diminuição da atividade lipolítica do tecido adiposo (DOLNIKOFF *et al.*, 2001), e um aumento na taxa de lipogênese no fígado e nos adipócitos já foi demonstrado no modelo de obesidade induzida por MSG (MACHO *et al.*, 2000). Hiperinsulinemia (SARTIN *et al.*, 1985), resistência à insulina (NOGUEIRA *et al.*, 1994), hipertrofia de adipócitos (OCHI *et al.*, 1991; FICKOVA *et al.*, 1997), assim como hiperleptinemia também já foram previamente descritas neste modelo (MORRIS *et al.*, 1998).

## 1.6 Ações da metformina

A metformina tem sido usada no tratamento do diabetes mellitus tipo 2 por mais de 40 anos. Ela melhora a hiperglicemia sem estimular a secreção de insulina (WIERNSPERGER, 1999). Também provoca a diminuição da produção de glicose hepática e aumenta a captação de glicose pelas células (HUNDAL *et al.*, 2000). Apesar de ter sido criada inicialmente para fins terapêuticos, a metformina tem o potencial de reduzir o risco de desenvolver diabetes tipo 2, assim como a doença cardiovascular em indivíduos não diabéticos portadores de resistência à insulina. O potencial de impacto deste tratamento, no nível de saúde pública, pode alcançar grandes proporções, pois é estimado que 25% da população não diabética é resistente à insulina (BROWN, 2005). Estudos clínicos e experimentais necessitam esclarecer e documentar os benefícios do tratamento com drogas sensibilizadoras de insulina em pacientes não diabéticos.

O endotélio é fundamental para o controle da função vascular, agindo na regulação do tônus vascular, da permeabilidade de leucócitos e macromoléculas, do equilíbrio entre a coagulação e a fibrinólise, da composição da matriz subendotelial, e da proliferação de células do músculo liso vascular. Sartoretto e colaboradores mostraram que o tratamento com metformina, em ratos portadores de diabetes *mellitus* induzido pela estreptozotocina, restaurou a resposta venosa e arterial mesentérica aos vasodilatadores endotélio-dependentes, mediados ou não pelo estímulo inflamatório. E concluíram que o aumento da atividade do óxido nítrico, sem alteração de sua expressão, pode contribuir para a melhora da atividade microvascular nestes animais (SARTORETTO *et al.*, 2005). Em humanos, recentemente foi demonstrado que a metformina é capaz de melhorar a reatividade vascular dependente do endotélio em parentes de primeiro grau de pacientes diabéticos tipo 2 que apresentavam critérios para síndrome metabólica e tolerância normal à glicose (DE AGUIAR *et al.*, 2006).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Determinar as alterações morfológicas relacionadas ao remodelamento cardíaco, vascular e renal em um modelo experimental de obesidade induzida pelo glutamato monossódico e os efeitos da metformina sobre estes achados.

### **2.2 Objetivos específicos**

Avaliar se a obesidade induzida pelo glutamato monossódico em ratos determina:

- Resistência à insulina e alterações na pressão arterial sistólica
- Remodelamento vascular nas artérias intramiocárdicas
- Aumento do depósito de colágeno no miocárdio
- Hipertrofia vascular nas arteríolas intrarrenais
- Alterações morfológicas glomerulares

Caracterizar os efeitos da metformina sobre as alterações morfológicas cardíacas, vasculares e renais determinadas pela obesidade induzida por glutamato monossódico.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Animais do estudo**

Foram estudados 25 ratos Wistar machos. Os animais iniciaram o estudo com dois dias de vida e foram mantidos em caixas individuais de prolipropileno no biotério da Universidade de São Paulo, com temperatura e umidade controladas ( $21\pm 2$  °C,  $60\pm 10$  %, respectivamente), submetidos a ciclo invertido claro/escuro de 12 horas (luzes artificiais, 19:00-07:00h) e exaustão 15 minutos/hora. Os ratos foram alimentados com ração balanceada (Purina®) padrão para roedores (REEVES *et al.*, 1993) e receberam água filtrada *ad libitum*.

Os protocolos de manuseio e experimentação foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade de São Paulo. Durante o período, os animais foram diariamente manipulados para que se habituassem ao processo de aferição da pressão arterial, que foi verificada semanalmente por todo período do experimento, usando o método consensual de pletismografia da artéria da cauda.

#### **3.2 Caracterização da obesidade**

##### **3.2.1 Evolução ponderal**

Os ratos foram pesados semanalmente desde a primeira semana após a injeção de MSG até o dia do experimento para a avaliação de sua evolução ponderal. Os valores foram expressos em gramas.

### 3.2.2 Determinação do índice de Lee

Para verificar se o tratamento com glutamato monossódico induziu obesidade, antes de serem sacrificados os ratos foram pesados e o comprimento naso-anal foi determinado para o cálculo do Índice de Lee, obtido pela fórmula: peso corporal (g) / comprimento naso-anal (cm).

### 3.2.3 Determinação do peso de gordura

Após o sacrifício dos ratos, tecidos de gordura retroperitoneal foram retirados para determinação dos pesos absoluto (g) e relativo (g/100g peso corporal).

## 3.3 **Caracterização da resistência à insulina**

### 3.3.1 Determinação da glicemia

A glicemia foi determinada pelo método enzimático da glicose-oxidase (Labtest<sup>®</sup>), utilizando-se alíquotas de 20 µl de soro. Neste método, a glicose-oxidase catalisa a oxidação da glicose produzindo o peróxido de hidrogênio. Este, através de uma reação oxidativa catalisada pela peroxidase, reage com a 4-aminoantipirina e fenol produzindo a antipirilquinonimina vermelha, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de glicose na amostra. Os resultados foram expressos em mg/dl.

### 3.3.2 Medida da insulina plasmática e cálculo do índice HOMA-IR

A dosagem de insulina plasmática foi realizada pelo método de radioimunoensaio (Rat insulin RIA Kit, Linco, USA). Para avaliação laboratorial da resistência à insulina, foi utilizado o índice HOMA-IR (Homeostatic model assessment of insulin resistance), calculado pela fórmula:

$$\text{HOMA-IR} = (\text{glicemia (em mmol/l)} \times \text{insulinemia (em } \mu\text{U/l)}) / 22,5$$

O índice HOMA-IR, além da facilidade do método, é considerado um bom marcador da sensibilidade periférica dos tecidos à ação da insulina (HAFNER, 1996).

## 3.4 Protocolo experimental

Os grupos foram estabelecidos e tratados conforme o protocolo de tratamento do estudo descrito a seguir. Vinte e cinco ratos tipo Wistar foram divididos em cinco grupos, conforme descrição abaixo:

- Grupo CON-16: animais de controle, sem obesidade, sacrificados com 16 semanas de vida.
- Grupo MSG-16: animais sacrificados com 16 semanas de vida que receberam glutamato monossódico com 2, 5, e 7 dias de vida na dose de 100mg/Kg/dia por via intradérmica.
- Grupo CON-22: animais de controle, sem obesidade, sacrificados com 22 semanas de vida.
- Grupo MSG-22: animais sacrificados com 22 semanas de vida que receberam glutamato monossódico com 2, 5, e 7 dias de vida na dose de 100mg/Kg/dia por via intradérmica.
- Grupo MSG-MET-22: animais sacrificados com 22 semanas de vida que receberam glutamato monossódico com 2, 5, e 7 dias de vida na dose de



100mg/Kg/dia por via intradérmica, e metformina na dose de 300mg/Kg/dia por via oral nas últimas 6 semanas, ou seja, a partir da 16ª semana.

### 3.5 Análise da estrutura do coração e vasos

Após o sacrifício, o coração foi removido e fragmentos do ventrículo esquerdo foram removidos, imersos em solução fixadora (formaldeído 4% em 0,1M de solução tampão de fosfato com pH 7,2) por 48 horas em temperatura ambiente (CARSON *et al.*, 1973) e depois incluídos em Paraplast Plus® (Sigma, St. Louis, EUA). O material foi seccionado em cortes com 5µm de espessura e processados para estudo em microscopia de luz. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e Picro Sirius (PROPHET *et al.*, 1994).

#### 3.5.1 Análise morfológica de pequenas artérias intramiocárdicas

O diâmetro do lúmen e a espessura da túnica média das artérias intramiocárdicas que apareceram circulares no campo foram medidas pelo sistema de imagem Image Pro Plus analysis software versão 5.01 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA) em um microscópio Olympus com câmera digital LC Evolution. A área seccional transversa (AST) foi calculada pela fórmula:  $AST = (\pi/4) \times (De^2 - Di^2)$ , onde De e Di foram os diâmetros externo e do lúmen, respectivamente. A AST da túnica média foi obtida pela subtração da AST interna da AST externa. O índice de crescimento foi calculado como  $(AST_o - AST_c)/AST_c$ , onde  $AST_c$  e  $AST_o$  são a média das áreas seccionais transversas dos vasos dos controles e obesos (MSG ± metformina), respectivamente.

### 3.5.2 Quantificação de colágeno no coração

Blocos de tecido cardíaco foram desparafinados com etanol e corados com Picro-Sirius. O colágeno perivascular foi normalizado dividindo a área seccional transversa das arteríolas intramiocárdicas ocupadas pelo colágeno pela área do lúmen do vaso. Somente vasos intramiocárdicos com aparência circular na microscopia foram analisados. A densidade do colágeno intersticial foi avaliada em duas regiões do ventrículo esquerdo, incluindo o miocárdio subepicárdico no terço externo e o miocárdio subendocárdico no terço interno. Aproximadamente dez campos em cada região foram selecionados aleatoriamente para análise com o sistema de imagem Image Pro Plus Analysis versão 5.01 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA), utilizando uma objetiva 20x.

### 3.6 Análise da morfologia renal

Após o sacrifício, o rim direito foi removido e imerso por 48 horas em solução fixadora (formaldeído 4% em 0,1M de solução tampão de fosfato com pH 7,2), depois embebido em Paraplast plus (Sigma, St. Louis, EUA), seccionado em cortes de 5 $\mu$ m de espessura, e corado com *Picro-sirius*. A área dos glomérulos, o diâmetro do lúmen e a espessura das arteríolas no córtex renal que apareceram circulares no campo foram medidos pelo sistema de imagem Image Pro Plus Analysis software versão 5.01 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA) em um microscópio Olympus com LC Evolution digital câmera.

### 3.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Os valores foram comparados pelo one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Valor de  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises

estatísticas foram feitas usando o programa Prism for Windows, versão 5.0 (GraphPad Software, Inc.)

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Obesidade, pressão arterial e resistência à insulina**

O índice de Lee foi estatisticamente maior nos grupos obesos (MSG ± metformina) que também apresentaram maiores valores de tecido adiposo branco retroperitoneal, quando comparados com os respectivos grupos controle (Tabela 1). Não houve diferença significativa na pressão arterial sistólica, quando comparamos os grupos obesos com os respectivos controles. Entretanto, foi observado um aumento significativo da pressão arterial sistólica no grupo MSG-22 quando comparado ao grupo MSG-16 ( $122 \pm 2$  vs  $108 \pm 2$  mmHg,  $p < 0,05$ ). Por outro lado, o grupo MET-22 mostrou níveis mais baixos de pressão arterial ( $118 \pm 1$  mmHg), sem alcançar diferença significativa (Figure 1). Na semana 16, apesar dos níveis normais de glicose plasmática (Figura 2), a resistência à insulina foi confirmada nos animais que receberam MSG com a elevação da insulina plasmática (Figura 3) e do índice de HOMA-IR (Figura 4). O grupo tratado com metformina apresentou redução dos níveis plasmáticos de insulina, mostrando melhora nos testes de resistência à insulina na vigésima segunda semana (Figuras 3 e 4).

Tabela 1. Caracterização da obesidade e morfologia das artérias intramiocárdicas nos grupos estudados.

	CON-16	MSG-16	CONT-22	MSG-22	MET-22
Índice de Lee, %	29,0 ± 0,2	30,4 ± 0,2 <sup>***</sup>	29,5 ± 0,1	31,2 ± 0,2 <sup>***</sup>	30,2 ± 0,1 <sup>##</sup>
Tecido adiposo retroperitoneal, g/100g	0,97 ± 0,07	2,81 ± 0,11 <sup>*</sup>	1,13 ± 0,21	2,62 ± 0,43	2,24 ± 0,23
<u>Morfologia de artérias intramiocárdicas</u>					
Diâmetro da luz, µm	32,3 ± 1,7	34,2 ± 3,3	35,9 ± 2,3	34,7 ± 2,4	33,9 ± 1,3
Espessura da média, µm	12,6 ± 0,6	14,9 ± 0,9	10,9 ± 0,4	14,5 ± 0,6 <sup>*</sup>	11,5 ± 1,0
Relação média/luz, %	30,2 ± 2,0	39,9 ± 3,7 <sup>*</sup>	29,5 ± 1,2	39,8 ± 1,3 <sup>*</sup>	31,5 ± 0,9
AST da média, x10 <sup>3</sup> µm <sup>2</sup>	12,5 ± 0,5	14,9 ± 0,9	10,9 ± 0,4	14,5 ± 0,6 <sup>*</sup>	11,5 ± 1,0
Índice de crescimento, %	NA	19,2	NA	33,0	5,5

Resultados expressos em média ± EPM. AST, area seccional transversa. <sup>\*</sup>  $p < 0,05$ , <sup>\*\*</sup>  $p < 0,01$  e <sup>\*\*\*</sup>  $p < 0,001$  vs respectivos grupos controles; <sup>##</sup>  $p < 0,01$  vs MSG-22.

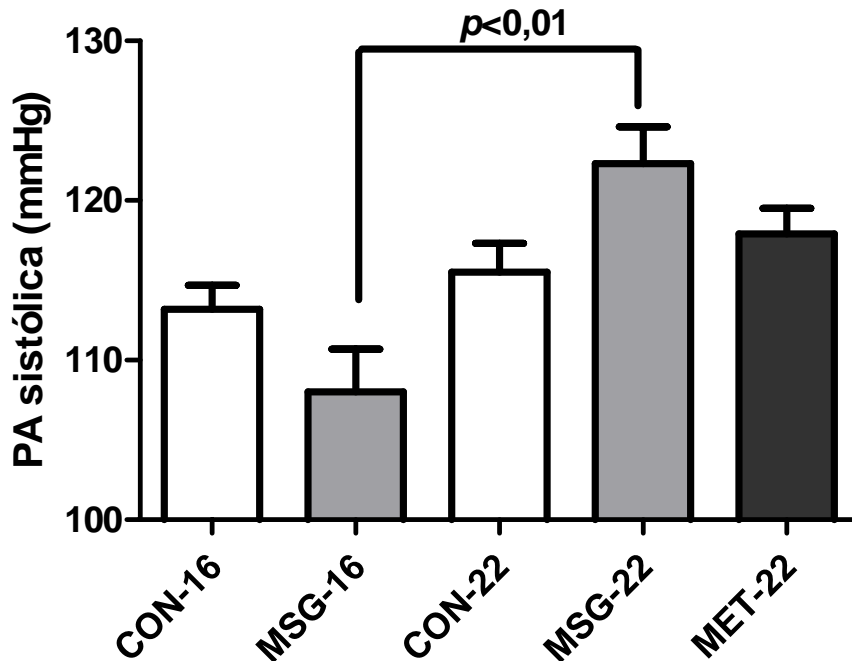


Figura 1. Pressão arterial (PA) sistólica nos grupos obesos ± metformina e respectivos controles.

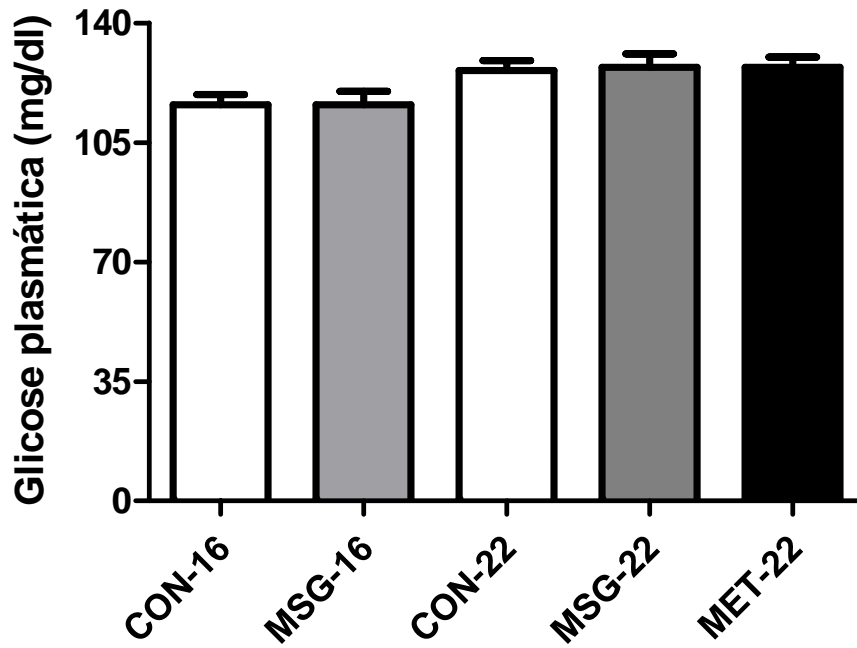


Figura 2. Representação gráfica da média  $\pm$  EPM da glicose plasmática nos grupos controles, obesos e com metformina.

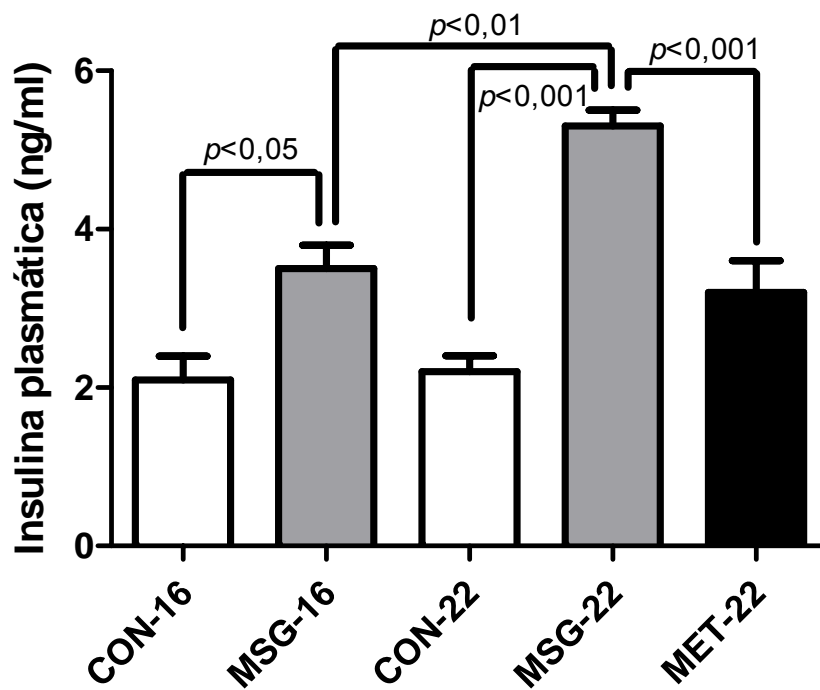


Figura 3. Representação gráfica da média  $\pm$  EPM dos níveis de insulina plasmática nos grupos controles, obesos e com metformina.

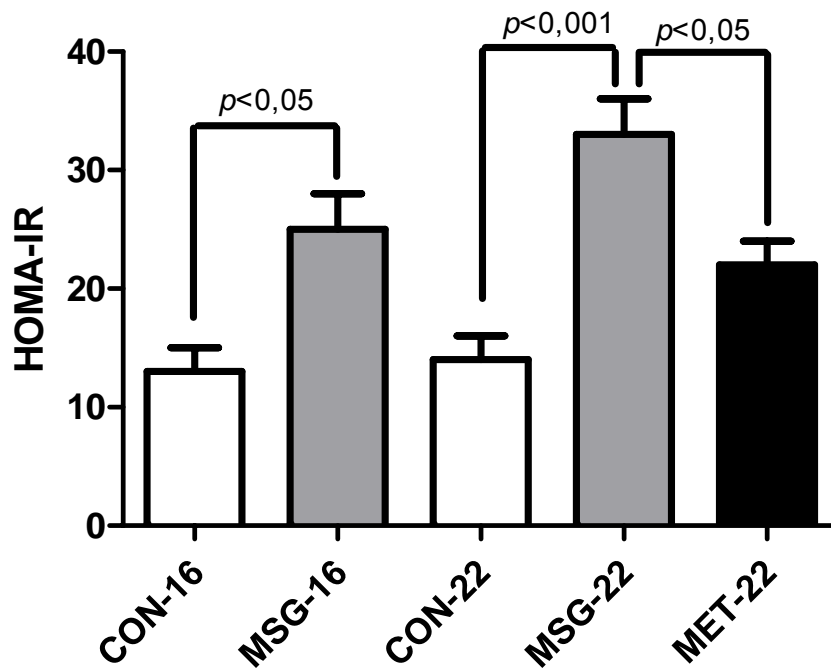


Figura 4. Representação gráfica da média  $\pm$  EPM do índice HOMA-IR nos grupos controles, obesos e com metformina.

#### 4.2 Estrutura dos vasos intramiocárdicos

A análise morfológica mostrou diâmetros semelhantes nas pequenas artérias intramiocárdicas em todos os grupos. A espessura da túnica média foi maior nos grupos obesos, com redução pelo tratamento com metformina. No grupo de animais obesos, foi observado aumento na relação média-lumen, que foi reduzida com o uso da metformina.

A área seccional transversa também encontrava-se aumentada nos animais que receberam MSG, comparando com os grupos controles, resultando em um elevado índice de crescimento, sugerindo a presença do remodelamento vascular hipertrófico nestes animais (Tabela 1, Figura 5).

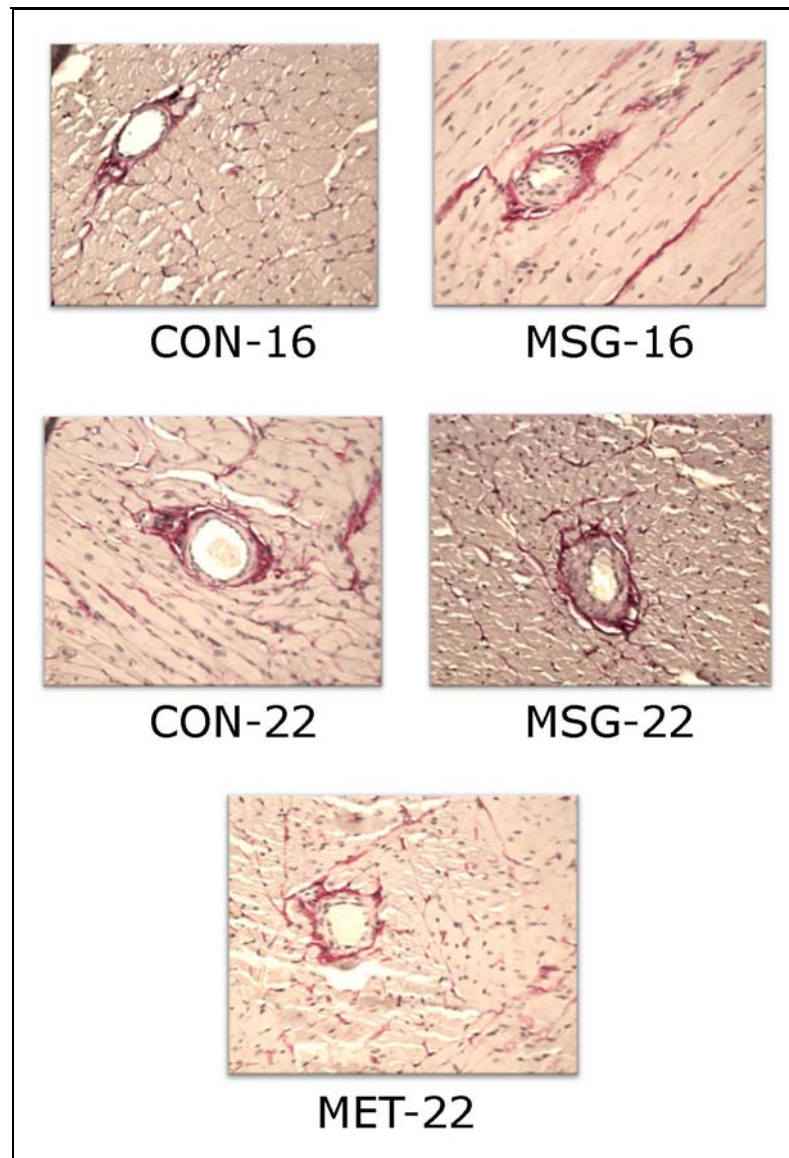


Figura 5. Fotomicrografias de miocárdio de ratos controles (CON-16, CON-22), de ratos com obesidade induzida por glutamato monossódico (MSG-16, MSG-22) e de rato obeso tratado com metformina (MET-22) mostrando morfologia de pequenas artérias intramiocárdicas e fibrose perivascular. Coloração *Picro-sirius red*, objetiva 40x.

### 4.3 Depósito de colágeno no coração

O depósito de colágeno nas áreas perivasculares no ventrículo esquerdo foi significativamente maior nos grupos obesos, sendo atenuado pela metformina. A deposição de colágeno no miocárdio subendocárdico e no miocárdio subepicárdico também foi maior nos grupos tratados com MSG, porém sem diferença estatisticamente significativa. (Tabela 2, Figuras 5 e 6).

Tabela 2. Percentual de depósito de colágeno em diferentes áreas do miocárdio.

Área do miocárdio	CON-16	MSG-16	CONT-22	MSG-22	MET-22
Área subendocárdica, %	2,1±0,8	4,1±0,3	4,0±0,3	4,8±0,8	3,0±0,1
Área subepicárdica, %	2,2±0,3	3,1±0,2	2,5±0,4	4,4±0,5	4,1±0,5
Área perivascular, %	0,80±0,05	1,19±0,19	0,83±0,06	1,39±0,06**	1,02±0,04

Resultados expressos em média ± EPM. \*\*  $p < 0,01$  vs CON-22.



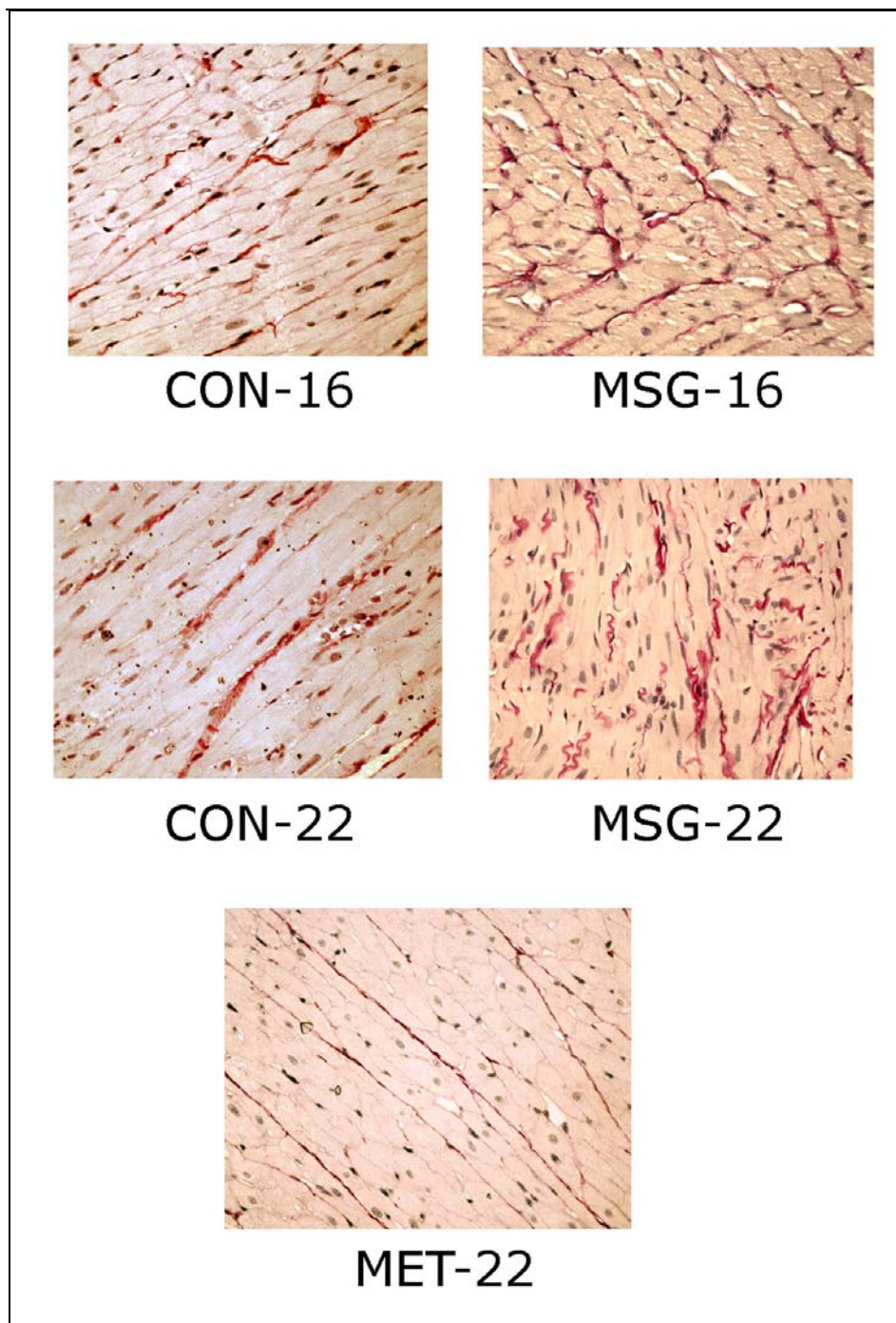


Figura 6. Fotomicrografias de áreas subendocárdicas do miocárdio de ratos controles (CON-16, CON-22), de ratos com obesidade induzida por glutamato monossódico (MSG-16, MSG-22) e de rato obeso tratado com metformina (MET-22). Coloração *Picro-sirius red*, objetiva 40x.

#### 4.4 Morfologia dos glomérulos e das arteríolas intrarrenais

Os ratos tratados com MSG apresentaram alterações no córtex renal, como o aumento da área glomerular e remodelamento vascular (Figura 7). Assim como no estudo do tecido miocárdico, as arteríolas intrarrenais dos animais obesos apresentaram aumento na relação média-lumen, quando comparado com os controles. Todavia, o grupo tratado com metformina demonstrou redução relativa na relação média-lumen, mas sem alcançar significância estatística (Tabela 3).

Tabela 3. Morfologia de arteríolas intrarrenais e área glomerular.

	CON-16	MSG-16	CONT-22	MSG-22	MET-22
Espessura da média, $\mu\text{m}$	18,9 $\pm$ 1,5	20,4 $\pm$ 2,5	19,5 $\pm$ 3,2	21,0 $\pm$ 2,1	20,8 $\pm$ 1,3
Diâmetro da luz, $\mu\text{m}$	39,7 $\pm$ 3,2	40,6 $\pm$ 3,4	40,2 $\pm$ 1,4	38,2 $\pm$ 2,7	40,4 $\pm$ 3,1
Relação média/luz, %	47,6 $\pm$ 1,8	50,2 $\pm$ 2,1	49,8 $\pm$ 0,6	54,5 $\pm$ 0,8	51,3 $\pm$ 2,5
AST da média, $\times 10^3 \mu\text{m}^2$	18,5 $\pm$ 2,2	19,9 $\pm$ 3,7	18,9 $\pm$ 3,1	21,8 $\pm$ 1,5	20,2 $\pm$ 1,4
Índice de crescimento, %	NA	7,57	NA	15,34	6,88
Área glomerular, $\mu\text{m}^2$	128,2 $\pm$ 8,6	130,1 $\pm$ 3,8	129 $\pm$ 0,5	141 $\pm$ 4,5	132 $\pm$ 5,5

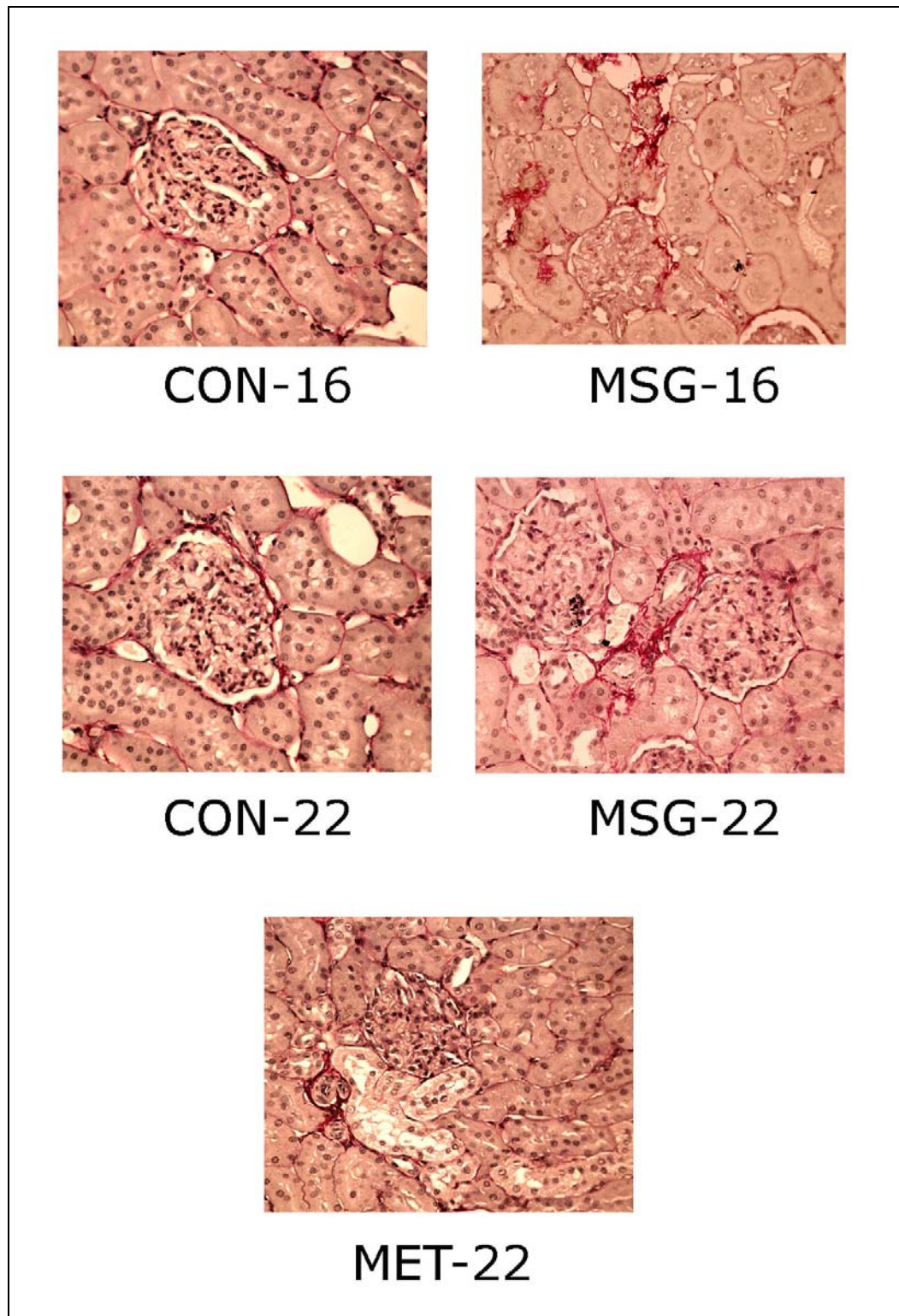


Figura 7. Fotomicrografias do córtex renal de ratos controles (CON-16, CON-22), obesos (MSG-16, MSG-22) e tratado com metformina (MET-22). Coloração *Picro-sirius red*, objetiva 40x.

## 5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi possível demonstrar remodelamento vascular hipertrófico de pequenas artérias intramiocárdicas e fibrose cardíaca em animais com obesidade induzida por MSG. Nos rins, o remodelamento das arteríolas intrarrenais foi menos intenso. Além disso, o uso de metformina durante seis semanas determinou melhora da sensibilidade à insulina nesses animais e atenuou as alterações vasculares e cardíacas, sugerindo que a metformina pode ser útil na prevenção de lesões cardiovasculares associada à obesidade.

A resistência à insulina foi reconhecida como um importante fator no desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Ratos tratados com MSG no período neonatal são modelo de obesidade, caracterizado por resistência à insulina e, dependendo da idade, também por hipertensão (MACHO *et al.*, 2000). Neste estudo, não houve diferença significativa na pressão arterial sistólica destes animais obesos em comparação aos controles correspondentes. No entanto, o aumento da sistólica em ratos mais velhos tratados com MSG, em comparação com animais mais jovens, confirma que a obesidade pode não provocar alterações precoces na, mas pode provocar hipertensão depois de um curto período de tempo. Níveis plasmáticos mais altos de corticosterona podem contribuir para o aumento da pressão arterial neste modelo (TOKUYAMA & HIMMS-HAGEN, 1989). Além disso, um recente estudo demonstrou uma associação entre altos níveis de pressão arterial e produtos da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) em ratos tratados com MSG, indicando um possível papel para prostaglandinas na interação da hipertensão com processos inflamatórios na obesidade induzida por MSG (CUNHA *et al.*, 2010).

Recentemente, casos de obesidade humana acentuada foram associados com mudanças na estrutura e na função de pequenas artérias. Independentemente da presença de hipertensão e diabetes, pacientes obesos mostraram ter aumento na razão média/lúmen e maiores valores de área seccional transversa em arteríolas subcutâneas (GRASSI *et al.*, 2010). Estes dados indicam que a obesidade está associada com alterações em vasculares estruturais, caracterizado principalmente por remodelação vascular hipertrófico. Em concordância com este achado, o presente estudo evidencia aumento na área seccional transversa de arteríolas intramiocárdicas nos grupos de ratos obesos, resultando em um elevado de índice

de crescimento que indica um remodelamento vascular hipertrófico no coração desses animais. O mecanismo que a obesidade, resistência à insulina e/ou hiperinsulinemia determinam a doença vascular ainda não está esclarecido. O remodelamento hipertrófico observado neste estudo pode ser atribuído a efeitos proliferativos provocados pela insulina em células musculares lisas vasculares (SCHERRER & SARTORI, 1997; GUSTAFSON *et al.*, 2007). O excesso de liberação de norepinefrina associado com a obesidade visceral pode também promover hipertrofia vascular (ALVAREZ *et al.*, 2002; GRASSI *et al.*, 2004). Além disso, um estado crônico de inflamação leve no tecido adiposo provoca efeitos inibitórios sobre a sensibilidade à insulina no fígado e nos tecidos periféricos. E ainda, a liberação aumentada de citocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo poderia determinar inflamação na parede vascular e respostas hipertróficas (ANDERSSON *et al.*, 2008). O tecido adiposo visceral pode produzir inúmeras citocinas, como a MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) e a interleucina-6 (IL-6) que foram correlacionados com a espessura da gordura epicárdica, e talvez possam contribuir com a disfunção diastólica em pacientes obesos (IACOBELLIS *et al.*, 2007; MALAVAZOS; CORSI *et al.*, 2007; MALAVAZOS; ERMETICI *et al.*, 2007).

No estudo atual, o remodelamento vascular foi investigado em ratos jovens. Essa estratégia permitiu a avaliação de doença vascular precoce associada com a obesidade. De fato, obesidade em adolescentes e adultos jovens já foram associadas a lesões ateroscleróticas precoces (MCGILL *et al.*, 2002). Além disso, estudos de longo prazo têm confirmado que a obesidade em jovens pode ser preditor de morbidade e mortalidade cardiovascular (MUST *et al.*, 1992; GUNNELL *et al.*, 1998). Muitos autores afirmam que a hiperinsulinemia, como um mecanismo compensatório da resistência à insulina, é um fator determinante para um risco cardiovascular elevado. Todavia, as evidências desta relação têm se mostrado inconsistentes (DESPRES *et al.*, 1996; RUIGE *et al.*, 1998). Na verdade, mais do que as concentrações de insulina, o índice HOMA-IR e outros índices de resistência à insulina têm sido mais associados com eventos cardiovasculares (SMILEY *et al.*, 2001).

O aumento do depósito de colágeno na área perivascular do ventrículo esquerdo nos animais que receberam MSG neste estudo indica processos iniciais de fibrose cardíaca induzida por obesidade e/ou resistência à insulina. De acordo com este achado, fibrose intersticial foi observada no coração de diferentes modelos de

animais obesos, como ratos Zucker e camundongos transgênicos (CITTADINI *et al.*, 1999; TOBLLI *et al.*, 2005). Em camundongos ob/ob, a fibrose foi observada principalmente na região perivascular, como evidenciamos em nossos ratos obesos. Os mecanismos não são conhecidos, mas a resposta fibrótica pode ser em parte devida à ativação local do sistema renina-angiotensina, sendo que o tratamento de animais com inibidores da enzima de conversão da angiotensina II resulta em regressão da fibrose (ZAMAN *et al.*, 2001; ZAMAN *et al.*, 2004).

Fibrose de reposição pode seguir a apoptose dos miócitos, mas um estudo recente, em que foi usado um modelo de rato com obesidade e resistência à insulina induzida por uma dieta rica em gordura, não detectou diferenças significativas na apoptose apesar da disfunção do cardiomiócito (RELLING *et al.*, 2006). Finalmente, a regulação da matriz extracelular do miocárdio por adipocinas pode exercer um papel na obesidade (ABEL *et al.*, 2008). Marcadores séricos de *turnover* de colágeno cardíaco têm se mostrado elevados em indivíduos obesos, e a atividade exacerbada da enzima metaloproteinase-9 no ventrículo esquerdo parece ser um desencadeador precoce de remodelamento cardíaco adverso (MOSHAL *et al.*, 2005; QUILLIOT *et al.*, 2005). Além disso, a sinalização da leptina pode também contribuir para regulação da matriz extracelular cardíaca na obesidade, considerando que a leptina foi capaz de aumentar o pró-colágeno tipo III e IV, embora sem modificar a síntese de colágeno total (MADANI *et al.*, 2006).

A obesidade está frequentemente associada a outros fatores de risco que levam à disfunção cardíaca e renal, como por exemplo, hipertensão, diabetes, hiperlipidemia, entre outros. Somente em grandes estudos longitudinais é que se pode observar dados mais precisos (KENCHALAH *et al.*, 2002). Participantes do *Framingham Heart Study* foram estratificados a partir do índice de massa no momento da inscrição e observados para incidência de insuficiência cardíaca diagnosticada clinicamente. A evidência principal foi que houve maior risco de eventos em todas as categorias relacionado com o aumento do índice de massa corporal. No subgrupo de pacientes que realizaram ecocardiograma em 30 dias do diagnóstico de insuficiência cardíaca, a maior parte apresentou diminuição da fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Embora os investigadores tenham ajustado este estudo para a presença de outros fatores de risco cardiovascular, é reconhecido que os fatores de risco tradicionais explicam apenas uma fração dos casos de infarto do miocárdio que ocorrem atualmente na população em geral (SCHERBAUM, 2003).

Muitos estudos publicados concluíram que a obesidade é associada de forma independente à hipertrofia de ventrículo esquerdo (ALPMAN *et al.*, 1995; BERKALP *et al.*, 1995; DE SIMONE *et al.*, 1996; CRISOSTOMO *et al.*, 1999; GRANDI *et al.*, 2000; MORRICONE *et al.*, 2002; POIRIER *et al.*, 2006; AVELAR *et al.*, 2007). Pessoas obesas apresentam aumento da rigidez arterial e deficiência da função endotelial de artérias de grande e médio calibre. Grassi e colaboradores mostraram que a obesidade humana grave está associada a profundas alterações estruturais e funcionais de pequenas artérias, que podem ser responsáveis pelo elevado risco cardiovascular e pelo aumento da incidência de eventos coronários, vasculocerebrais e renais relatados na obesidade (GRASSI *et al.*, 2010).

Apesar de diversas evidências clínicas e estruturais dos fatores deletérios da obesidade no nível cardíaco e renal, a patogênese desta doença ainda não está completamente definida. Neste trabalho, foi notada uma evidência maior dos danos arteriais e no miocárdio. Entretanto, o número de estudos relacionando obesidade e doença renal vem se tornando mais freqüente (KATO *et al.*, 2009).

A obesidade visceral e a resistência insulínica são dois fatores importantes para explicar a lesão renal na síndrome metabólica. Perda de peso, exercício regular e dieta de baixa caloria e baixo teor de gordura são a primeira abordagem para a síndrome metabólica, porém até agora existem poucos dados que mostrem o impacto destas medidas para reversão da lesão renal. De maneira semelhante, poucos estudos mostram o efeito benéfico ou não do uso de estatinas, fibratos ou metformina no controle da pressão arterial em pacientes com síndrome metabólica (AGRAWAL *et al.*, 2009).

Estudos clínicos realizados visando examinar o efeito da resistência à insulina sobre a reatividade vascular em humanos obesos com e sem diabetes melito demonstraram uma redução de 40 a 50% da vasodilatação dependente de endotélio quando comparada com o grupo controle sob condições basais. Além disso, a capacidade da insulina aumentar a vasodilatação dependente de endotélio, por modulação na produção ou liberação de óxido nítrico, é notadamente prejudicada nestes indivíduos. Estas observações sugeriram a idéia de que a obesidade está associada com disfunção endotelial, estando esta possivelmente relacionada com a resistência à insulina (STEINBERG *et al.*, 1996). Estudo publicado com o mesmo modelo de resistência a insulina utilizado no presente trabalho, ou seja, em ratos

com obesidade induzida por glutamato monossódico, mostrou a melhora da reatividade vascular com o uso da metformina por duas semanas (FONSECA *et al.*).

O achado mais marcante no presente estudo foi a observação do efeito benéfico da metformina em reduzir o remodelamento vascular e atenuar a deposição acentuada de colágeno perivascular. De fato, sensibilizadores de insulina têm demonstrado capacidade de reverter a resistência à insulina no miocárdio e, por conseguinte, reduzir a injúria miocárdica (SIDELL *et al.*, 2002; YUE *et al.*, 2005). O efeito cardioprotetor da metformina tem sido atribuído à redução da síntese de colágeno por fibroblastos cardíacos através da inibição do fator transformador de crescimento (TGF)-beta(1) e redução dos níveis circulantes e miocárdicos do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) (WANG *et al.*, 2010; XIAO *et al.*, 2010). Recentemente foi relatada uma melhora de estrutura e função cardíacas provocada pela metformina que foi associada ao aumento da produção de óxido nítrico e inibição da síntese de proteínas induzida pela angiotensina II nos cardiomiócitos (ZHANG *et al.*).

Efeitos anti-inflamatórios poderiam também ser provocados por sensibilizadores de insulina, apesar de nenhuma evidência comprovada. Reduções das citocinas pró-inflamatórias e das moléculas de adesão dos monócitos podem beneficiar a função endotelial na macro e na microcirculação (MATSUMOTO *et al.*, 2008). No estudo *A Diabetes Outcome Progression Trial* (ADOPT), a metformina foi capaz de reduzir os níveis de proteína C-reativa, porém este efeito foi associado a mudanças no peso (KAHN *et al.*, 2010). Em estudos randomizados controlados, a metformina parece ser moderadamente efetiva em reduzir o índice de massa corporal e a resistência à insulina em crianças e adolescentes obesos não diabéticos com hiperinsulinemia em um curto prazo (PARK *et al.*, 2009; WIEGAND *et al.*, 2010). Independentemente da melhora nas anormalidades metabólicas, um efeito direto da metformina na função vascular tem sido proposta por alguns autores (VERMA *et al.*, 1996; KATAKAM *et al.*, 2000). Por outro lado, recentemente foi relatado que a metformina não tem nenhum efeito inibidor sobre a proliferação de células musculares lisas vasculares avaliada pela incorporação de timidina e contagem de células (LITTLE *et al.*, 2007). Níveis plasmáticos de glicose foram similares em todos os grupos avaliados no presente trabalho. Este achado corrobora um aparente efeito vasoprotetor da metformina independente de sua eficácia na redução de glicose no sangue.



O estudo *The Diabetes Prevention Program* (THE DIABETES PREVENTION PROGRAM., 1999; KNOWLER *et al.*, 2002), feito com 3234 pacientes, proporcionou uma oportunidade única para a avaliação da metformina. Foram envolvidos mais de 3000 participantes com intolerância à glicose, cuidadosamente seguidos e colocados de forma randomizada em uma mudança intensa no estilo de vida, associada ao uso da metformina ou placebo. Este trabalho pontuou duas questões principais: a prevalência da síndrome metabólica na linha de base da população do ensaio e se alguma das intervenções reduziu a incidência de novos casos de síndrome metabólica, comparando com o uso do placebo (ADLER & TURNER, 1999). Após três anos de acompanhamento, observou-se que mudanças radicais na alimentação e no estilo de vida produziram os efeitos mais marcantes, com uma redução de 58% no desenvolvimento de diabetes tipo 2. Por outro lado, os pacientes que não conseguiram mudar seus hábitos foram beneficiados pelo efeito da metformina, reduzindo o risco em 31%, em comparação aos que fizeram uso de placebo, que obtiveram a redução de 11% (ADLER & TURNER, 1999).

O efeito mediador da metformina, que espelha o padrão de resultados para o ensaio geral de diabetes em termos de prevenção ou atraso no surgimento, ressalta ainda mais o valor preferencial de estilo de vida como abordagem inicial para a prevenção da síndrome metabólica e suas complicações cardiovasculares. Muitos autores indicam a hiperinsulinemia como um fator compensatório da elevação da resistência à insulina e como o fator responsável pelo aumento do risco cardiovascular. Todavia, ainda não existem provas consistentes desta alegação (DESPRES *et al.*, 1996). Neste estudo, optou-se por usar um modelo obeso com resistência à insulina, a fim de avaliar o surgimento de alterações morfológicas nos vasos, que aumentam o risco cardiovascular, independentemente do surgimento de diabetes melito tipo 2. Esta proposta foi baseada em vários trabalhos que demonstraram que o aumento nos níveis de insulina provocam um efeito pró-hipertrófico nas células musculares lisas dos vasos assim como a alteração na função endotelial (STEINBERG *et al.*, 1996; GUSTAFSON *et al.*, 2007).

Existe uma forte correlação entre marcadores de disfunção endotelial, inflamação crônica leve da parede vascular e o risco de doença aterotrombótica (STEHOUWER *et al.*, 2002). Em pacientes com diabetes melito tipo 2, o uso de metformina por um curto espaço de tempo provocou a melhora dos marcadores de disfunção inflamatória, que são altamente relacionados a alterações do controle

glicêmico (DE JAGER *et al.*, 2005). Tanto nos estados de resistência insulínica como em pacientes diabéticos, a metformina tem efeito vasoprotetor (HSUEH & QUINONES, 2003). Considerando que a disfunção vascular é a primeira manifestação do processo aterotrombótico, talvez a intervenção precoce com metformina seja importante para diminuir o risco do desenvolvimento de diabetes melito tipo 2 e de complicações cardiovasculares.

Freemark e colaboradores mostraram que a terapêutica com metformina por seis meses provocou uma pequena, porém estatisticamente significativa, diminuição do índice de massa corporal em adolescentes sem restrição calórica, quando comparados com pacientes tratados com placebo. A redução dos níveis de leptina sérica nos pacientes do sexo feminino que usaram metformina sugere que a diminuição do índice de massa corporal está associado à diminuição de massa gorda (FREEMARK & BURSEY, 2001).

Matsumoto e colaboradores mostraram a melhora da função endotelial e da atividade vasomotora em ratos tipo OLETF que receberam tratamento crônico ou agudo com metformina, sugerindo que há supressão da produção de vasoconstritores prostanóides, um efeito pelo menos parcialmente mediado via proteína quinase ativada por adenosina monofostafafo (AMPK) (MATSUMOTO *et al.*, 2008). O presente estudo mostrou a melhora no remodelamento adverso das arteríolas do miocárdio após o tratamento com metformina. Embora a avaliação do mecanismo não tenha sido alvo deste trabalho, o efeito benéfico da metformina pode estar relacionada à melhora da função endotelial através de vários fatores, entre eles a ativação da AMPK.

Neste experimento, ficou evidente a disparidade da resposta morfológica dos vasos miocárdios e dos vasos renais ao tratamento com metformina. Observou-se que, apesar de uma tendência para um remodelamento vascular hipertrófico nos animais obesos, não houve uma resposta estatisticamente significativa na atenuação do remodelamento das arteríolas renais com a metformina. De forma semelhante, Grassi e colaboradores encontraram a diminuição do lúmen em artérias, e uma menor reação à vasodilatação após o estímulo com a acetilcolina em pacientes obesos com resistência à insulina, quando comparados com um grupo não-obeso, porém sem significância estatística (GRASSI *et al.*, 2010). Por outro lado, o estudo morfológico renal obteve como principal resultado o aumento da área glomerular no grupo de ratos obesos, que pode ser explicado pelo início do processo de

glomeruloesclerose e pelo aumento da taxa de filtração glomerular, que já foram descritos na nefropatia relacionada à obesidade (KASISKE & NAPIER, 1985; CHAGNAC *et al.*, 2000).

## 6 CONCLUSÃO

Nos ratos com obesidade induzida pelo glutamato monossódico, que desenvolveram resistência à insulina na 16<sup>a</sup> semana de vida, as alterações cardíacas foram mais proeminentes do que as alterações renais. No coração foram observados sinais de remodelamento vascular hipertrófico nas pequenas artérias intramiocárdicas e evidências de fibrose miocárdica mais proeminente na área perivascular. Nos rins desses animais obesos, o remodelamento das arteríolas intrarrenais foi menos intenso, mas foi constatado um aumento da área glomerular, podendo indicar uma alteração precoce mais funcional do que estrutural. Estas alterações cardiovasculares e renais associadas com a obesidade induzida por glutamato monossódico foram, pelo menos parcialmente, atenuadas com o uso de metformina durante seis semanas. Estes achados sugerem que a metformina, aumentando a sensibilidade periférica à insulina, pode ser benéfica na prevenção de complicações cardíacas, vasculares e renais associadas com a obesidade.

## REFERÊNCIAS

- ABEL, E. D.; S. E. LITWIN; G. SWEENEY. Cardiac remodeling in obesity. *Physiol Rev*, v.88, n.2, p.389-419, 2008.
- ADLER, A. I.; R. C. TURNER. The diabetes prevention program. *Diabetes Care*, v.22, n.4, p.543-5, 1999.
- AGRAWAL, V.; A. SHAH; C. RICE; B. A. FRANKLIN; P. A. MCCULLOUGH. Impact of treating the metabolic syndrome on chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*, v.5, n.9, p.520-8, 2009.
- ALPMAN, A.; M. GULDAL; B. BERKALP; E. DIKER; C. EROL; D. ORAL. Importance of notching and slurring of the resting QRS complex in the diagnosis of coronary artery disease. *J Electrocardiol*, v.28, n.3, p.199-208, 1995.
- ALVAREZ, G. E.; S. D. BESKE; T. P. BALLARD; K. P. DAVY. Sympathetic neural activation in visceral obesity. *Circulation*, v.106, n.20, p.2533-6, 2002.
- ANDERSSON, C. X.; B. GUSTAFSON; A. HAMMARSTEDT; S. HEDJAZIFAR; U. SMITH. Inflamed adipose tissue, insulin resistance and vascular injury. *Diabetes Metab Res Rev*, v.24, n.8, p.595-603, 2008.
- AVELAR, E.; T. V. CLOWARD; J. M. WALKER, *et al.* Left ventricular hypertrophy in severe obesity: interactions among blood pressure, nocturnal hypoxemia, and body mass. *Hypertension*, v.49, n.1, p.34-9, 2007.
- BARBIER, O.; I. P. TORRA; Y. DUGUAY, *et al.* Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.22, n.5, p.717-26, 2002.
- BERKALP, B.; V. CESUR; D. CORAPCIOGLU; C. EROL; N. BASKAL. Obesity and left ventricular diastolic dysfunction. *Int J Cardiol*, v.52, n.1, p.23-6, 1995.
- BROWN, N. J. Aldosterone and end-organ damage. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, v.14, n.3, p.235-41, 2005.
- CARSON, F. L.; J. H. MARTIN; J. A. LYNN. Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. *Am J Clin Pathol*, v.59, n.3, p.365-73, 1973.
- CHAGNAC, A.; T. WEINSTEIN; A. KORZETS; E. RAMADAN; J. HIRSCH; U. GAFTER. Glomerular hemodynamics in severe obesity. *Am J Physiol Renal Physiol*, v.278, n.5, p.F817-22, 2000.
- CITTADINI, A.; C. S. MANTZOROS; T. G. HAMPTON, *et al.* Cardiovascular abnormalities in transgenic mice with reduced brown fat: an animal model of human obesity. *Circulation*, v.100, n.21, p.2177-83, 1999.

CRISOSTOMO, L. L.; L. M. ARAUJO; E. CAMARA, *et al.* Comparison of left ventricular mass and function in obese versus nonobese women <40 years of age. *Am J Cardiol*, v.84, n.9, p.1127-9, A11, 1999.

CUNHA, N. V.; S. B. DE ABREU; C. PANIS, *et al.* Cox-2 inhibition attenuates cardiovascular and inflammatory aspects in monosodium glutamate-induced obese rats. *Life Sci*, v.87, n.11-12, p.375-81, 2010.

DAWSON, R., JR.; D. R. WALLACE; S. M. GABRIEL. A pharmacological analysis of food intake regulation in rats treated neonatally with monosodium L-glutamate (MSG). *Pharmacol Biochem Behav*, v.32, n.2, p.391-8, 1989.

DE AGUIAR, L. G.; L. R. BAHIA; N. VILLELA, *et al.* Metformin improves endothelial vascular reactivity in first-degree relatives of type 2 diabetic patients with metabolic syndrome and normal glucose tolerance. *Diabetes Care*, v.29, n.5, p.1083-9, 2006.

DE CIUCEIS, C.; E. PORTERI; D. RIZZONI, *et al.* Structural alterations of subcutaneous small-resistance arteries may predict major cardiovascular events in patients with hypertension. *Am J Hypertens*, v.20, n.8, p.846-52, 2007.

DE JAGER, J.; A. KOOY; P. LEHERT, *et al.* Effects of short-term treatment with metformin on markers of endothelial function and inflammatory activity in type 2 diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled trial. *J Intern Med*, v.257, n.1, p.100-9, 2005.

DE SIMONE, G.; R. B. DEVEREUX; M. J. KOREN; G. A. MENSAH; P. N. CASALE; J. H. LARAGH. Midwall left ventricular mechanics. An independent predictor of cardiovascular risk in arterial hypertension. *Circulation*, v.93, n.2, p.259-65, 1996.

DESPRES, J. P.; B. LAMARCHE; P. MAURIEGE, *et al.* Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease. *N Engl J Med*, v.334, n.15, p.952-7, 1996.

DOLL, S.; F. PACCAUD; P. BOVET; M. BURNIER; V. WIETLISBACH. Body mass index, abdominal adiposity and blood pressure: consistency of their association across developing and developed countries. *Int J Obes Relat Metab Disord*, v.26, n.1, p.48-57, 2002.

DOLNIKOFF, M.; A. MARTIN-HIDALGO; U. F. MACHADO; F. B. LIMA; E. HERRERA. Decreased lipolysis and enhanced glycerol and glucose utilization by adipose tissue prior to development of obesity in monosodium glutamate (MSG) treated-rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*, v.25, n.3, p.426-33, 2001.

DROYVOLD, W. B.; K. MIDTHJELL; T. I. NILSEN; J. HOLMEN. Change in body mass index and its impact on blood pressure: a prospective population study. *Int J Obes (Lond)*, v.29, n.6, p.650-5, 2005.

FICKOVA, M.; S. ZORAD; J. KUNES; M. RUSNAK; L. MACHO. Insulin resistance in adipocytes of SHR rats. *Ann N Y Acad Sci*, v.827, p.532-5, 1997.

FONSECA, E. A.; M. A. DE OLIVEIRA; N. D. LOBATO, *et al.* Metformin reduces the stimulatory effect of obesity on in vivo Walker-256 tumor development and increases the area of tumor necrosis. *Life Sci*.

FORD, E. S.; W. H. GILES; A. H. MOKDAD. Increasing prevalence of the metabolic syndrome among u.s. Adults. *Diabetes Care*, v.27, n.10, p.2444-9, 2004.

FOSTER, M. C.; S. J. HWANG; M. G. LARSON, *et al.* Overweight, obesity, and the development of stage 3 CKD: the Framingham Heart Study. *Am J Kidney Dis*, v.52, n.1, p.39-48, 2008.

FOX, C. S.; M. G. LARSON; E. P. LEIP; B. CULLETON; P. W. WILSON; D. LEVY. Predictors of new-onset kidney disease in a community-based population. *JAMA*, v.291, n.7, p.844-50, 2004.

FREEMARK, M.; D. BURSEY. The effects of metformin on body mass index and glucose tolerance in obese adolescents with fasting hyperinsulinemia and a family history of type 2 diabetes. *Pediatrics*, v.107, n.4, p.E55, 2001.

GELBER, R. P.; T. KURTH; A. T. KAUSZ, *et al.* Association between body mass index and CKD in apparently healthy men. *Am J Kidney Dis*, v.46, n.5, p.871-80, 2005.

GRANDI, A. M.; P. ZANZI; E. PIANTANIDA, *et al.* Obesity and left ventricular diastolic function: noninvasive study in normotensives and newly diagnosed never-treated hypertensives. *Int J Obes Relat Metab Disord*, v.24, n.8, p.954-8, 2000.

GRASSI, G.; R. DELL'ORO; A. FACCHINI; F. QUARTI TREVANO; G. B. BOLLA; G. MANCIA. Effect of central and peripheral body fat distribution on sympathetic and baroreflex function in obese normotensives. *J Hypertens*, v.22, n.12, p.2363-9, 2004.

GRASSI, G.; G. SERAVALLE; F. SCOPELLITI, *et al.* Structural and functional alterations of subcutaneous small resistance arteries in severe human obesity. *Obesity (Silver Spring)*, v.18, n.1, p.92-8, 2010.

GRUNDY, S. M.; B. HANSEN; S. C. SMITH, JR.; J. I. CLEEMAN; R. A. KAHN. Clinical management of metabolic syndrome: report of the American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute/American Diabetes Association conference on scientific issues related to management. *Circulation*, v.109, n.4, p.551-6, 2004.

GUNNELL, D. J.; S. J. FRANKEL; K. NANCHAHAL; T. J. PETERS; G. DAVEY SMITH. Childhood obesity and adult cardiovascular mortality: a 57-y follow-up study based on the Boyd Orr cohort. *Am J Clin Nutr*, v.67, n.6, p.1111-8, 1998.

GUSTAFSON, B.; A. HAMMARSTEDT; C. X. ANDERSSON; U. SMITH. Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, v.27, n.11, p.2276-83, 2007.

HAFNER, S. G., C; MIETTINEN, H; KENNEDY, E; STERN, M A prospective analysis of the HOMA model. *Diabetes Care*, v.19, p.1138-41, 1996.

HE, J.; L. G. OGDEN; L. A. BAZZANO; S. VUPPUTURI; C. LORIA; P. K. WHELTON. Risk factors for congestive heart failure in US men and women: NHANES I epidemiologic follow-up study. *Arch Intern Med*, v.161, n.7, p.996-1002, 2001.

HSU, C. Y.; C. IRIBARREN; C. E. MCCULLOCH; J. DARBINIAN; A. S. GO. Risk factors for end-stage renal disease: 25-year follow-up. *Arch Intern Med*, v.169, n.4, p.342-50, 2009.

HSUEH, W. A.; M. J. QUINONES. Role of endothelial dysfunction in insulin resistance. *Am J Cardiol*, v.92, n.4A, p.10J-17J, 2003.

HUNDAL, R. S.; M. KRSSAK; S. DUFOUR, *et al.* Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes*, v.49, n.12, p.2063-9, 2000.

IACOBELLIS, G.; F. LEONETTI; N. SINGH; M. S. A. Relationship of epicardial adipose tissue with atrial dimensions and diastolic function in morbidly obese subjects. *Int J Cardiol*, v.115, n.2, p.272-3, 2007.

KAHN, S. E.; S. M. HAFFNER; G. VIBERTI, *et al.* Rosiglitazone decreases C-reactive protein to a greater extent relative to glyburide and metformin over 4 years despite greater weight gain: observations from a Diabetes Outcome Progression Trial (ADOPT). *Diabetes Care*, v.33, n.1, p.177-83, 2010.

KAMBHAM, N.; G. S. MARKOWITZ; A. M. VALERI; J. LIN; V. D. D'AGATI. Obesity-related glomerulopathy: an emerging epidemic. *Kidney Int*, v.59, n.4, p.1498-509, 2001.

KANT, A. K.; B. I. GRAUBARD. Secular trends in the association of socio-economic position with self-reported dietary attributes and biomarkers in the US population: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1971-1975 to NHANES 1999-2002. *Public Health Nutr*, v.10, n.2, p.158-67, 2007.

KASISKE, B. L.; J. NAPIER. Glomerular sclerosis in patients with massive obesity. *Am J Nephrol*, v.5, n.1, p.45-50, 1985.

KATAKAM, P. V.; M. R. UJHELYI; M. HOENIG; A. W. MILLER. Metformin improves vascular function in insulin-resistant rats. *Hypertension*, v.35, n.1 Pt 1, p.108-12, 2000.

KATO, S.; A. NAZNEEN; Y. NAKASHIMA, *et al.* Pathological influence of obesity on renal structural changes in chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol*, v.13, n.4, p.332-40, 2009.

KENCHIAIAH, S.; J. C. EVANS; D. LEVY, *et al.* Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med*, v.347, n.5, p.305-13, 2002.

KIM, J. K.; D. ALLEY; T. SEEMAN; A. KARLAMANGLA; E. CRIMMINS. Recent changes in cardiovascular risk factors among women and men. *J Womens Health (Larchmt)*, v.15, n.6, p.734-46, 2006.

KNOWLER, W. C.; E. BARRETT-CONNOR; S. E. FOWLER, *et al.* Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med*, v.346, n.6, p.393-403, 2002.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. *Nature*, v.404, n.6778, p.635-43, 2000.



KRAMER, H.; A. LUKE; A. BIDANI; G. CAO; R. COOPER; D. MCGEE. Obesity and prevalent and incident CKD: the Hypertension Detection and Follow-Up Program. *Am J Kidney Dis*, v.46, n.4, p.587-94, 2005.

KUBOTA, A.; Y. NAKAGAWA; Y. IGARASHI. Studies of gene expression in liver of insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3 and growth hormone (GH) receptor/GH binding protein in rats treated neonatally with monosodium glutamate. *Horm Metab Res*, v.26, n.11, p.497-503, 1994.

LEBOVITZ, H. E. Insulin resistance: definition and consequences. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, v.109 Suppl 2, p.S135-48, 2001.

LEV-RAN, A. Human obesity: an evolutionary approach to understanding our bulging waistline. *Diabetes Metab Res Rev*, v.17, n.5, p.347-62, 2001.

LITTLE, P. J.; N. OSMAN; S. T. DE DIOS; N. CEMERLANG; M. BALLINGER; J. NIGRO. Anti-proliferative activity of oral anti-hyperglycemic agents on human vascular smooth muscle cells: thiazolidinediones (glitazones) have enhanced activity under high glucose conditions. *Cardiovasc Diabetol*, v.6, p.33, 2007.

MACHO, L.; M. FICKOVA; JEZOVA; S. ZORAD. Late effects of postnatal administration of monosodium glutamate on insulin action in adult rats. *Physiol Res*, v.49 Suppl 1, p.S79-85, 2000.

MADANI, S.; S. DE GIROLAMO; D. M. MUNOZ; R. K. LI; G. SWEENEY. Direct effects of leptin on size and extracellular matrix components of human pediatric ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*, v.69, n.3, p.716-25, 2006.

MALAVAZOS, A. E.; M. M. CORSI; F. ERMETICI, *et al.* Proinflammatory cytokines and cardiac abnormalities in uncomplicated obesity: relationship with abdominal fat deposition. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, v.17, n.4, p.294-302, 2007.

MALAVAZOS, A. E.; F. ERMETICI; C. COMAN; M. M. CORSI; L. MORRICONE; B. AMBROSI. Influence of epicardial adipose tissue and adipocytokine levels on cardiac abnormalities in visceral obesity. *Int J Cardiol*, v.121, n.1, p.132-4, 2007.

MANSON, J. E.; W. C. WILLETT; M. J. STAMPFER, *et al.* Body weight and mortality among women. *N Engl J Med*, v.333, n.11, p.677-85, 1995.

MATSUMOTO, T.; E. NOGUCHI; K. ISHIDA; T. KOBAYASHI; N. YAMADA; K. KAMATA. Metformin normalizes endothelial function by suppressing vasoconstrictor prostanoids in mesenteric arteries from OLETF rats, a model of type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v.295, n.3, p.H1165-H1176, 2008.

MCGILL, H. C., JR.; C. A. MCMAHAN; E. E. HERDERICK, *et al.* Obesity accelerates the progression of coronary atherosclerosis in young men. *Circulation*, v.105, n.23, p.2712-8, 2002.

MORRICONE, L.; C. DONATI; T. HASSAN; P. CIOFFI; F. CAVIEZEL. Relationship of visceral fat distribution to angiographically assessed coronary artery disease: results in

subjects with or without diabetes or impaired glucose tolerance. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, v.12, n.5, p.275-83, 2002.

MORRIS, M. J.; C. F. TORTELLI; A. FILIPPIS; J. PROIETTO. Reduced BAT function as a mechanism for obesity in the hypophagic, neuropeptide Y deficient monosodium glutamate-treated rat. *Regul Pept*, v.75-76, p.441-7, 1998.

MOSHAL, K. S.; N. TYAGI; V. MOSS, *et al.* Early induction of matrix metalloproteinase-9 transduces signaling in human heart end stage failure. *J Cell Mol Med*, v.9, n.3, p.704-13, 2005.

MUST, A.; P. F. JACQUES; G. E. DALLAL; C. J. BAJEMA; W. H. DIETZ. Long-term morbidity and mortality of overweight adolescents. A follow-up of the Harvard Growth Study of 1922 to 1935. *N Engl J Med*, v.327, n.19, p.1350-5, 1992.

NARAYAN, K. M.; J. P. BOYLE; L. S. GEISS; J. B. SAADDINE; T. J. THOMPSON. Impact of recent increase in incidence on future diabetes burden: U.S., 2005-2050. *Diabetes Care*, v.29, n.9, p.2114-6, 2006.

NOGUEIRA, C. R.; U. F. MACHADO; R. CURI; A. R. CARPINELLI. Modulation of insulin secretion and  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  efflux by dopamine in glucose-stimulated pancreatic islets. *Gen Pharmacol*, v.25, n.5, p.909-16, 1994.

O'DONNELL, M. P.; B. L. KASISKE; M. P. CLEARY; W. F. KEANE. Effects of genetic obesity on renal structure and function in the Zucker rat. II. Micropuncture studies. *J Lab Clin Med*, v.106, n.5, p.605-10, 1985.

OCHI, M.; H. FURUKAWA; H. YOSHIOKA; T. SAWADA; T. KUSUNOKI; T. HATTORI. Adipocyte dynamics in hypothalamic obese mice during food deprivation and refeeding. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, v.37, n.5, p.479-91, 1991.

ONG, K. L.; B. M. CHEUNG; Y. B. MAN; C. P. LAU; K. S. LAM. Prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension among United States adults 1999-2004. *Hypertension*, v.49, n.1, p.69-75, 2007.

OREN, S.; E. GROSSMAN; E. D. FROHLICH. Arterial and venous compliance in obese and nonobese subjects. *Am J Cardiol*, v.77, n.8, p.665-7, 1996.

PALMER, R. M.; A. G. FERRIGE; S. MONCADA. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, v.327, n.6122, p.524-6, 1987.

PARK, M. H.; S. KINRA; K. J. WARD; B. WHITE; R. M. VINER. Metformin for obesity in children and adolescents: a systematic review. *Diabetes Care*, v.32, n.9, p.1743-5, 2009.

PARK, S. K.; S. K. KANG. Renal function and hemodynamic study in obese Zucker rats. *Korean J Intern Med*, v.10, n.1, p.48-53, 1995.

PINTEROVA, L.; B. ZELEZNA; M. FICKOVA, *et al.* Elevated AT1 receptor protein but lower angiotensin II-binding in adipose tissue of rats with monosodium glutamate-induced obesity. *Horm Metab Res*, v.33, n.12, p.708-12, 2001.

POIRIER, P.; T. D. GILES; G. A. BRAY, *et al.* Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation*, v.113, n.6, p.898-918, 2006.

POON, T. K.; D. P. CAMERON. Measurement of oxygen consumption and locomotor activity in monosodium glutamate-induced obesity. *Am J Physiol*, v.234, n.5, p.E532-4, 1978.

PRAGA, M.; E. MORALES. Obesity, proteinuria and progression of renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, v.15, n.5, p.481-6, 2006.

PROPHET, E. B.; B. MILLS; J. B. ARRINGTON; L. H. SOBIN. Laboratory methods in histotechnology. Washington: Armed Forces Institute of Pathology, v.1. 1994. 274 p.

QUILLIOT, D.; F. ALLA; P. BOHME, *et al.* Myocardial collagen turnover in normotensive obese patients: relation to insulin resistance. *Int J Obes (Lond)*, v.29, n.11, p.1321-8, 2005.

REEVES, P. G.; F. H. NIELSEN; G. C. FAHEY, JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, v.123, n.11, p.1939-51, 1993.

RELLING, D. P.; L. B. ESBERG; C. X. FANG, *et al.* High-fat diet-induced juvenile obesity leads to cardiomyocyte dysfunction and upregulation of Foxo3a transcription factor independent of lipotoxicity and apoptosis. *J Hypertens*, v.24, n.3, p.549-61, 2006.

RUIGE, J. B.; W. J. ASSENDELFT; J. M. DEKKER; P. J. KOSTENSE; R. J. HEINE; L. M. BOUTER. Insulin and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis. *Circulation*, v.97, n.10, p.996-1001, 1998.

SARTIN, J. L.; A. A. LAMPERTI; R. J. KEMPPAINEN. Alterations in insulin and glucagon secretion by monosodium glutamate lesions of the hypothalamic arcuate nucleus. *Endocr Res*, v.11, n.3-4, p.145-55, 1985.

SARTORETTO, J. L.; G. A. MELO; M. H. CARVALHO, *et al.* Metformin treatment restores the altered microvascular reactivity in neonatal streptozotocin-induced diabetic rats increasing NOS activity, but not NOS expression. *Life Sci*, v.77, n.21, p.2676-89, 2005.

SCHERBAUM, W. A. [Modification of heart failure risk by obesity. Selected aspects of the Framingham Study]. *Internist (Berl)*, v.44, n.5, p.643-5, 2003.

SCHERRER, U.; C. SARTORI. Insulin as a vascular and sympathoexcitatory hormone: implications for blood pressure regulation, insulin sensitivity, and cardiovascular morbidity. *Circulation*, v.96, n.11, p.4104-13, 1997.

SETTY, A. R.; G. CURHAN; H. K. CHOI. Obesity, waist circumference, weight change, and the risk of psoriasis in women: Nurses' Health Study II. *Arch Intern Med*, v.167, n.15, p.1670-5, 2007.

SIDELL, R. J.; M. A. COLE; N. J. DRAPER; M. DESROIS; R. E. BUCKINGHAM; K. CLARKE. Thiazolidinedione treatment normalizes insulin resistance and ischemic injury in the Zucker Fatty rat heart. *Diabetes*, v.51, n.4, p.1110-7, 2002.

SMILEY, T.; P. OH; L. G. SHANE. The relationship of insulin resistance measured by reliable indexes to coronary artery disease risk factors and outcomes--a systematic review. *Can J Cardiol*, v.17, n.7, p.797-805, 2001.

STEHOUWER, C. D.; M. A. GALL; J. W. TWISK; E. KNUDSEN; J. J. EMEIS; H. H. PARVING. Increased urinary albumin excretion, endothelial dysfunction, and chronic low-grade inflammation in type 2 diabetes: progressive, interrelated, and independently associated with risk of death. *Diabetes*, v.51, n.4, p.1157-65, 2002.

STEINBERG, H. O.; H. CHAKER; R. LEAMING; A. JOHNSON; G. BRECHTEL; A. D. BARON. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest*, v.97, n.11, p.2601-10, 1996.

THE DIABETES PREVENTION PROGRAM. Design and methods for a clinical trial in the prevention of type 2 diabetes. *Diabetes Care*, v.22, n.4, p.623-34, 1999.

TOBLLI, J. E.; G. CAO; G. DEROSA; P. FORCADA. Reduced cardiac expression of plasminogen activator inhibitor 1 and transforming growth factor beta1 in obese Zucker rats by perindopril. *Heart*, v.91, n.1, p.80-6, 2005.

TOKUYAMA, K.; J. HIMMS-HAGEN. Adrenalectomy prevents obesity in glutamate-treated mice. *Am J Physiol*, v.257, n.2 Pt 1, p.E139-44, 1989.

TOOKE, J. E.; K. L. GOH. Endotheliopathy precedes type 2 diabetes. *Diabetes Care*, v.21, n.12, p.2047-9, 1998.

VERMA, S.; S. BHANOT; J. H. MCNEILL. Decreased vascular reactivity in metformin-treated fructose-hypertensive rats. *Metabolism*, v.45, n.9, p.1053-5, 1996.

WANG, X. F.; J. Y. ZHANG; L. LI; X. Y. ZHAO; H. L. TAO; L. ZHANG. Metformin improves cardiac function in rats via activation of AMP-activated protein kinase. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v.doi: 10.1111/j.1440-1681.2010.05470.x, 2010.

WIEGAND, S.; D. L'ALLEMAND; H. HUBEL, *et al.* Metformin and placebo therapy both improve weight management and fasting insulin in obese insulin-resistant adolescents: a prospective, placebo-controlled, randomized study. *Eur J Endocrinol*, v.163, n.4, p.585-92, 2010.

WIERNSPERGER, N. F. Membrane physiology as a basis for the cellular effects of metformin in insulin resistance and diabetes. *Diabetes Metab*, v.25, n.2, p.110-27, 1999.

WILHELMSEN, L.; A. ROSENGREN; H. ERIKSSON; G. LAPPAS. Heart failure in the general population of men--morbidity, risk factors and prognosis. *J Intern Med*, v.249, n.3, p.253-61, 2001.

XIAO, H.; X. MA; W. FENG, *et al.* Metformin attenuates cardiac fibrosis by inhibiting the TGFbeta1-Smad3 signalling pathway. *Cardiovasc Res*, v.87, n.3, p.504-13, 2010.

YUE, T. L.; W. BAO; J. L. GU, *et al.* Rosiglitazone treatment in Zucker diabetic Fatty rats is associated with ameliorated cardiac insulin resistance and protection from ischemia/reperfusion-induced myocardial injury. *Diabetes*, v.54, n.2, p.554-62, 2005.

ZAMAN, A. K.; S. FUJII; D. GOTO, *et al.* Salutary effects of attenuation of angiotensin II on coronary perivascular fibrosis associated with insulin resistance and obesity. *J Mol Cell Cardiol*, v.37, n.2, p.525-35, 2004.

ZAMAN, A. K.; S. FUJII; H. SAWA, *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates hypofibrinolysis and reduces cardiac perivascular fibrosis in genetically obese diabetic mice. *Circulation*, v.103, n.25, p.3123-8, 2001.

ZHANG, C. X.; S. N. PAN; R. S. MENG, *et al.* Metformin attenuates ventricular hypertrophy by activating the AMP-activated protein kinase-endothelial nitric oxide synthase pathway in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v.38, n.1, p.55-62.

**APÊNDICE A – Artigo submetido ao International Journal of Cardiology**

**CARDIAC FIBROSIS AND VASCULAR REMODELING ARE ATTENUATED BY  
METFORMIN IN OBESE RATS**

Adriana K. Burla, MD, MsC

Núbia S. Lobato, MsC

Zuleica B. Fortes, PhD

Wille Oigman, MD, PhD

Mario Fritsch Neves<sup>1</sup>, MD, PhD

Department of Clinical Medicine, Biomedical Centre,  
State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Running title: Cardiovascular remodeling attenuated by metformin

---

<sup>1</sup> **Corresponding author: Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Centro Biomédico, Hospital Universitário Pedro Ernesto – Departamento de Clínica Médica. Address: Av 28 de Setembro 87/329, 20551-030 Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Phone: +55.21.2587-6633. E-mail: mfneves@uerj.br.**

## Abstract

**Background:** Human obesity has been associated with alterations of vascular structure, especially in large and medium arteries, but the effects of insulin-sensitizers are not well known.

**Methods:** Twenty five male Wistar rats received subcutaneous injections of monosodium glutamate (MSG) or an equivalent volume of vehicle from the second to the sixth day after birth, At 16 weeks of age, five MSG rats started receiving an oral treatment with metformin (300 mg/kg) which was maintained for six weeks, composing five groups: control 16 weeks (CON-16), MSG 16 weeks (MSG-16), control 22 weeks (CON-22), MSG 22 weeks (MSG-22), and MSG plus metformin 22 weeks (MET-22). Systolic blood pressure (BP) was verified weekly. The lumen diameter and media thickness, media cross-sectional area (CSA) and growth index of the intramyocardial arterioles were measured. Cardiac interstitial and perivascular collagen density were also evaluated.

**Results:** Systolic BP was significantly increased in the MSG-22 comparing to MSG-16 group. Insulin resistance was confirmed by HOMA-IR index and metformin-treated group presented reduction of insulin levels at week 22. The morphology analysis showed greater media-to-lumen ratio and CSA in the obese groups, which were reduced by the metformin treatment. Connective tissue deposition in the perivascular region of the left ventricle was significantly higher in the obese groups which was attenuated by metformin.

**Conclusions:** Hypertrophic vascular remodeling and cardiac collagen deposition were significantly evident in MSG-induced obese rats. Metformin treatment was able to reduce insulin resistance and attenuated this adverse cardiac and vascular remodeling.

**Key Words:** obesity, insulin resistance, collagen, cardiac fibrosis, vascular remodeling, metformin

## Introduction

The prevalence of overweight and obesity has markedly increased over the past two decades, growing rapidly from Western societies to the rest of the world (1, 2). The INTERHEART study demonstrated that obesity is one of the nine modifiable risk factors accounting for more than 90% of myocardial infarction risk (3). Thus, considering obesity as a risk factor for cardiovascular disease, the comprehension of underlying pathological changes linking obesity with heart disease is essential. A recent evaluation of Framingham Study participants stratified by body mass index and waist circumference indicated that individuals with generalized or abdominal obesity had a high prevalence of subclinical disease which partly contributed to the increased cardiovascular risk associated with excess adiposity in these subjects (4).

Recent studies have shown that human obesity is associated with alterations of vascular structure and function, especially in large and medium arteries (5, 6). Structural alterations of subcutaneous small resistance arteries, as indicated by an increased media-to-lumen ratio, are frequently present in hypertensive and/or diabetic patients. These vascular changes may represent the earliest alterations in these subjects and present a strong prognostic significance (7, 8). In severe obese normotensive subjects, Grassi et al recently showed that subcutaneous small resistance arteries undergo profound structural modifications characterized by a hypertrophic process, probably secondary to vascular smooth muscle cell growth (9).

The administration of monosodium glutamate (MSG) to newborn rats provokes hypothalamic injury, leading to neuronal loss that impairs insulin and leptin signaling resulting in obesity (10, 11). The MSG-induced obesity model exhibits most features observed in human obesity such as abdominal obesity, insulin resistance, and hyperinsulinemia. In this experimental model, fat accumulation and insulin resistance



contribute to alterations in microvascular reactivity independently of the presence of type 2 diabetes or hypertension (12).

In addition to its insulin-sensitizing effects, previous data indicate that metformin improves vascular function through a direct mechanism rather than by restoring metabolic abnormalities (13). Thus, it seems that metformin has a direct effect predominantly on vascular function. In this study, we investigated the effects of metformin on cardiac vascular remodeling and collagen deposition in rats that developed insulin resistance and central deposits of fat after MSG treatment.

### **Material and Methods**

This protocol was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (Protocol n.007/04) and conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Twenty five male Wistar rats received subcutaneous injections of MSG (4.0mg/g body weight) dissolved in 0.9% NaCl or an equivalent volume of vehicle from the second to the sixth day after birth. At 16 weeks of age, five MSG rats started receiving an oral treatment with metformin (300 mg/kg) which was maintained for six weeks. Thus, the study was composed by five groups (n=5 for each): control 16 weeks (CON-16), monosodium glutamate 16 weeks (MSG-16), control 22 weeks (CON-22), monosodium glutamate 22 weeks (MSG-22), and monosodium glutamate plus metformin 22 weeks (MET-22). Systolic blood pressure (BP) was verified weekly in conscious rats through the non-invasive method of the tail cuff plethysmography (Letica LE 5100, Panhab, Barcelona, Spain). The average of three pressure readings was obtained.

### *Image analysis of the vascular structure*

After sacrifice, the heart was removed and fragments of the left ventricle were placed for 48h at room temperature in fixative (formaldehyde 4% in 0.1M phosphate buffer pH 7.2) (14), and then embedded in Paraplast plus (Sigma, St. Louis, USA), sectioned at 5µm thickness, and stained with hematoxylin-eosin and picro sirius red. Five fields per section, five sections per organ, totaling 125 fields per group were analyzed by video microscopy. The lumen diameter and media thickness of the intramyocardial arterioles that appeared circular on cross section were measured using the Image Pro Plus analysis software version 5.01 (Media Cybernetics, Silver Spring, USA) in a Olympus BX51 microscope with LC Evolution digital camera. Media cross-sectional area (CSA) was obtained by subtraction of the internal CSA from external CSA:  $CSA = (\pi/4) \times (De^2 - Di^2)$ , where  $De$  and  $Di$  were external and lumen diameters, respectively. Growth index was calculated as  $(CSA_t - CSA_c)/CSA_c$ , where  $CSA_c$  and  $CSA_t$  are media cross-sectional areas of control and treated (MSG ± metformin) vessels, respectively.

### *Collagen quantification in the heart*

The heart was fixed and processed for paraffin embedding as previously described. Tissue sections were dewaxed with ethanol and stained with 0.5% Sirius red. Perivascular collagen was normalized by dividing the CSA of intramyocardial arterioles occupied by collagen by the luminal area of the vessel. Interstitial collagen density was evaluated in two different regions of the LV, including the subepicardial and the subendocardial myocardium. From each of 3 nonconsecutive serial sections, about 10 fields in each region of the heart were randomly selected and recorded (×20 objective).

## Data Analysis

Values were expressed as mean  $\pm$ SEM. The values were compared by one-way ANOVA followed by a Tukey post-test. A value of  $P < 0.05$  was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using Prism for Windows, version 5.0 (GraphPad Software, Inc.).

## Results

The Lee index was statistically higher in MSG groups which also presented greater values of retroperitoneal white adipose tissue when compared to control groups (Table 1). There was no significant difference in systolic BP when comparing MSG to control groups. However, the systolic BP was significantly increased in the MSG-22 comparing to MSG-16 group ( $122 \pm 2$  vs  $108 \pm 2$  mmHg,  $p < 0.05$ ), and MET-22 group ( $118 \pm 1$  mmHg) showed lower BP levels without reaching statistical significance (Figure 1A). At week 16, despite normal plasma glucose levels, insulin resistance was confirmed as indicated by a higher HOMA-IR index (Figure 1B, 1D). The metformin-treated group presented reduction of insulin levels and showed improvement in the insulin resistance tests at week 22 (Figure 1C, 1D).

### *Vascular structure*

The morphology analysis showed similar diameter of the intramyocardial arterioles among all the groups and greater media thickness in the obese groups, which was reduced by the metformin treatment. In the obese groups by observing an increased media-to-lumen ratio which was reduced by metformin. Media cross-sectional area was also increased in MSG groups compared to control groups resulting in an elevated growth index suggesting in a hypertrophic vascular remodeling in these animals (Table 1).

### *Cardiac collagen deposition*

Interstitial connective tissue deposition in the perivascular region of the left ventricle was significantly higher in the obese groups which was attenuated by metformin. Collagen deposition in the subendocardial and subpericardial areas was also higher in MSG-treated rats but did not reach statistical significance (Table 1, Figure 2).

### **Discussion**

To our knowledge, there is no consistent data about the structure of small arteries in the heart of obese animals yet. The present study was able to demonstrate a hypertrophic vascular remodeling of intramyocardial arterioles and cardiac fibrosis associated with obesity and insulin resistance. More importantly, these structural cardiovascular changes were attenuated by metformin treatment.

Insulin resistance has been recognized as an important risk factor for the development of cardiovascular disease. MSG-treated rat is a model of obesity characterized by insulin resistance associated or not with hypertension, depending on the animal's age (11). In this study, there was no significant difference in systolic BP of obese animals in comparison with corresponding controls. However, the notable BP increase in older MSG-treated rats compared to younger animals confirms that obesity may not initially change BP but hypertension can develop after a short time. Increased plasma levels of corticosterone might contribute to BP raise in this model (15). Moreover, a recent study demonstrated an association between increased BP and products of COX-2 in MSG-treated rats, indicating a possible role for prostaglandins in the interaction of hypertension with inflammatory process in MSG-induced obesity (16).

It has been recently shown that severe human obesity is associated with changes in the structure and function of small arteries. Independently from the presence of hypertension and

diabetes, obese patients have shown to present increased media-to-lumen ratio and increased media cross-sectional area of subcutaneous small resistance arteries (9). These data indicate that obesity is associated with structural vascular changes, mainly characterized by hypertrophic vascular remodeling. In agreement with this, the present study evidenced an increased media cross-sectional area of intramyocardial arterioles in MSG groups resulting in an elevated growth index which indicates a hypertrophic vascular remodeling in the heart of these animals. The mechanism by which obesity, insulin resistance and/or hyperinsulinemia determine vascular disease is not clear yet. The hypertrophic remodeling observed in our study could be attributed to the proliferative effects of insulin on vascular smooth muscle cells (17, 18). The increased release of norepinephrine associated with visceral obesity may also promote vascular hypertrophy (19, 20). In addition, a chronic state of low-grade inflammation residing in the adipose tissue provokes inhibitory effects on insulin sensitivity in the liver and peripheral tissues, and increased release of proinflammatory cytokines by adipose tissue could promote vascular wall inflammation and hypertrophic response (21). Visceral adipose tissue can produce numerous cytokines, such as monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) and interleukin-6 (IL-6) which were correlated with epicardial fat thickness, and may contribute to diastolic dysfunction in obese patients (22-24).

In the current study, vascular remodeling was assessed in young rats. This was intentionally done in order to evaluate early vascular disease associated with obesity. Indeed, obesity in adolescent and young adult men has already been associated with early atherosclerotic lesions (25). Moreover, long-term follow-up studies have confirmed that obesity in youth predicts cardiovascular morbidity and mortality (26, 27). Many authors have assumed that hyperinsulinemia, as a compensatory mechanism arising from elevated insulin resistance, is responsible for increased cardiovascular risk, but the evidences of this relationship have been inconsistent (28, 29). In fact, HOMA-IR and other insulin resistance

indexes, rather than insulin concentrations per se, have been more associated with cardiovascular risk and outcomes (30).

The increased collagen deposition in the perivascular area of the left ventricle in MSG-treated animals in this study indicated initial process of cardiac fibrosis induced by obesity and/or insulin resistance. Accordingly, increased interstitial fibrosis has been described in the heart of different animal models of obesity such as Zucker rats and transgenic mice (31, 32). In ob/ob mice, fibrosis was observed mainly in the perivascular region as we evidenced in our obese rats. The mechanisms are not known but the fibrotic response may be in part due to local activation of the renin-angiotensin system as treatment of animals with angiotensin converting enzyme inhibitors result in regression of fibrosis (33, 34).

Replacement fibrosis might follow apoptotic cardiomyocyte death but a recent study using high-fat diet-induced insulin resistant rat model of obesity did not detect significant differences in apoptosis despite cardiomyocyte dysfunction (35). At last, regulation of myocardial extracellular matrix by adipokines may play a role in obesity (36). Serum markers of cardiac collagen turnover have been shown to be elevated in obese individuals and increased matrix metalloproteinase-9 activity in the left ventricle seems to be an early trigger of adverse cardiac remodeling (37, 38). Furthermore, leptin signaling may also contribute to cardiac extracellular matrix regulation in obesity since leptin was able to increase procollagen type III and IV although not changing total collagen synthesis (39).

The most remarkable finding in our study was the beneficial effect of metformin in reducing vascular remodeling and attenuating cardiac collagen deposition. In fact, pharmacological sensitizers have been shown to reverse myocardial insulin resistance and thus reducing myocardial injury (40, 41). The cardioprotective effects of metformin have been lately attributed to the inhibition of collagen synthesis by cardiac fibroblasts through impairment of transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 and reductions in tumor necrosis

factor- $\alpha$  of circulating and myocardium levels (42, 43). It has recently reported an improvement of cardiac structure and function provoked by metformin which was associated with increased nitric oxide production and inhibition of protein synthesis induced by angiotensin II in cardiomyocytes (44). Anti-inflammatory effects could also be speculated for insulin sensitizers although there is no confirmatory evidence. Reductions in pro-inflammatory cytokines and monocyte adhesion molecules, and improved glycation status may benefit endothelial function in the macro- and microvasculature (45). In A Diabetes Outcome Progression Trial (ADOPT), metformin was able to reduce C-reactive protein but this favorable outcome was correlated with changes in weight (46). In randomized controlled trials, metformin seemed to be moderately effective in reducing body mass index and insulin resistance in non-diabetic hyperinsulinemic obese children and adolescents in the short term (47, 48). Regardless of improving metabolic abnormalities, a direct effect of metformin on vascular function has been proposed by some authors (13),(49). On the other hand, it has recently shown that metformin had no inhibitory effect on human vascular smooth muscle cell proliferation assessed by thymidine incorporation and cell counting (50). Plasma glucose levels were very similar among all the groups in the current study. This finding supports an apparent vasoprotective effect of metformin independent of blood glucose-lowering efficacy.

In conclusion, hypertrophic vascular remodeling and cardiac collagen deposition were predominant in MSG-induced obese rats. Metformin treatment was able to reduce insulin resistance and to attenuate this adverse cardiac and vascular remodeling. Further studies are necessary to identify the exact mechanisms involved in this pathological alterations and to correlate with unfavorable outcomes.

## References

- [1] Marinou K, Tousoulis D, Antonopoulos AS, Stefanadi E, Stefanadis C. Obesity and cardiovascular disease: from pathophysiology to risk stratification. *Int J Cardiol* 2010; 138:3-8.
- [2] Ayatollahi SM, Ghoreshizadeh Z. Prevalence of obesity and overweight among adults in Iran. *Obes Rev* 2010; 11:335-337.
- [3] Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004; 364:937-952.
- [4] Ingelsson E, Sullivan LM, Fox CS, et al. Burden and prognostic importance of subclinical cardiovascular disease in overweight and obese individuals. *Circulation* 2007; 116:375-384.
- [5] Zebekakis PE, Nawrot T, Thijs L, et al. Obesity is associated with increased arterial stiffness from adolescence until old age. *J Hypertens* 2005; 23:1839-1846.
- [6] Levy BI, Schiffrin EL, Mourad JJ, et al. Impaired tissue perfusion: a pathology common to hypertension, obesity, and diabetes mellitus. *Circulation* 2008; 118:968-976.
- [7] De Ciuceis C, Porteri E, Rizzoni D, et al. Structural alterations of subcutaneous small-resistance arteries may predict major cardiovascular events in patients with hypertension. *Am J Hypertens* 2007; 20:846-852.
- [8] Grassi G, Schiffrin EL. Media-to-lumen ratio as predictor of renal abnormalities in hypertension: new findings, new questions. *J Hypertens* 2010; 28:1811-1813.
- [9] Grassi G, Seravalle G, Scopelliti F, et al. Structural and functional alterations of subcutaneous small resistance arteries in severe human obesity. *Obesity (Silver Spring)* 2010; 18:92-98.



- [10] Dawson R, Pellemounter MA, Millard WJ, Liu S, Eppler B. Attenuation of leptin-mediated effects by monosodium glutamate-induced arcuate nucleus damage. *Am J Physiol* 1997; 273:E202-206.
- [11] Macho L, Fickova M, Jezova, Zorad S. Late effects of postnatal administration of monosodium glutamate on insulin action in adult rats. *Physiol Res* 2000; 49 Suppl 1:S79-85.
- [12] Lobato NS, Filgueira FP, Akamine EH, et al. Obesity induced by neonatal treatment with monosodium glutamate impairs microvascular reactivity in adult rats: Role of NO and prostanoids. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010; doi: 10.1016/j.numecd.2010.02.006.
- [13] Katakam PV, Ujhelyi MR, Hoenig M, Miller AW. Metformin improves vascular function in insulin-resistant rats. *Hypertension* 2000; 35:108-112.
- [14] Carson FL, Martin JH, Lynn JA. Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. *Am J Clin Pathol* 1973; 59:365-373.
- [15] Tokuyama K, Himms-Hagen J. Adrenalectomy prevents obesity in glutamate-treated mice. *Am J Physiol* 1989; 257:E139-144.
- [16] Cunha NV, de Abreu SB, Panis C, et al. Cox-2 inhibition attenuates cardiovascular and inflammatory aspects in monosodium glutamate-induced obese rats. *Life Sci* 2010; 87:375-381.
- [17] Scherrer U, Sartori C. Insulin as a vascular and sympathoexcitatory hormone: implications for blood pressure regulation, insulin sensitivity, and cardiovascular morbidity. *Circulation* 1997; 96:4104-4113.
- [18] Gustafson B, Hammarstedt A, Andersson CX, Smith U. Inflamed adipose tissue: a culprit underlying the metabolic syndrome and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:2276-2283.

- [19] Alvarez GE, Beske SD, Ballard TP, Davy KP. Sympathetic neural activation in visceral obesity. *Circulation* 2002; 106:2533-2536.
- [20] Grassi G, Dell'Oro R, Facchini A, Quarti Trevano F, Bolla GB, Mancia G. Effect of central and peripheral body fat distribution on sympathetic and baroreflex function in obese normotensives. *J Hypertens* 2004; 22:2363-2369.
- [21] Andersson CX, Gustafson B, Hammarstedt A, Hedjazifar S, Smith U. Inflamed adipose tissue, insulin resistance and vascular injury. *Diabetes Metab Res Rev* 2008; 24:595-603.
- [22] Malavazos AE, Corsi MM, Ermetici F, et al. Proinflammatory cytokines and cardiac abnormalities in uncomplicated obesity: relationship with abdominal fat deposition. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007; 17:294-302.
- [23] Malavazos AE, Ermetici F, Coman C, Corsi MM, Morricone L, Ambrosi B. Influence of epicardial adipose tissue and adipocytokine levels on cardiac abnormalities in visceral obesity. *Int J Cardiol* 2007; 121:132-134.
- [24] Iacobellis G, Leonetti F, Singh N, A MS. Relationship of epicardial adipose tissue with atrial dimensions and diastolic function in morbidly obese subjects. *Int J Cardiol* 2007; 115:272-273.
- [25] McGill HC, Jr., McMahan CA, Herderick EE, et al. Obesity accelerates the progression of coronary atherosclerosis in young men. *Circulation* 2002; 105:2712-2718.
- [26] Must A, Jacques PF, Dallal GE, Bajema CJ, Dietz WH. Long-term morbidity and mortality of overweight adolescents. A follow-up of the Harvard Growth Study of 1922 to 1935. *N Engl J Med* 1992; 327:1350-1355.
- [27] Gunnell DJ, Frankel SJ, Nanchahal K, Peters TJ, Davey Smith G. Childhood obesity and adult cardiovascular mortality: a 57-y follow-up study based on the Boyd Orr cohort. *Am J Clin Nutr* 1998; 67:1111-1118.

- [28] Despres JP, Lamarche B, Mauriege P, et al. Hyperinsulinemia as an independent risk factor for ischemic heart disease. *N Engl J Med* 1996; 334:952-957.
- [29] Ruige JB, Assendelft WJ, Dekker JM, Kostense PJ, Heine RJ, Bouter LM. Insulin and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis. *Circulation* 1998; 97:996-1001.
- [30] Smiley T, Oh P, Shane LG. The relationship of insulin resistance measured by reliable indexes to coronary artery disease risk factors and outcomes--a systematic review. *Can J Cardiol* 2001; 17:797-805.
- [31] Toblli JE, Cao G, DeRosa G, Forcada P. Reduced cardiac expression of plasminogen activator inhibitor 1 and transforming growth factor beta1 in obese Zucker rats by perindopril. *Heart* 2005; 91:80-86.
- [32] Cittadini A, Mantzoros CS, Hampton TG, et al. Cardiovascular abnormalities in transgenic mice with reduced brown fat: an animal model of human obesity. *Circulation* 1999; 100:2177-2183.
- [33] Zaman AK, Fujii S, Goto D, et al. Salutary effects of attenuation of angiotensin II on coronary perivascular fibrosis associated with insulin resistance and obesity. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 37:525-535.
- [34] Zaman AK, Fujii S, Sawa H, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates hypofibrinolysis and reduces cardiac perivascular fibrosis in genetically obese diabetic mice. *Circulation* 2001; 103:3123-3128.
- [35] Relling DP, Esberg LB, Fang CX, et al. High-fat diet-induced juvenile obesity leads to cardiomyocyte dysfunction and upregulation of Foxo3a transcription factor independent of lipotoxicity and apoptosis. *J Hypertens* 2006; 24:549-561.
- [36] Abel ED, Litwin SE, Sweeney G. Cardiac remodeling in obesity. *Physiol Rev* 2008; 88:389-419.

- [37] Quilliot D, Alla F, Bohme P, et al. Myocardial collagen turnover in normotensive obese patients: relation to insulin resistance. *Int J Obes (Lond)* 2005; 29:1321-1328.
- [38] Moshal KS, Tyagi N, Moss V, et al. Early induction of matrix metalloproteinase-9 transduces signaling in human heart end stage failure. *J Cell Mol Med* 2005; 9:704-713.
- [39] Madani S, De Girolamo S, Munoz DM, Li RK, Sweeney G. Direct effects of leptin on size and extracellular matrix components of human pediatric ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 2006; 69:716-725.
- [40] Sidell RJ, Cole MA, Draper NJ, Desrois M, Buckingham RE, Clarke K. Thiazolidinedione treatment normalizes insulin resistance and ischemic injury in the Zucker Fatty rat heart. *Diabetes* 2002; 51:1110-1117.
- [41] Yue TL, Bao W, Gu JL, et al. Rosiglitazone treatment in Zucker diabetic Fatty rats is associated with ameliorated cardiac insulin resistance and protection from ischemia/reperfusion-induced myocardial injury. *Diabetes* 2005; 54:554-562.
- [42] Xiao H, Ma X, Feng W, et al. Metformin attenuates cardiac fibrosis by inhibiting the TGFbeta1-Smad3 signalling pathway. *Cardiovasc Res* 2010; 87:504-513.
- [43] Wang XF, Zhang JY, Li L, Zhao XY, Tao HL, Zhang L. Metformin improves cardiac function in rats via activation of AMP-activated protein kinase. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010; doi: 10.1111/j.1440-1681.2010.05470.x.
- [44] Zhang CX, Pan SN, Meng RS, et al. Metformin attenuates ventricular hypertrophy by activating the AMPK-eNOS pathway in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010; doi: 10.1111/j.1440-1681.2010.05461.x.
- [45] Bailey CJ. Metformin: effects on micro and macrovascular complications in type 2 diabetes. *Cardiovasc Drugs Ther* 2008; 22:215-224.
- [46] Kahn SE, Haffner SM, Viberti G, et al. Rosiglitazone decreases C-reactive protein to a greater extent relative to glyburide and metformin over 4 years despite greater weight

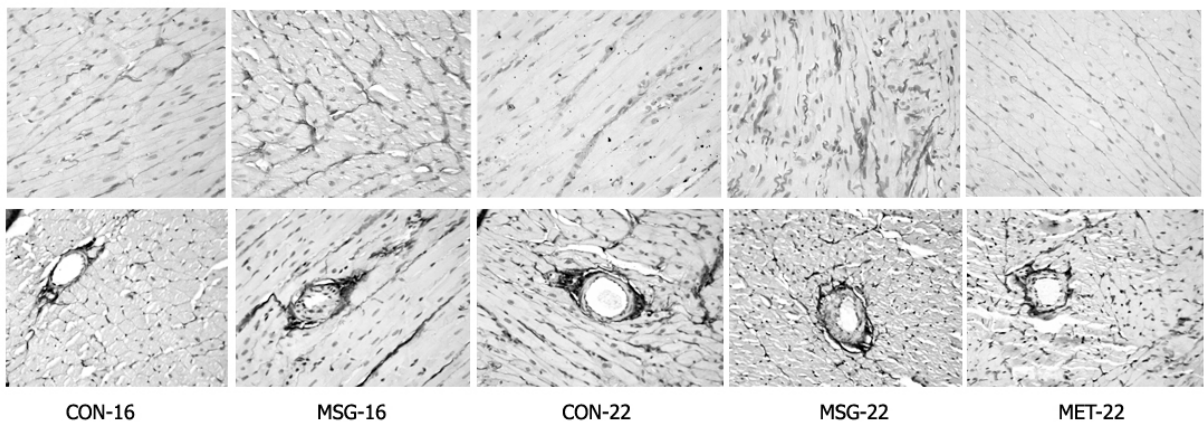
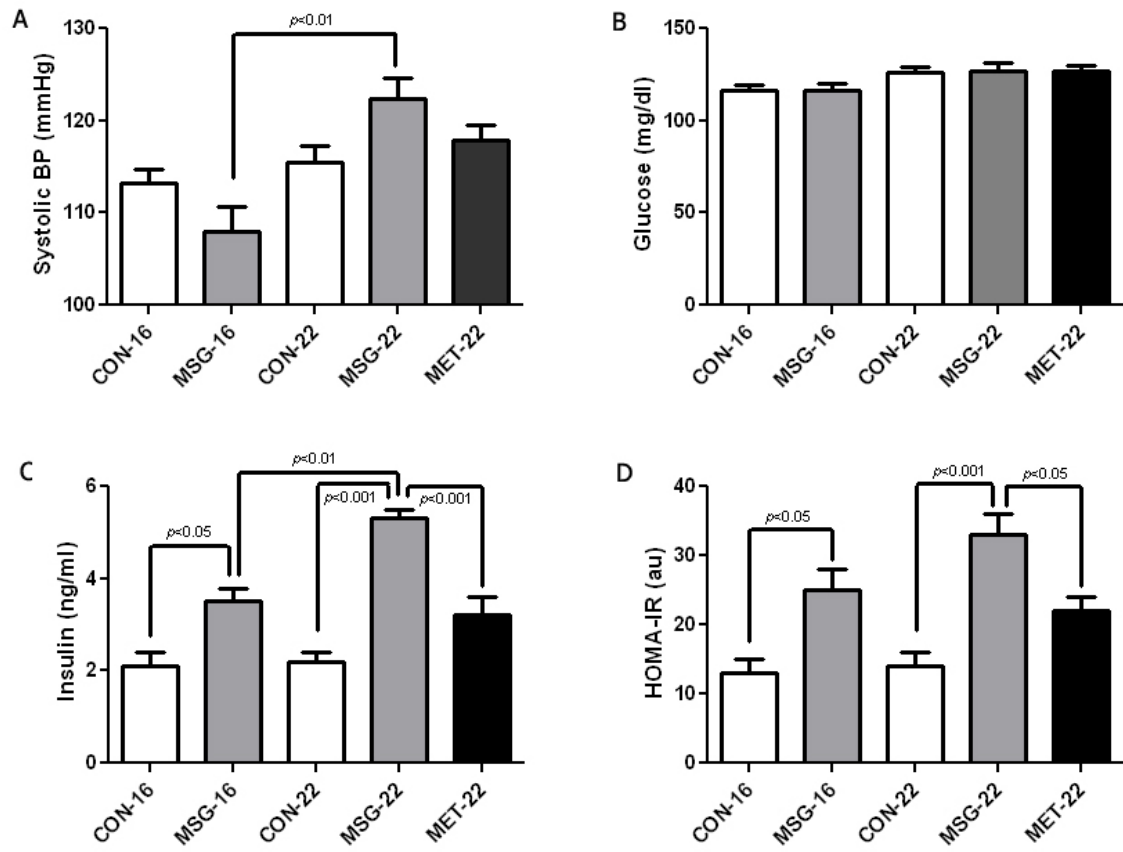
gain: observations from a Diabetes Outcome Progression Trial (ADOPT). *Diabetes Care* 2010; 33:177-183.

- [47] Park MH, Kinra S, Ward KJ, White B, Viner RM. Metformin for obesity in children and adolescents: a systematic review. *Diabetes Care* 2009; 32:1743-1745.
- [48] Wiegand S, l'Allemand D, Hubel H, et al. Metformin and placebo therapy both improve weight management and fasting insulin in obese insulin-resistant adolescents: a prospective, placebo-controlled, randomized study. *Eur J Endocrinol* 2010; 163:585-592.
- [49] Verma S, Bhanot S, McNeill JH. Decreased vascular reactivity in metformin-treated fructose-hypertensive rats. *Metabolism* 1996; 45:1053-1055.
- [50] Little PJ, Osman N, de Dios ST, Cemerlang N, Ballinger M, Nigro J. Anti-proliferative activity of oral anti-hyperglycemic agents on human vascular smooth muscle cells: thiazolidinediones (glitazones) have enhanced activity under high glucose conditions. *Cardiovasc Diabetol* 2007; 6:33.

Table 1. Obesity parameters, vascular morphometry of intramyocardial arterioles and cardiac collagen deposition in all groups.

	CON-16	MSG-16	CONT-22	MSG-22	MET-22
Lee index, %	29.0 ± 0.2	30.4 ± 0.2 <sup>***</sup>	29.5±0.1	31.2±0.2 <sup>***</sup>	30.2±0.1 <sup>##</sup>
Retroperitoneal WAT, g/100g	0.97 ± 0.07	2.81 ± 0.11 <sup>*</sup>	1.13±0.21	2.62±0.43	2.24±0.23
Lumen diameter, µm	32.3±1.7	34.2±3.3	35.9±2.3	34.7±2.4	33.9±1.3
Media thickness, µm	12.6±0.6	14.9±0.9	10.9±0.4	14.5±0.6 <sup>*</sup>	11.5±1.0
Media-lumen ratio, %	30.2±2.0	39.9±3.7 <sup>*</sup>	29.5±1.2	39.8±1.3 <sup>*</sup>	31.5±0.9
Media CSA, x10 <sup>3</sup> µm <sup>2</sup>	12.5±0.5	14.9±0.9	10.9±0.4	14.5±0.6 <sup>*</sup>	11.5±1.0
Growth index, %	-	19.2	-	33.0	5.5
<i>Myocardial collagen</i>					
- subendocardial, %	2.1±0.8	4.1±0.3	4.0±0.3	4.8±0.8	3.0±0.1
- subpericardial, %	2±0.3	3±0.2	2±0.4	4±0.5	4±0.5
- perivascular, %	0.80±0.05	1.19±0.19	0.83±0.06	1.39±0.06 <sup>**</sup>	1.02±0.04

Data are expressed in mean ± SEM. WAT, white adipose tissue; CSA, cross-sectional area.  
<sup>\*</sup>*p*<0.05, <sup>\*\*</sup>*p*<0.01 and <sup>\*\*\*</sup>*p*<0.001 vs respective control groups; <sup>##</sup>*p*<0.01 vs MSG-22



ANEXO – Certificados de apresentação de trabalhos em congressos




**VII CONGRESSO DO DEPARTAMENTO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL**  
DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA





**CERTIFICADO**

**Conferido a: ADRIANA BURLÁ KLAJMAN, NÚBIA DE SOUZA LOBATO, ZULEICA BRUNO FORTES, WILLE OIGMAN, MARIO FRITSCH TOROS NEVES.**

Por sua participação na qualidade de: autor(a)/co-autor(a) na apresentação do trabalho de título: **ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DE ARTÉRIAS INTRAMIOCÁRDICAS INDUZIDAS POR OBESIDADE EM RATOS SÃO ATENUADAS PELA METFORMINA**


São Paulo, 27 de novembro de 2010

 <b>Marcus Vinicius B. Malaquias</b> Presidente SBC / DHA	 <b>Luiz Aparecido Bortolotto</b> Presidente Comissão Científica VII Congresso do SBC / DHA	 <b>Flávio A. Borelli</b> Presidente VII Congresso do SBC / DHA
---	--	---

**VII CONGRESSO DO DEPARTAMENTO DE HIPERTENSÃO DA SBC**

24 a 27 de novembro de 2010  
São Paulo - SP



**DEPARTAMENTO DE HIPERTENSÃO ARTERIAL**  
DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA