



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

NATÁLIA TOBAR TOLEDO PRUDENTE DA SILVA

EFEITOS FARMACOLÓGICOS DA METFORMINA SOBRE A CAPTAÇÃO INTESTINAL
DE GLICOSE E INDUÇÃO DO *CROSSTALK* INTESTINO – FÍGADO NO CONTROLE DA
NEOGLICOGÊNESE HEPÁTICA

CAMPINAS

2023

NATÁLIA TOBAR TOLEDO PRUDENTE DA SILVA

EFEITOS FARMACOLÓGICOS DA METFORMINA SOBRE A CAPTAÇÃO INTESTINAL
DE GLICOSE E INDUÇÃO DO *CROSSTALK* INTESTINO – FÍGADO NO CONTROLE DA
NEOGLICOGÊNESE HEPÁTICA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual
de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de
Doutora em Ciências, na área de Clínica Médica.

ORIENTADOR: PROF. DR. MARIO JOSÉ ABDALLA SAAD

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA
NATÁLIA TOBAR TOLEDO PRUDENTE DA SILVA
E ORIENTADA PELO PROF. DR. MARIO JOSÉ ABDALLA SAAD

CAMPINAS

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Si38e Silva, Natália Tobar Toledo Prudente da, 1985-
Efeitos farmacológicos da metformina sobre a captação intestinal de glicose e indução do *crosstalk* intestino-fígado no controle da neoglicogênese hepática / Natália Tobar Toledo Prudente da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Mario José Abdalla Saad.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Metformina. 2. Diabetes Mellitus. 3. *Crosstalk* intestino-fígado. 4. Metabolismo de glicose. I. Saad, Mario José Abdalla, 1956-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Pharmacological effects of metformin on intestinal glucose uptake and induction of gut-liver crosstalk in the control of hepatic neoglycogenesis

Palavras-chave em inglês:

Metformin

Diabetes Mellitus

Gut-liver crosstalk

Glucose metabolism

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Mario José Abdalla Saad [Orientador]

Sarah Monte Alegre

Elba Cristina Sá de Camargo Etchebehere

Sérgio Atala Dib

Francisco José Albuquerque de Paula

Data de defesa: 29-09-2023

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-4383-3876>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/4054110675209970>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

NATÁLIA TOBAR TOLEDO PRUDENTE DA SILVA

ORIENTADOR: PROF. DR. MARIO JOSÉ ABDALLA SAAD

MEMBROS TITULARES:

- 1. PROF. DR. MARIO JOSÉ ABDALLA SAAD**
 - 2. PROF^a. DR^a. ELBA CRISTINA SÁ DE CAMARGO ETCHEBEHERE**
 - 3. PROF^a. DR^a. SARAH MONTE ALEGRE**
 - 4. PROF. DR. SÉRGIO ATALA DIB**
 - 5. PROF. DR. FRANCISCO JOSÉ ALBUQUERQUE DE PAULA**
-

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 29/09/2023

DEDICATÓRIA

Aos meus avós maternos, Dr. Miguel Tobar e D. Leonízia, docentes e colaboradores desta universidade, que um dia na minha infância me trouxeram até aqui e sem perceberem, semearam em mim o desejo de ser como eles;

À minha avó paterna, que abraçou, abençoou e incentivou o sonho que realizo com esse trabalho como se fosse o dela. À D. Lourdes, cujo sonho era estudar;

À minha mãe, Denize, meu padrasto, Juliano e aos meus irmãos, Débora e Miguel, por me proporcionarem a vida inteira a oportunidade de viver o real significado de família. Vocês são a base, o norte e a razão! Vocês são tudo!

Ao Ricardo, meu amor.

EPÍGRAFE

“Toda doença começa no intestino”

Hipócrates ~ 500 anos a.C.

AGRADECIMENTOS

- Ao meu querido orientador, Dr. Mario José Abdalla Saad, professor titular do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas, por mais de uma década de aprendizado, conquistas e muito crescimento profissional e pessoal. Obrigada por mais esta oportunidade, esta feliz oportunidade de tornar o sonho de uma antiga adolescente em um dia ser cientista e doutora nesta universidade algo real para mim!

- Aos ilustríssimos membros titulares da banca examinadora: Prof^a Dr^a Sarah Monte Alegre, Prof^a Dr^a Elba Cristina Sá de Camargo Etchebehere, Prof. Dr. Sérgio Atala Dib e Prof. Dr. Francisco José Albuquerque de Paula pela presença, valiosos conselhos, sugestões e contribuições. Admiro-os profundamente!

- Aos ilustríssimos membros suplentes da banca examinadora: Prof. Dr. Andrei Carvalho Sposito, Prof^a Dr^a Regina Celia Mello Santiago Moises e Prof^a Dr^a Maria Lucia Cardillo Corrêa Giannella, pela disponibilidade e gentileza. Tenho-lhes grande estima!

- À Dioze, de quem eu virei irmã nessa jornada acadêmica e pela vida afora também. Pela parceria tão valiosa em todos os momentos, por ter sido o suporte e a força que eu tanto precisei para chegar até aqui. Tê-la por perto possibilitou tudo o que eu celebro hoje; e esse trabalho só existe porque você está ao meu lado. Todos os dias. Por mais de 15 anos!

- Ao querido Andrey, por ter tornado minha rotina no laboratório e meus experimentos mais leves e divertidos. Assim também ficou a vida convivendo com você. Pelo companheirismo, incentivo, amizade e boas risadas, toda a minha gratidão!

- À querida amiga Heloísa, tão prestativa, solícita e sempre tão gentil e doce! Obrigada por ter abraçado esse trabalho com tanto amor e ter feito dele uma realização sua também. Sua contribuição foi inestimável!

- Ao Guilherme, querido amigo de muitos anos, com o qual eu aprendo diariamente o valor de uma amizade e reconheço a sorte de tê-lo como parceiro em mais esse projeto na minha

vida. Muito obrigada por ter estado ao meu lado em todas as etapas deste trabalho, tantas vezes me dando suporte e tantas outras me encorajando a tentar de novo. Pelas inúmeras dificuldades que enfrentamos juntos para que isso tudo fosse real, você tem a minha mais profunda gratidão e admiração, Gui!

- A querida Juliana, parceira incrível nesse projeto e que tanto me ajudou! Sem você, eu não estaria aqui hoje, Ju! Foram sua dedicação, entrega e cumplicidade que me trouxeram a mais essa grande conquista. Muito, muito obrigada! Sinto-me muito abençoada por tê-la como colaboradora deste trabalho.

- Aos meus companheiros de bancada que conviveram comigo no Laboratório de Investigação Clínica em Resistência à Insulina ao longo desses 15 anos, meus agradecimentos pelo que me ensinaram, pela paciência e por deixarem meus dias mais leves e alegres.

- Ao Sr. Luís Janeri (*in memoriam*) e Sr. Jósimo Pinheiro (*in memoriam*), funcionários do Laboratório de Investigação Clínica em Resistência à Insulina, por todo apoio, presteza, atenção e pelos tempos felizes que compartilhamos juntos! Estarão ambos para sempre em minhas lembranças e em meu coração!

- Aos ilustres coautores deste trabalho, Dr. Alexandre Gabarra de Oliveira, Dr^a Silvana Rocco, Dr. Maurício L. Sforça, Dr. Raphael Morales, Msc. Irene Layane de Sousa, Dr. Claudio Tormena, Dr^a Flávia Pallis, Dr^a Any Elisa Gonçalves, Dr^a Emerielle Vanzela, Dr^a Raissa G. Ludwig, Msc. Patrícia B. Rodrigues, Dr. Marcos R. Alborghetti, Dr. Marco A. R. Vinolo, Dr^a Patrícia Boer, Dr. José Antônio Gontijo, Dr^a Carla Carvalho, Dr^a Patrícia Prada, Dr. Franco Folli, Dr. Rui Curi, Dr. Marcelo Mori, Dr. Bruno Geloneze, Dr. Celso Darío Ramos e Dr. Kleber Franchini por tamanha generosidade e valiosa colaboração.

- Às queridas funcionárias do setor de gasometria do Hospital de Clínicas da Unicamp, Maria Cristina de Souza e Marielza Crosnac Feres Lot, pelo carinho, atenção e parceria tão importante e especial.

-Às minhas amigas do coração, Thalita, Marcella, Thays, Izabela e Renata, companheiras e irmãs nessa jornada. Porque suas palavras, incentivo e suporte trazem paz ao coração, brilho nos olhos, sorriso nos lábios e caminham junto a mim todos os dias.

- Ao Prof. Dr. Celso Darío Ramos, docente da Faculdade de Ciências Médicas, que enquanto diretor do Serviço de Medicina Nuclear do Hospital de Clínicas da Unicamp, onde trabalho há quase 18 anos, possibilitou-me a redução de minha jornada laboral para que eu pudesse me dedicar ao mestrado e ao doutorado e tornasse esses dois sonhos realidades tão felizes. Por abrir a portas do Serviço de Medicina Nuclear ao desenvolvimento de tais projetos, pela compreensão, incentivo e tamanha gentileza, Dr. Darío, agradeço-o imensamente!

- Aos meus parceiros, amigos e companheiros de trabalho do Serviço de Medicina Nuclear, minha família de tantos anos: Edna, Viviana (*in memorian*), Juliana, Cristiane, Fernanda, Glaucia, Simone, Juliano e Vânia, que acolheram esse sonho e com tamanha grandeza nos gestos e nobreza nos sentimentos, tornaram-se pilares para que esse trabalho fosse realizado. Vocês todos são parte desta conquista!

- A Raquel, vizinha, supervisora de seção na Medicina Nuclear e acima de tudo, minha amiga do coração, obrigada por ter tornado possível tantos experimentos, seja no desenrolar da minha rotina profissional ou por inúmeras vezes ter cuidado da Dalila para que eu pudesse me dedicar a tudo com calma e tranquilidade. Sou extremamente grata pelo seu carinho, amparo e inestimável colaboração!

-Às recepcionistas do Serviço de Medicina Nuclear, Keli e Valquíria, à equipe de enfermagem, Sandra, Tânia, Maria Nunes, Maria Helena e Aline, à física médica Edna Marina e demais colaboradores, obrigada pela paciência, carinho e gentileza de todos os dias!

- A todos os queridos residentes em Medicina Nuclear e em Física Médica que fizeram parte da minha vida e estiveram presentes em algum momento dessa longa jornada acadêmica, obrigada por terem tornado meus dias mais leves e divertidos! Cada um à sua maneira me ensinou, fortaleceu, tranquilizou e me trouxe até aqui. Muito obrigada! Todos vocês foram e são muito importantes nessa caminhada!

- À diretora do Serviço de Medicina Nuclear, Dr^a. Bárbara Amorim e aos médicos assistentes, Dr^a. Elba Etchebehere, Dr^a. Mariana Lima, Dr. Allan Santos e Dr^a. Ludmila Almeida, meus mais sinceros agradecimentos pelo carinho, atenção e compreensão! Tenho-os como grandes incentivadores e muito os estimo!

- E ao querido amigo e parceiro, físico do Serviço de Medicina Nuclear, Dr. Sérgio Brunetto, sem o qual esse projeto nunca teria saído do papel, a tese seria apenas suposições e as boas ideias apenas ideias. Obrigada por ter abraçado esse desafio com tanto carinho, seriedade, gentileza e afinco. Pela sua inestimável colaboração, Sérgio, serei eternamente grata!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES - Código de Financiamento 001) e financiado pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) de Obesidade e Diabetes, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - 465693/2014-8) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - 2014/50907-5).

RESUMO

A metformina é atualmente o tratamento medicamentoso de primeira linha para o diabetes mellitus tipo 2 (DM2), no entanto, apesar de seu evidente efeito hipoglicemiante, seus mecanismos de ação permanecem em parte desconhecidos e controversos, principalmente quando relacionados ao fígado. Recentemente, observou-se que a droga influencia a captação do radiofármaco ^{18}F -fluordesoxiglicose (^{18}F -FDG) por enterócitos, o que sugere o intestino como potencial alvo terapêutico, no entanto, nenhum estudo anterior avaliou a importância quantitativa do trato gastrointestinal no efeito anti-hiperglicêmico da metformina e qual a inter-relação que se estabeleceria entre o intestino e o fígado neste cenário.

Este trabalho se propôs a investigar o papel da metformina na captação intestinal de glicose e suas consequências sobre a neoglicogênese hepática.

Em pacientes diabéticos e camundongos, o principal local de ação do fármaco foi o intestino, aumentando a captação de glicose, avaliada por PET-CT com ^{18}F -FDG. Em camundongos e células CaCo2, esse aumento resultou da maior expressão de GLUT1 e GLUT2, secundária à ATF4 e AMPK, respectivamente. Na hiperglicemia, houve aumento da produção de lactato (reduzindo o pH e os níveis de bicarbonato na veia porta) e acetato no intestino, modulando a piruvato carboxilase hepática, MPC1/2 e FBP1, o que prejudica a neoglicogênese. Na normoglicemia, o aumento na captação intestinal de glicose induzido pela metformina foi acompanhado por hipoglicemia na veia porta, gerando um mecanismo contrarregulatório que evita reduções ou até aumenta a produção hepática de glicose.

Assim, consideramos que o primeiro local de ação da metformina é o intestino e que novos mecanismos de ação para seu potencial efeito terapêutico podem decorrer do *crosstalk* intestino - fígado, através de metabólitos intestinais que desempenham papel relevante no controle da produção hepática de glicose e, portanto, da hiperglicemia em diabéticos tipo 2.

Palavras-chave: Metformina; Diabetes; *Crosstalk* intestino-fígado; Metabolismo de glicose.

ABSTRACT

Metformin is currently the first-line drug treatment for type 2 diabetes mellitus (DM2), however, despite its evident hypoglycemic effect, its mechanisms of action remain partly unknown and controversial, especially when related to the liver. Recently, it was observed that the drug influences the uptake of the radiopharmaceutical ^{18}F - fluorodeoxyglucose (^{18}F -FDG) by enterocytes, which suggests the intestine as a potential therapeutic target.

This work aimed to investigate the role of metformin in intestinal glucose uptake and its consequences on hepatic gluconeogenesis.

In diabetic patients and mice, the main site of drug action was the intestine, rising glucose uptake, as assessed by PET-CT with ^{18}F -FDG. In mice and CaCo2 cells, this increase resulted from higher expression of GLUT1 and GLUT2, secondary to ATF4 and AMPK, respectively. In hyperglycemia, there was an increase in the production of lactate (reducing pH and bicarbonate levels in the portal vein) and acetate in the intestine, modulating hepatic pyruvate carboxylase, MPC1/2 and FBP1, which impairs gluconeogenesis. In normoglycemia, the rise in intestinal glucose uptake induced by metformin was accompanied by hypoglycemia in the portal vein, generating a counterregulatory mechanism that prevents reductions or even increases the hepatic glucose production.

Thus, we consider that the first site of action of metformin is the intestine and that new mechanisms of action for its potential therapeutic effect may result from the gut-liver crosstalk, through intestinal metabolites that play a relevant role in the control of hepatic glucose production and, therefore, of hyperglycemia in type 2 diabetics.

Keywords: Metformin; Diabetes; Gut-liver crosstalk; Glucose metabolism

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras 1 e 2 – *Galega officinalis*.

Fontes: <https://www.myfriendtheherbalist.com/the-science/metformin-and-goats-rue>
e <https://alchetron.com/Galega-officinalis>..... 24

Figura 3 – Estrutura química da guanidina.

Fonte: National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Guanidine,
CID=3520, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Guanidine>. 25

Figura 4 – Estrutura química da metformina

Fonte: National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Metformin,
CID=4091, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Metformin>. 25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Anticorpos primários e secundários utilizados nas técnicas de imunoprecipitação e *immunoblotting*. 40

Tabela 2. Condições e parâmetros utilizados para análises de metformina em plasma e em matrizes de tecidos através de HPLC-UV. 46

LISTA DE ABREVIATURAS

~ – indicação de valor aproximado

°C – grau Celsius

Δ CT – delta *threshold cycle*. Diferença entre os valores do Ct do gene de interesse e do gene *housekeeping*

μ L – microlitro

μ m – micrômetro

18 F–FDG – 18 F –fluordesoxiglicose

ACTB – código genético para a proteína beta actina (*actin beta*)

ADP – difosfato de adenosina (*adenosine diphosphate*)

AMPK – quinase ativada por AMP (AMP–activated protein kinase)

arGLP–1 – agonistas dos receptores de GLP–1

ATF4 – fator de transcrição ativador 4 (Activating transcription factor 4)

ATP – trifosfato de adenosina (adenosine triphosphate)

B2M – beta–2–microglobulina

BCA – ácido bicinconínico (*bicinchoninic acid*)

Bq – Becquerel

BSA – albumina de soro bovino (*bovine serum albumin*)

CaCo2 – células derivadas de adenocarcinoma colorretal humano

cDNA – DNA complementar

CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CNPEM – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

CO₂ – dióxido de carbono

CT – tomografia computadorizada (*computed tomography*)

ct – *threshold cycle*

D₂O – água deuterada

DAPI – 4'6–diamidino–2–fenilindol

dL – decilitro

DM2 – diabetes mellitus tipo 2

DMAP – 4–dimetilaminopiridina

DMEM – meio de *Eagle* modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DNA – ácido desoxirribonucleico

DP – desvio padrão

DPP–4 – dipeptidil peptidase 4

EDTA – ácido etilenodiamino tetra–acético (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

EMA – Agência Europeia de Medicamentos (*European Medicines Agency*)

FBP1 – gene codificador da frutose bifosfatase–1 (*fructose–bisphosphatase 1*)

FBPase – frutose 1,6 bifosfatase (*fructose 1,6–bisphosphatase*)

FXR – receptor de ácido biliar (*farnesoid X receptor*)
g – gramas
GAPDH – gene codificador da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GIP – polipeptídeo insulínico dependente de glicose (*glucose-dependent insulinotropic polypeptide*)
GLP-1 – peptídeo semelhante ao glucagon-1 (*glucagon-like peptide-1*)
GLUT – transportador de glicose (*glucose transporter*)
GlyTT – teste de tolerância ao glicerol (*glycerol tolerance test*)
GTT – teste de tolerância à glicose (*glucose tolerance test*)
h – hora
H₂O – água
HCl – ácido clorídrico
HCO₃⁻ – íon bicarbonato
HPLC-UV – cromatografia líquida de alta performance com detector ultra violeta (*high-performance liquid chromatography-ultraviolet*)
Huh7 – células derivadas de carcinoma hepatocelular humano
iDPP-4 – inibidor da dipeptidil peptidase 4
IP – intraperitoneal
IRS1/2 – substratos 1 e 2 do receptor de insulina (*insulin receptor substrate-1/2*)
iSGLT-2 – inibidor do cotransportador 2 de sódio e glicose
K – Kelvin
KCl – cloreto de potássio
kDa – quiloDalton
KH₂PO₄ – Dihidrogênio fosfato de potássio
KO – *knockout*
kV – quilovoltagem
LaCTAD – Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida
LKB1 – quinase hepática B1 (*liver kinase B1*)
LNBio – Laboratório Nacional de Biociências
LPS – lipopolissacarídeo
mAs – miliamperagem por segundo
MBq – MegaBecquerel
mCi – milicurie
mg – miligramas
mGPD – glicerolfosfato desidrogenase mitocondrial (*mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase*)
MHz – megahertz
min – minutos
mL – mililitro
mm – milímetros
mM – milimolar

MPC1/2 – carreador de piruvato mitocondrial 1 e 2 (*mitochondrial pyruvate carrier 1/2*)
mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro
Na₂KPO₄ – fosfato de potássio dissódico
NaCl – cloreto de sódio
NADH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo + Hidrogênio (*nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) + hydrogen (H)*)
ng – nanogramas
nm – nanômetro
PBS – solução salina fosfatada (*phosphate-buffered saline*)
PC – piruvato carboxilase
PEN2 – *presenilin enhancer 2*
PET/CT – tomografia por emissão de pósitron associada à tomografia computadorizada (*positron emission tomography-computed tomography*)
pH – potencial hidrogeniônico (*potential of hydrogen*)
PHG – produção hepática de glicose
PI – padrão interno
pmol – picomol
PPAR-γ – receptor gama ativado por proliferador de peroxissomo (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*)
ppm – partes por milhão
PTT – teste de tolerância ao piruvato (*pyruvate tolerance test*)
RF – radiofrequência
RMN – ressonância magnética nuclear (NMR- *nuclear magnetic resonance*)
RNA – ácido ribonucléico
ROI – região de interesse (*region of interest*)
RPM – rotações por minuto
RT-PCR – reação em cadeia da polimerase em tempo real (*real-time polymerase chain reaction*)
s – segundos
SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*)
SGLT-2 – cotransportador 2 de sódio e glicose (*sodium-glucose cotransporter-2*)
siRNA – RNA interferente pequeno (*small interfering RNA*)
SLC2A1 – gene codificador do GLUT1 (*solute carrier family 2 member 1*)
SUV – valor padronizado de captação (*standardized uptake value*)
TGR5 – receptor tipo membrana para ácidos biliares (*G protein-coupled bile acid receptor*)
TMSPd4 – trimetilsililpropionato de sódio
Tris base – tris (hidroximetil) aminometano
V – volt
VLDL – lipoproteína de densidade muito baixa (*very low density lipoprotein*)
vs – *versus*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Epidemiologia do diabetes mellitus tipo 2	20
1.2. Terapia farmacológica para DM2	21
1.3. Metformina.....	23
Metformina e fígado	25
Metformina e intestino	27
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS.....	32
3.1. Geral	32
3.2. Específicos	32
4- METODOLOGIA.....	33
4.1. Materiais.....	33
Animais.....	33
Humanos	33
4.2. Protocolo de Administração de Metformina	33
Animais.....	33
Humanos	34
4.3. PET/CT ¹⁸ F-FDG (Tomografia por emissão de pósitrons associada à tomografia computadorizada com ¹⁸ F-Fluordesoxiglicose)	35
Humanos	35
Animais.....	35
Método.....	36
4.4. Ensaios	36
Teste de Tolerância à Glicose (GTT)	37
Teste de Tolerância ao Piruvato (PTT)	37
Teste de tolerância ao glicerol (GlyTT).....	37
Gasometria	37
ELISA (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>).....	37
4.5. Extração de tecidos.....	38
4.6. Proteínas totais para imunoprecipitação e <i>immunoblotting</i>	38

4.7. Imunoprecipitação.....	38
4.8. Análise de proteínas por <i>Immunoblotting</i>	39
4.9. PCR em tempo real (RT-PCR)	41
4.10. Microscopia Confocal	42
4.11. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) - Espectroscopia de ¹ H e ¹³ C pós-injeção de ¹³ C-piruvato	43
Administração de ¹³ C-piruvato e extração dos tecidos.....	43
Preparação de amostras e aquisição de espectros.....	43
Quantificação de metabólitos	44
4.12. Cromatografia.....	44
Produtos químicos e reagentes.....	44
Amostras de soro e tecidos.....	45
Análise por HPLC	45
Preparação de soluções estoque, padrões de calibração e amostras biológicas.....	47
4.13. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) - Metabolômica	48
Preparação de amostras e aquisição de espectros.....	48
Quantificação de metabólitos	49
4.14. Cultura de células	49
Utilização e produção de glicose pelas células	50
4.15. Transfecção.....	50
4.16. Análise Estatística	51
5. RESULTADOS	52
6. CONCLUSÕES	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
8. APÊNDICE	84
9. ANEXOS.....	86

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia do diabetes mellitus tipo 2

Durante as últimas décadas, a incidência de obesidade bem como de doenças metabólicas a ela associadas como cardiopatias, dislipidemia, hipertensão arterial e, em especial, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) têm alcançado proporções epidêmicas em várias partes do mundo, sobretudo em países da civilização ocidental, onde elevados índices de sedentarismo são predominantes e os hábitos alimentares se caracterizam, cada vez mais, pelo consumo de alimentos de alta densidade energética, provenientes principalmente de lipídios, e pobre em micronutrientes (1-3).

As crescentes estatísticas mundiais sobre o estabelecimento do DM2 permitem classificá-lo como uma das doenças crônicas de mais rápido crescimento e um dos mais desafiadores problemas de saúde pública do século 21. Agravando esse quadro, o DM2, que há tempos restringia-se a adultos, acomete cada vez mais crianças e jovens (4), em decorrência, principalmente dos padrões comportamentais e dietéticos explicitados acima.

O diabetes mellitus tipo 2 é caracterizado por hiperglicemia, resistência à insulina e deficiência relativa na secreção deste hormônio. Embora sua patogênese seja apenas parcialmente compreendida, sabe-se que é heterogênea e tanto os fatores genéticos que afetam a liberação e responsividade à insulina quanto os fatores ambientais, como a obesidade, anteriormente citada, são importantes para seu estabelecimento (5).

Estima-se hoje que mais de meio bilhão de pessoas (aproximadamente 537 milhões) estejam vivendo com DM2, o que representa 10,5% da população mundial entre 20 e 79 anos e são alarmantes as estimativas para 2030 e 2045: 643 milhões e 783 milhões respectivamente, dado último que representa um aumento de 46% com base no ano de 2021 (6).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, as complicações decorrentes do DM2 tais como coronariopatias, doenças vasculares periféricas, isquemias, neuropatias, amputações, falência renal, cegueira e, incluída recentemente, a depressão, resultam em invalidez, diminuição da qualidade e expectativa de vidas e dispendiosos gastos para a sociedade, permitindo assim classificar o DM2, dentre as doenças crônicas não transmissíveis, como a quarta maior causa de mortes no mundo (7).

Estima-se que em 2021, cerca de 42,9 bilhões de dólares foram empregados no tratamento de diabéticos tipo 2 no Brasil, o que o posiciona como o terceiro país no mundo com mais gastos relacionados à doença (6). É de se considerar, portanto, o grave impacto socioeconômico inerente ao DM2, ao afetar famílias, crianças e jovens, serviços de saúde e as produtividades individual e nacional.

1.2. Terapia farmacológica para DM2

A adoção de uma vida saudável com o consumo de dieta pobre em carboidratos e gordura saturada, prática regular de atividade física, moderação no uso de álcool e diminuição do tabagismo constitui a base do tratamento do diabetes e do controle da glicemia (8). O autocuidado exige, portanto, do paciente, e conseqüentemente da família, mudanças por vezes drásticas no estilo de vida, o que dificulta e ocasionalmente impede a adesão ao tratamento.

Os antidiabéticos orais constituem a primeira escolha para a terapêutica do DM2 não responsivo a medidas não farmacológicas isoladas, uma vez que promovem, com controle glicêmico estrito, redução na incidência de complicações cardiovasculares, principal causa de morte em indivíduos com DM2, tem boa aceitação pelos pacientes, simplicidade de prescrição e administração (9) e no Brasil, de modo particular, são em parte disponibilizados gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde, portanto, de fácil acessibilidade.

Existe atualmente uma extensa gama de antidiabéticos orais para tratar a hiperglicemia do DM2, com eficácia demonstrada e segurança cardiovascular estabelecida. As principais classes são heterogêneas em seus modos de ação, perfis de segurança e tolerabilidade e incluem os agentes que estimulam a secreção de insulina (sulfonilureias e secretagogos de ação rápida), reduzem a produção hepática de glicose e aumentam a sensibilidade à insulina (biguanidas), apenas aumentam a sensibilidade à insulina (tiazolidinedionas) ou retardam a digestão e absorção intestinal de carboidratos (inibidores da α -glicosidase) (10, 11).

A partir de 2007, foram disponibilizadas mais três classes terapêuticas de fármacos antidiabéticos aprovados pela EMA (*European Medicines Agency*) que vieram se somar às alternativas de tratamento e prevenção das complicações do DM2, diminuindo o

ganho de peso e, dependendo do fármaco, as taxas de mortalidade cardiovascular: os inibidores do cotransportador 2 de sódio e glicose (iSGLT-2) e os denominados incretinomiméticos, que incluem os inibidores da dipeptidil peptidase 4 (iDPP4) e agonistas dos receptores do GLP-1 (*glucagon-like peptide-1* - arGLP-1), os últimos com administração subcutânea, além da formulação oral. Enquanto os primeiros impedem a reabsorção de glicose nos túbulos primários do néfron, os arGLP-1, entre outros efeitos, estimulam a secreção de insulina dependente de glicose, melhoram a função da célula beta e retardam o esvaziamento gástrico, aumentando a saciedade. Os inibidores da DPP-4, por sua vez, são uma classe de medicamentos que inibem a enzima DPP-4 a qual desativa entre outros peptídeos bioativos, o polipeptídeo gastrointestinal insulínico (GIP) e o GLP-1, impedindo a degradação e aumentando os níveis plasmáticos dos mesmos (12, 13). Em comparação com os iSGLT2 e arGLP-1, apresentam eficácia mediana e apesar da comprovada segurança cardiovascular, não reduzem mortalidade.

As opções de tratamento são prudentes e flexíveis, no entanto, precisam ser individualizadas de acordo com as características clínicas do paciente, remetendo à experiência do profissional médico sobre o fármaco mais adequado, risco de hipoglicemia, tolerabilidade, efeitos adversos, objetivos metabólicos e os custos. Isso reflete cada vez mais uma mudança de paradigma para a individualização da terapêutica (12, 13).

Na terapia farmacológica do DM2, destaca-se o cloridrato de metformina, fármaco da classe das biguanidas, conhecido comercialmente como Glifage®, Glifage XR®, Glucoformin® e Dimefor®, pois desde sua implantação continua sendo uma droga barata, acessível, praticamente sem efeitos adversos importantes e muito eficaz no controle glicêmico do DM2, que se dá sem aumento na secreção de insulina, ganho de peso e risco de hipoglicemia (14, 15), representando, nestes casos, vantagens frente a outras drogas antidiabéticas como as sulfanilureias e as tiazolinedionas (11). A metformina também está associada ao menor risco de infarto do miocárdio (16), mortalidade por todas as causas, incluindo as cardiovasculares (17) se comparada às sulfoniluréias, mas não às tiazolinedionas (16), efeitos possivelmente decorrentes de uma ação antiaterogênica do medicamento (18).

Assim, desde sua implantação na Europa a partir de 1957, no Brasil a partir dos anos 90 e depois nos Estados Unidos, a metformina tornou-se o tratamento de primeira linha para o DM2, sozinha ou em combinação com outros agentes anti-hiperglicêmicos (19)

e mesmo sendo prescrita há mais de 65 anos, seus mecanismos de ação ainda permanecem incertos.

1.3. Metformina

A *Galega officinalis* é uma espécie vegetal conhecida no Brasil como *Arruda de bode* e no mundo como *French Lilac* ou *Italian fitch* (Fig. 1 e 2). Foi utilizada na Europa por séculos, desde a idade média, para aliviar a poliúria, sintoma clássico de diabetes mellitus descompensado, diminuindo a glicemia. A descoberta de que a erva era rica em guanidina levou à introdução de várias drogas hipoglicemiantes derivadas deste composto na década de 1920. (10, 20, 21). No entanto, devido ao surgimento e ampla disponibilização da insulinoterapia, o potencial terapêutico desses primeiros agentes antidiabéticos foi praticamente ignorado até o final da década de 50, quando três biguanidas foram relatadas: metformina, fenformina e buformina (10).

Enquanto as duas primeiras foram introduzidas no mercado europeu em 1957, a buformina foi lançada no ano seguinte, mas recebeu uso limitado em poucos países. A fenformina, por sua vez foi retirada de circulação no início dos anos 70 devido à alta incidência de acidose láctica e risco de morte, deixando a metformina como a principal biguanida antidiabética disponível no mercado (10, 19).

Desde então, a metformina é o hipoglicemiante oral mais amplamente prescrito, classificado ainda hoje como “sensibilizador de insulina” no manejo terapêutico do diabetes tipo 2 (22). Entre os antidiabéticos orais, de modo usual, é a primeira escolha no tratamento do indivíduo obeso com DM2 (11). Provém da união de duas moléculas de guanidina (Fig. 3) com a eliminação do amônio e é conhecida quimicamente como monoclóridato de 1,1-dimetilbiguanida (Fig. 4). A substituição de dois átomos de hidrogênio por grupos metil aumenta a estabilidade metabólica do fármaco, evitando-se a formação de compostos potencialmente perigosos para o organismo (23).

Após administração oral, a metformina é lenta e predominantemente absorvida no intestino delgado. Sua biodisponibilidade foi estimada em aproximadamente 50-60%, com uma meia-vida plasmática de 1,5 a 4h variando de modo intra e interpessoal (24).

A ampla utilização do fármaco está associada não apenas a um risco muito baixo de acidose metabólica (~ 3-10 por 100.000 pacientes por ano), como também a prognósticos cardiovasculares favoráveis (25, 26), diminuindo os índices de infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (27), por exemplo, além de ter baixo custo no mercado (pela ausência de patente) e poucas contraindicações, a mais comum delas, insuficiência renal (creatinina sérica > 1,4 mg/dL) (10, 22). No Brasil, sua prescrição é ainda mais favorecida por se tratar de um medicamento gratuitamente fornecido pelo Sistema Único de Saúde.

A metformina é considerada também uma droga bem tolerada. Os efeitos adversos mais frequentes (10 a 30% dos pacientes) são gastrointestinais, como náusea, diarreia, desconforto abdominal, disgeusia e anorexia, o último sendo desejável em regimes de emagrecimento. No entanto, os efeitos colaterais ocorrem com mais frequência durante o início da terapia e se resolvem espontaneamente na maioria dos casos. Raramente também, pode haver diminuição da absorção da vitamina B12 e ácido fólico, levando a alterações hematológicas (10, 11, 22, 28).

Porém, apesar de décadas de sucesso no uso clínico para o tratamento do DM2, bem como do avanço em técnicas bioquímicas e moleculares, os mecanismos de ação da metformina permanecem pouco compreendidos e também controversos.



Figuras 1 e 2 – *Galega officinalis*.

Fontes: <https://www.myfriendtheherbalist.com/the-science/metformin-and-goats-rue> (acesso em 24/06/2023) e <https://alchetron.com/Galega-officinalis> (acesso em 24/06/2023).

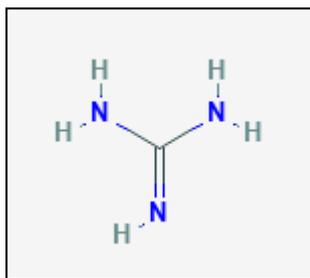


Figura 3 – Estrutura química da guanidina.

Fonte: National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Guanidine, CID=3520, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Guanidine> (acesso em 19/04/2020).

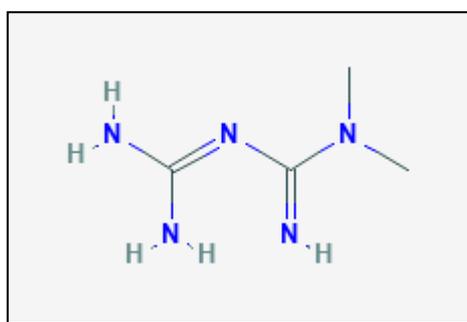


Figura 4 – Estrutura química da metformina.

Fonte: National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Metformin, CID=4091, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Metformin> (acesso em 19/04/2020).

Não obstante o fígado seja historicamente o órgão alvo mais estudado na ação da metformina, há dados *in vitro* sugerindo que a droga atua junto a uma variedade de órgãos e tecidos afetados pela resistência à insulina e hiperinsulinemia, inibindo a lipólise no tecido adiposo, o que reduz os ácidos graxos livres circulantes e diminui a produção de VLDL, estimulando a captação de glicose e a síntese de glicogênio por aumentar a sensibilidade à insulina nos músculos esqueléticos e atuando também no endotélio e ovários (21, 29, 30).

Metformina e fígado

A metformina reduz a produção hepática de glicose (PHG) em até 75% em pacientes com DM2 (19), no entanto, no fígado, seus efeitos sobre a glicogenólise e a neoglicogênese continuam controversos. Enquanto alguns estudos indicam que o fármaco

atua principalmente reduzindo as taxas de neoglicogênese (31); outros afirmam que as taxas de glicogenólise é que são impactadas (14, 32).

O primeiro mecanismo identificado para a supressão aguda da neoglicogênese hepática, em meados dos anos 50, foi a inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial (NADH: ubiquinona oxireductase), que indiretamente ativa a quinase ativada por AMP (AMPK) através de uma diminuição da carga energética intracelular (aumento na relação [AMP]:[ADP] e/ou [ADP]:[ATP] (33-35). Posteriormente, descobriu-se que a ativação da AMPK pode decorrer também por um mecanismo direto, através de sua enzima precursora, LKB1, levando ambas as vias, direta e indireta, à redução da transcrição de genes neoglicogênicos (34, 36, 37) e lipogênicos e à inibição direta de enzimas-chave para o processo, como a fosfo-enol-piruvato-carboxiquinase, a frutose-1,6-bifosfatase e a glicose-6-fosfatase (22). Entretanto, estudos celulares com altas concentrações em milimolares de metformina mostrando redução substancial da neoglicogênese e de ATP intracelular são agora repensados quanto à sua relevância, uma vez que na terapia antidiabética, a concentração plasmática da droga encontra-se em níveis micromolares, além de não ser observada substancial diminuição nos níveis celulares de ATP (38, 39).

Outros efeitos da metformina no fígado também tem sido descritos, como a diminuição de substratos hepáticos para a reação em cadeia da neoglicogênese, a aumentada fosforilação do receptor de insulina bem como de seus substratos (IRS1 e 2) nos hepatócitos, o que favorece a sensibilidade ao hormônio (40-45), a supressão da atividade da adenilato ciclase, prejudicando a sinalização do glucagon e, mais recentemente, a inibição da enzima glicerolfosfato desidrogenase mitocondrial (mGPD) (19), resultando em um estado redox hepatocelular alterado, conversão reduzida de lactato e glicerol em glicose e diminuição da neoglicogênese hepática (46).

Sabe-se ainda que a metformina estimula a utilização de glicose pelo fígado e a glicólise por ativar enzimas como a hexoquinase e a piruvato quinase (41-45, 47, 48). No entanto, face ao exposto, embora vias hepáticas clássicas sobre seus possíveis mecanismos de ação ainda sejam mais exploradas, e, portanto, mais conhecidas em estudos pré-clínicos, há lacunas na maioria delas. Os mecanismos pelos quais a metformina melhora o controle glicêmico no DM2 são, portanto, complexos e ainda pouco elucidados (19).

Destaca-se, neste contexto, a aparente dependência dos efeitos da metformina no metabolismo da glicose ao estado glicêmico inicial. Segundo McCreight *et al.*, o fármaco

aumenta o *clearance* da glicose, o que resulta em aumento da PHG no indivíduo saudável e contrasta com a redução desta via metabólica em diabéticos com mau controle da glicemia (49). Em concordância, embora estudos demonstrem reduções consideráveis na PHG (15-25%) após tratamento com metformina em indivíduos com mau controle glicêmico (14, 15, 50), este não foi um achado consistente (51). Na verdade, a droga apenas reduz a PHG marginalmente (~ 5%) e não em uma extensão que possa explicar a diminuição concomitante na glicemia de jejum (52), podendo até mesmo aumentar a PHG (53).

Metformina e intestino

Considerando o papel fundamental do trato gastrointestinal na homeostase glicêmica e as ações pleiotrópicas da metformina em vários de seus órgãos, atualmente o intestino tem tido papel de destaque nesse contexto, representando tão importante sítio de ação quanto o fígado no manejo do DM2. Sabe-se, inclusive que enquanto a metformina se acumula no útero em concentrações até 10 vezes maiores que no plasma (54), na mucosa do intestino delgado esse acúmulo é 300 vezes superior (55). A importância das ações gastrointestinais da metformina é refletida também pelo fato de que a redução da glicemia é substancialmente mais efetiva após sua administração oral do que intravenosa, apesar de ambas as vias atingirem concentrações plasmáticas comparáveis (56).

Tanto em roedores quanto em humanos, tem-se demonstrado que a metformina induz consistentemente o aumento das concentrações plasmáticas de GLP-1, que como já em parte mencionado, possui a capacidade de melhorar a glicemia em diabéticos tipo 2 através de ações diversas, incluindo efeitos sobre as sinalizações da insulina e do glucagon dependentes de glicose, inibindo a neoglicogênese hepática, diminuindo a ingestão alimentar e retardando o esvaziamento gástrico (57), o que representaria mecanismo adicional para diminuir a glicemia pós-prandial (58). Diferentemente de inibidores de DPP-4, que elevam os níveis plasmáticos de GLP-1 principalmente por impedir sua degradação (57), o aumento desse hormônio após administração de metformina é claramente um reflexo do estímulo à secreção do mesmo (59, 60). Além disso, existem evidências pré-clínicas de que a metformina pode melhorar a expressão do receptor de GLP-1 nas células β pancreáticas através de uma ação direta no PPAR- α , potencializando nelas a sinalização do hormônio (61).

Importante ressaltar que o GLP-1 é sintetizado pelas células L enteroendócrinas localizadas predominantemente no íleo e cólon (62), portanto, o intestino distal pode ser mais relevante para o efeito terapêutico de metformina, embora aproximadamente 50% do fármaco seja absorvido no intestino proximal (63). Este conceito é apoiado pela observação de que o tratamento de 12 semanas com metformina de liberação lenta, com uma biodisponibilidade sistêmica muito menor e, portanto, maior exposição no intestino distal do que a metformina de liberação imediata e prolongada, resulta em uma melhora mais importante na glicemia de jejum do que as duas últimas formulações promovem (64). Além disso, o controle glicêmico mais eficaz com liberação tardia da metformina em pacientes com diabetes tipo 2 foi associado ao aumento da secreção de GLP-1 em jejum e pós-prandial, bem como do peptídeo YY, de função anorexigênica (65).

Outra ação gastrointestinal da metformina se refere à inibição da reabsorção de ácidos biliares pelo sistema porta. Esse efeito, comum às biguanidas em geral, é reconhecido desde a década de 1970 (66) e atribuível à supressão do transporte ativo nos enterócitos do íleo (66, 67). O resultante aumento da concentração de ácidos biliares no intestino e da consequente excreção fecal favorece a síntese dos mesmos a partir do colesterol, reduzindo, portanto a colesterolemia (68, 69). Por outro lado, existem agora evidências convincentes de que os ácidos biliares podem, *per se*, funcionar como moléculas sinalizadoras na regulação da homeostase glicêmica (70). Sabe-se, por exemplo, que pacientes com colecistectomia prévia não secretam substancialmente bile após as refeições e exibem glicemias pós-prandiais superiores às de indivíduos controles (71). Consoante a isso, o fluxo desviado da bile tem sido sugerido como um mecanismo pelo qual a cirurgia de *bypass* gástrico melhora o DM2, estimulando como consequência da sinalização intracelular de ácidos biliares a secreção de GLP-1 e insulina, por exemplo (72-74).

Nesse contexto, os ácidos biliares são ligantes do receptor nuclear FXR e do receptor de membrana TGR5, ambos expressos abundantemente no intestino, fígado, músculo esquelético e pâncreas (70). Estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a ativação do FXR melhora a tolerância à glicose aumentando a síntese de glicogênio e a sensibilidade à insulina e inibindo a neoglicogênese (75) e que TGR5, expresso em células L enteroendócrinas no intestino delgado e grosso, quando ativado, estimula a secreção de GLP-1(76).

Duca *et al.* demonstraram que a infusão intraduodenal de metformina aumentou neste local a fosforilação da AMPK, molécula chave para sua ação hipoglicemiante, e reduziu a PHG em um modelo de resistência à insulina induzida por dieta hiperlipídica. Em contrapartida, a inibição molecular e química da AMPK duodenal anulou este efeito (77). Muito recentemente também, Ma *et al.* demonstraram que a metformina em baixa dose tem como alvo a AMPK lisossômica via PEN2, mas apenas PEN2 nocaute específico do intestino prejudica os efeitos redutores da glicemia via metformina (78).

Muitos estudos tem avaliado o efeito da metformina na absorção intestinal de glicose. Enquanto a droga *in vitro* pode reduzir a produção de ATP pelos enterócitos, levando à redução da atividade de cotransportadores de glicose dependentes de sódio tipo 1 (SGLT1), há um aumento na expressão de GLUT2 na borda em escova do jejuno de ratos, através da ativação de AMPK (79). Em ratos, a administração de metformina em dose terapêutica (125 mg/Kg, duas vezes ao dia) por três dias foi associada ao aumento de SGLT1 no duodeno e jejuno e GLUT5 apenas no jejuno, mas não de GLUT2 ao longo do intestino delgado (80). Por outro lado, em pacientes com DM2, a administração de metformina (850 mg duas vezes ao dia) por 4 ou 7 dias diminuiu modestamente a absorção de glicose no intestino delgado, embora ainda não esteja claro se esse efeito está relacionado à atividade ou expressão reduzidas de transportadores de membrana (81).

Nesse contexto, em diabéticos tipo 2, a metformina demonstrou aumentar no intestino grosso e, em menor grau, no delgado, a captação, a partir da circulação mesentérica, do radiofármaco ^{18}F -fluorodeoxiglicose (^{18}F -FDG), um análogo radioativo de glicose administrado intravenosamente em exames de PET/CT para imagens funcionais de órgãos e tecidos (82). O aumento da captação intestinal de ^{18}F -FDG induzido pela metformina indica uma atividade metabólica mais intensa nos enterócitos e, embora seja um fenômeno conhecido há décadas em Medicina Nuclear, até hoje nenhuma justificativa foi fornecida com convicção. Gontier *et al.* (82) relataram que se trata tipicamente de uma captação intensa e difusa, o que pode mascarar lesões intestinais malignas e levar a resultados falso-negativos. Por esta razão, pacientes que consomem metformina são orientados a suspender o uso por 48 horas antes da realização de exames PET/CT (83).

Estudos recentes mudaram o paradigma na etiopatogênese e progressão de distúrbios metabólicos, incluindo obesidade e diabetes tipo 2, indicando que além dos fatores genéticos e ambientais, a microbiota intestinal pode também ter um papel relevante

no desencadeamento dos mesmos (84-88) ao atuar na homeostase do hospedeiro (85), aquisição de nutrientes, proteção contra patógenos, promoção da maturação do sistema imune intestinal (86, 88), além de modular genes do hospedeiro que regulam a forma como a energia obtida dos alimentos é consumida ou estocada (88).

Pesquisas crescentes em animais (89) e humanos (90) sugerem que alguns efeitos benéficos da metformina no metabolismo da glicose podem ser mediados microbianamente (91). Em conjunto, tais observações estabelecem o novo conceito de que a metformina pode exercer efeitos metabólicos benéficos pela interação com a microbiota intestinal e é o único medicamento antidiabético até agora reconhecido por essa capacidade (91). No entanto, ainda não está claro de que forma isso ocorre, devido aos resultados inconclusivos dos estudos. (92)

Face ao exposto, com o reconhecimento crescente de que a regulação da função gastrointestinal é essencial para a homeostase glicêmica, uma proporção considerável dos benefícios metabólicos da metformina talvez possa ser atribuída aos seus efeitos neste sistema, tanto na absorção e utilização intestinal de glicose, bem como em vários novos alvos, incluindo incretinas, transportadores de sais biliares e microbiota intestinal (19).

2. JUSTIFICATIVA

São crescentes as evidências pré-clínicas e clínicas apontando para uma importante contribuição do trato gastrointestinal na ação antidiabética da metformina, que embora seja o fármaco mais amplamente prescrito no mundo no combate ao DM2, atua através de mecanismos ainda pouco compreendidos, sobretudo em órgãos alvo diferentes do fígado.

Os estudos envolvendo a droga são controversos, em sua maioria realizados com altas doses em cultura de células ou doses variáveis em modelos animais, incondizentes muitas vezes com a posologia empregada na prática clínica. Além disso, contesta-se a influência da metformina sobre a PHG na dependência dos níveis glicêmicos, estimulando-a ou inibindo-a, ao mesmo tempo em que é consistente e inquestionável a demonstração em humanos de que a droga aumenta a captação intestinal de glicose.

Deste modo, para reconciliar tais questionamentos e possíveis ações farmacológicas, julgamos essencial a investigação dos mecanismos de ação da metformina, refinando os alvos terapêuticos deste medicamento, o que implicará num conhecimento mais profundo das vias metabólicas envolvidas, além de descortinar novas possibilidades de estudos de medicamentos enterais para o tratamento de doenças metabólicas.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

O principal objetivo do presente trabalho é investigar os efeitos da metformina sobre a captação intestinal de glicose e o consequente impacto sobre a PHG, que contribuiriam para a diminuição da glicemia induzida pelo fármaco e caracterizariam um novo possível mecanismo de ação, relacionado, portanto, a um *crossstalk* metabólico entre intestino e fígado, nunca antes descrito com essa finalidade terapêutica.

3.2. Específicos

3.2.1. Avaliar os efeitos *in loco* da metformina sobre a expressão de transportadores de glicose e o metabolismo glicolítico de enterócitos de íleo e cólon através de cultura de células, análises histológicas, metabolômicas, cromatográficas, eletroforéticas e imagens funcionais de PET/CT com ^{18}F -FDG.

3.2.2. Investigar a ação da metformina na modulação da cascata de sinalização intracelular referente à neoglicogênese hepática através da quantificação da expressão e/ou fosforilação de proteínas envolvidas nesta via ou dos fatores intestinais que a modulam.

4- METODOLOGIA

4.1. Materiais

Animais

Os procedimentos com os animais foram aprovados e realizados de acordo com as diretrizes da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (CEUA/UNICAMP), através dos pareceres consubstanciados número 4437-1 A e B (ANEXO 1). Camundongos machos *Swiss*, C57BL6/J e B6.129-Prkaa2tm1.1Vio/Orl (AMPK alpha2 KO) e ratos machos *Wistar* foram fornecidos com 8 semanas de vida pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp (Campinas, Brasil). Foram mantidos em biotério, sob condições livres de patógenos específicos em regime de ciclos de 12h escuro, 12h claro, temperatura ambiente de 21°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), umidade 40 a 60%, com acesso à comida e água *ad libitum* e submetidos à dieta hiperlipídica (55% de calorias derivadas de gordura, 29% de carboidratos e 16% de proteínas – apêndice I) por 8 semanas para induzir obesidade, resistência à insulina e intolerância à glicose (grupos HFD) ou à ração padrão (grupos CTL).

Humanos

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (CEP/UNICAMP), através do parecer consubstanciado número 4.484.871 (ANEXO 2), e está inscrito na Plataforma Brasil sob o registro CAAE 38906820.9.0000.5404.

4.2. Protocolo de Administração de Metformina

Animais

A metformina utilizada para tratar os animais compunha-se somente de seu princípio ativo (sem excipientes) e foi adquirida da Botica Ouro da Mata

(<https://www.boticaourodamata.com.br>), localizada na Rua Doutor Quirino, 1420 – CEP: 13015-082 – Campina- SP- Brasil.

Camundongos

A metformina foi diluída na água do bebedouro por 10 dias em uma dosagem de 444 mg/Kg, que corresponde a 36 mg/Kg para um adulto de 70 Kg, de acordo com a área de superfície corporal (93) e, portanto a uma dose final de 2,5g por dia. Além disso, 2 horas antes de todos os experimentos, o fármaco também foi administrado por gavagem, utilizando-se a mesma dosagem.

O tratamento com metformina em baixa dose - 50 mg/Kg - foi realizado apenas por gavagem, o que equivale à concentração plasmática em humanos fazendo uso de 2g/dia de metformina.

Os animais submetidos a ambos os tratamentos integraram o grupo MET, enquanto aqueles que receberam apenas uma solução veículo (água), pelas mesmas vias de administração, compuseram o grupo HFD.

Ratos

A metformina foi diluída na água do bebedouro por 10 dias e 2 horas antes de todos os experimentos o fármaco foi administrado por gavagem em uma dosagem final de 250 mg/Kg (grupo MET), que também corresponde a uma dose de 36mg/Kg para um adulto. O grupo HFD recebeu apenas uma solução veículo (água).

Humanos

Pacientes

Utilizavam o princípio ativo cloridrato de metformina presente nas variadas apresentações comerciais.

Voluntários

Foram tratados com metformina proveniente da EMS SIGMA PHARMA (CNPJ: 57.507.378/0001-01), duas vezes ao dia (1g logo após o café da manhã e 1g após o jantar), por 5 dias consecutivos.

4.3. PET/CT ^{18}F -FDG (Tomografia por emissão de pósitrons associada à tomografia computadorizada com ^{18}F -Fluordesoxiglicose)

Humanos

Pacientes

Os dados referentes à análise das imagens de PET/CT adquiridas em pacientes foram coletados a partir do banco de dados do Serviço de Medicina Nuclear do Hospital de Clínicas da Unicamp. Indivíduos do grupo controle estavam sob medicação por suas respectivas morbididades, mas nenhum tomava metformina (grupo CTL). Os diabéticos em uso de outros hipoglicemiantes orais que não metformina integraram o grupo DM e pacientes em uso de metformina que também utilizavam medicação para suas respectivas doenças compuseram o grupo MET. O radiofármaco ^{18}F -FDG foi injetado em uma veia do braço dos pacientes que se encontravam em jejum mínimo de 6 horas. Para cada um, a dose de ^{18}F -FDG (na unidade mCi) foi calculada utilizando-se o peso (Kg) multiplicado por 0,12 (mCi/Kg).

Voluntários

Após 5 dias de utilização de metformina (2g/dia), os participantes voluntários deste trabalho compareceram ao Serviço de Medicina Nuclear para a realização do exame PET/CT. A injeção do radiofármaco ^{18}F -FDG seguiu as mesmas etapas acima descritas. Todos os voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas (ANEXO 3).

Animais

Camundongos

Os animais ficaram em jejum por 6 horas antes do PET/CT. Para uma injeção precisa de ^{18}F -FDG e aquisição de imagens, os camundongos foram anestesiados por meio de injeção intraperitoneal de Cetamina (100 mg/Kg) e Xilazina (10 mg/Kg). 37MBq (1 mCi) de ^{18}F -FDG (em aproximadamente 0,1 mL de solução de NaCl 0,9%) foi injetado via veia caudal.

Método

A atividade radioativa foi medida antes e após a administração intravenosa do radiofármaco para verificar a dose líquida administrada. Sessenta minutos após a injeção de ^{18}F -FDG, cada paciente ou animal foi submetido a imagens de PET/CT (respectivamente, em decúbito dorsal e ventral). Os exames foram realizados em equipamento PET/CT (Siemens Biograph True-Point mCT 40, Siemens Medical Solutions Inc., Knoxville, Tennessee, EUA). Uma imagem de CT foi adquirida para fins de correção de atenuação. As condições de aquisição de CT para os animais foram definidas para 70 kV, 155 mA e espessura de corte de 0,5 mm. Um único *bed* foi escaneado por 15 minutos da cabeça à cauda. O modelo de reconstrução tridimensional usado para análise foi: OSEM 3D com 24 *subsets* e 2 iterações.

Os parâmetros de aquisição para humanos foram definidos para 120–140 kV, 120 mA e espessura de corte de 2.1 mm. *Beds* em número variável (a depender do protocolo de exame utilizado) foram adquiridos por 1,5 minutos. O modelo de reconstrução tridimensional utilizado foi: OSEM 3D com 21 *subsets* e 2 iterações.

As imagens PET e CT de humanos e animais foram então fundidas através do *software True D* (Siemens). As regiões de interesse (ROI) foram traçadas pelo método semiquantitativo (*Isocontour*), determinando a captação máxima de ^{18}F -FDG (SUV_{max} - valor padronizado de captação) no intestino e em outros tecidos. SUV é definido como $(A \cdot W) / A_{\text{inj}}$, onde A (Bq/mL) é a radioatividade medida em um ROI, W (g) é o peso do paciente ou animal e A_{inj} (Bq) é a atividade do ^{18}F -FDG injetado. O SUV_{max} é mais preciso para estimar o verdadeiro SUV do que a média do SUV para esse tipo de análise.

4.4. Ensaios

Teste de Tolerância à Glicose (GTT)

Os testes de tolerância à glicose foram realizados em camundongos em jejum *overnight* de 6 horas. A partir da veia caudal, foram aferidas as glicemias de jejum (0 min) e após 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min da administração intraperitoneal (IP) de solução de glicose (Sigma-Aldrich – código G-6152) a 20% na dose de 1,0 g/Kg de peso corporal.

Teste de Tolerância ao Piruvato (PTT)

Para o teste de tolerância ao piruvato, como medida indireta da produção de glicose hepática, os camundongos ficaram em jejum *overnight* por 12 horas seguido de injeção IP de solução de piruvato de sódio (ReagentPlus®, Sigma-Aldrich – código P-2256; 0,454 g/mL PBS - pH 7,4) na dose de 1,5 g/Kg de peso corporal. O sangue da cauda foi coletado nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 min pós-injeção (94).

Teste de tolerância ao glicerol (GlyTT)

Para o teste de tolerância ao glicerol, camundongos em jejum *overnight* de 12 horas receberam uma injeção IP de glicerol (489484, Sigma-Aldrich; 0,333 g/mL PBS—pH 7,4) na dose de 1,5 g/Kg de peso corporal. O sangue da cauda foi coletado nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 min pós-injeção.

Durante os testes metabólicos descritos acima, os valores da glicemia foram mensurados por meio de glicosímetro e tiras-teste FreeStyle Optium®, Abbott.

Gasometria

Lactato, pH e HCO_3^- foram mensurados a partir do sangue proveniente da veia porta de ratos *Wistar*, coletado em seringa contendo heparina de lítio com cálcio balanceado (proporção de 50 UI por mL de sangue – linha BD A-Line) através do analisador de gases sanguíneos Radiômetro ABL800 FLEX.

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

A concentração da enzima piruvato carboxilase foi determinada em amostras de fígado de camundongos e ratos por ensaio de imunoabsorção enzimática seguindo as orientações dos fabricantes (Cloud-Clone Corp, EUA e Elabscience, EUA, respectivamente).

4.5. Extração de tecidos

Em jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados por injeção IP de cetamina (100 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg). Após 10 a 15 minutos, assim que a anestesia foi assegurada pela perda dos reflexos podal e corneano, a cavidade abdominal foi aberta e a veia porta e a artéria aorta foram expostas para a coleta do sangue em seringas específicas para análise de gasometria. Em seguida, foram extraídos fragmentos do fígado, cólon e o terço final do íleo, os quais foram processados, conforme descrito abaixo, para as técnicas de *immunoblotting* e PCR.

4.6. Proteínas totais para imunoprecipitação e *immunoblotting*

Para a obtenção de proteínas totais, fragmentos do fígado, cólon e íleo foram mantidos em gelo e homogeneizados em solução de extração (Triton X-100 1%, Tris-HCl 100 mM (pH= 7,4), fluoreto de sódio 100 mM, ácido tilenodiamino tetra-acético (EDTA) 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, fluoreto de fenilmetanossulfonila 2 mM e aprotinina 0,1 mg/mL) com o auxílio de Politron. Seguiram-se então duas etapas de centrifugação (11.000 RPM por 40 min e 11.000 RPM por 20 min, ambas a 4°C) para obtenção do sobrenadante contendo o extrato total de proteínas. A quantificação de proteínas foi realizada pelo método do ácido bicinconínico (BCA). Após a leitura de cada amostra a 562 nm, foi determinada a média da triplicata da absorbância e calculada a concentração de proteína de cada amostra pela equação polinomial de segundo grau obtida pelas dosagens dos padrões de proteína. Às amostras destinadas à técnica de *Immunoblotting*, foi adicionado o tampão *Laemmli* contendo fosfato de sódio 20 mM pH 7, glicerol 50%, dodecil sulfato de sódio 10%, azul de bromofenol 0,1% e ditioneitol 1M. Seguiu-se o aquecimento a 100°C por 5 minutos e 80µg de proteínas totais foram utilizadas para posterior realização de *immunoblotting*, descrito abaixo.

4.7. Imunoprecipitação

Utilizando 1.000 µg de proteínas totais, procedemos à incubação com anticorpos específicos para imunoprecipitação, mantida no período noturno a 4 °C, em agitação. No dia seguinte foi adicionada a proteína A (Protein A Sepharose™ GMB, GE Healthcare) e nova incubação a 4 °C por 2 horas. Foi então realizada centrifugação para obtenção do *pellet* composto pela proteína A Sepharose e o complexo anticorpo e proteína. Realizamos sucessivas lavagens com tampão de lavagem do imunoprecipitado (EDTA 1 M, Trizma® 100 mM, ortovanadato de sódio 2mM, Triton 0,5%, aferido para o volume final com H₂O deionizada) até obtenção do *pellet* final. A cada *pellet* foi adicionada solução *Laemmli* (fosfato de sódio 10mM pH 7, glicerol 25%, dodecil sulfato de sódio 5%, azul de bromofenol 0,05% e ditiotretitol 1M) e 20µL foram utilizados para posterior realização de *immunoblotting*, descrito abaixo.

4.8. Análise de proteínas por *immunoblotting*

As amostras de extrato total bem como as amostras provenientes da imunoprecipitação foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Em todos os casos, o gel de poliacrilamida (8 a 15 %, de acordo com o peso molecular de cada proteína analisada) foi balizado por marcador de peso molecular (Page Ruler® Plus, Thermo Scientific®). Realizou-se a eletroforese em cuba de minigel da Bio-Rad®, com tampão de corrida (Tris 25 mM, glicina 250 mM e SDS 1%). O SDS-PAGE foi realizado a 60 V por 20 min e a 120 V por aproximadamente 2h. As proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência do minigel da Bio-Rad®, com tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 190 mM e metanol 20%), mantido em voltagem constante de 120 V por 1,5 h. Após, as membranas foram incubadas em agitação por 1h em solução de bloqueio contendo BSA a 5%, à temperatura ambiente. Em seguida, realizou-se a incubação *overnight* com o anticorpo primário, a 4°C, sob agitação contínua. No dia seguinte, as membranas foram lavadas três vezes em solução basal de pH 7.4 (NaCl 270 mM, KCl 5,4 mM, Na₂KPO₄ *2H₂O 14 mM, KH₂PO₄ 3,5 mM e Tween 20 0,1%) e incubadas com o anticorpo secundário específico em solução de BSA 3%, por 1,5h, à temperatura ambiente. Para remover o excesso de anticorpo secundário, as membranas foram lavadas três vezes em solução basal (pH 7.4). Por fim,

realizou-se a imunodeteccão por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante do kit (Clarity® Western ECL substrate, Bio-Rad©) e as membranas foram reveladas no fotodocumentador (Gel Doc® XR, Bio-Rad©), gerando arquivos digitais. Posteriormente, analisaram-se as imagens pelo *software* ImageLab (v. 5.2.1 *build* 11, Bio-Rad© Laboratories).

Os anticorpos primários e secundários utilizados nas técnicas de imunoprecipitação e *immunoblotting* estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Anticorpos primários e secundários utilizados nas técnicas de imunoprecipitação e *immunoblotting*.

Proteína	Referência	Fabricante	IgG	Diluição
Acetil lisina	sc-81623	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc</i>	<i>mouse</i>	1:1.000
Alfa tubulina	#2144	<i>Cell Signalling Technology®, Inc</i>	<i>rabbit</i>	1:1.000
AMPK	sc-25792	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc</i>	<i>rabbit</i>	1:1.000
AMPK alfa 2	sc-19131	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc</i>	<i>goat</i>	1:1.000
ATF4	ab50546	<i>Abcam®</i>	<i>mouse</i>	1:500
Beta actina	#4967	<i>Cell Signalling Technology®, Inc</i>	<i>rabbit</i>	1:1.000
Caveolina	#610058	<i>BD Transduction Laboratories®, Inc</i>	<i>mouse</i>	1:1.500
FBPase	sc-166298	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc</i>	<i>mouse</i>	1:1.000
FBP1/ FBPase	#59172	<i>Cell Signalling Technology®, Inc</i>	<i>rabbit</i>	1:1.000
GLUT1	#12939	<i>Cell Signalling Technology®, Inc</i>	<i>rabbit</i>	1:1.000
GLUT2	sc-9117	<i>Santa Cruz Biotechnology, Inc</i>	<i>rabbit</i>	1:1.000
MPC1	#14462	<i>Cell Signalling Technology®, Inc</i>	<i>rabbit</i>	1:1.000
MPC2	#46141	<i>Cell Signalling Technology®, Inc</i>	<i>rabbit</i>	1:1.000
pAMPK	#2535	<i>Cell Signalling Technology®, Inc</i>	<i>rabbit</i>	1:1.000
<i>Donkey Anti-rabbit AlexaFluor® 488</i>	ab150073	<i>Thermo Fisher Scientific, Inc</i>	—	1:100
<i>Goat Anti-mouse (H+L)</i>	31430	<i>Thermo Fisher Scientific, Inc</i>	—	1:5.000
<i>Goat Anti-rabbit (H+L)</i>	31460	<i>Thermo Fisher Scientific, Inc</i>	—	1:5.000
<i>Rabbit Anti-goat (H+L)</i>	31433	<i>Thermo Fisher Scientific, Inc</i>	—	1:5.000

4.9. PCR em tempo real (RT-PCR)

O RNA total foi obtido do íleo e cólon de ambos os grupos de camundongos (HDF e MET) seguindo-se método publicado anteriormente (95) e de células CaCo2 de acordo com o protocolo do fabricante (RNeasy Mini Kit—QIAGEN). Para amostras de tecido ou células, o cDNA de fita única foi sintetizado usando a transcriptase reversa SuperScript II conforme descrito no protocolo do fabricante (Invitrogen Corp.). PCR quantitativo foi executado para determinar as expressões de GLUT1, GLUT2 e ATF4 em cada fração de tecido e GLUT1 e ATF4 em células CaCo2. A detecção em tempo real da amplificação foi realizada em um Sistema de PCR QuantStudio™ (biosistemas aplicados) usando TaqMan™ Gene Expression Master Mix 2× (Applied Biosystems) e Taqman Assay (Applied Biosystems). As condições de ciclagem foram: 50 °C por 2 min, 95 °C por 10 min e 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 136 min. 100 ng de cada amostra de cDNA foram usados na reação.

Utilizaram-se as seguintes sondas para tecidos animais: GLUT1- Slc2a1 (Mm00441480_m1), GLUT2 - Slc2a2 (Mm00446229_m1) e ATF4-Atf4 (Mm00515325_g). As expressões de GAPDH (4352339E) e β-actina-ACTB (4352341E) ou B2M (Mm00437762_m1) foram usadas como controle endógeno e amostras de camundongos controle como calibradores.

Empregaram-se 100 ng de cada amostra de cDNA na reação com as seguintes sondas para células CaCo2: SLC2A1 (Hs00892681_m1) e ATF4 (Hs00900959_g1). Consideraram-se as expressões de GAPDH (4333764T), ACTB (4333762T) ou B2M (HS00187842_m1) como controle endógeno e amostras de células CaCo2 controle como calibradores.

"No Template Control" negativo também foi incluído para cada par de *primers*. Três réplicas foram executadas na mesma placa para cada amostra.

Para determinar a expressão relativa de *glut1*, *glut2* e *atf4* em relação aos controles, recorreremos ao *software* da Applied Biosystems® (CA, EUA). A expressão gênica foi calculada através de $2^{-\Delta CT}$, no qual o valor de ΔCT é a diferença entre o valor do ciclo *threshold* (ct) do gene alvo e o valor ct do gene *housekeeping* (*Gapdh*, *Actb* ou *B2m*). Os resultados são, portanto, informados como valores de expressão relativos.

4.10. Microscopia confocal

Após jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados por injeção IP de cetamina (100 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg). A cavidade abdominal foi aberta 10 a 15 minutos depois, ou seja, assim que a anestesia foi assegurada pela perda dos reflexos podal e corneano. Os intestinos delgado e grosso foram removidos do abdome e então, íleo e cólon foram separados dos demais segmentos. Essas porções foram abertas longitudinalmente e o conteúdo fecal cuidadosamente removido. Em seguida, cada segmento foi enrolado, com a mucosa voltada para fora, com o auxílio de um palito de madeira (técnica de *swiss-roll* (96)). Finalmente, esses tecidos foram cuidadosamente imersos em solução de paraformaldeído 4% por 24 horas.

Após a fixação, os palitos de madeira foram retirados e os tecidos enrolados posicionados em cassetes histológicos, lavados em água corrente por 1 hora e armazenados em álcool 70°. O material foi desidratado em soluções com concentração crescente de álcool (80%, 90%, 95% e 100%), diafanizado em xilol e embebido em paraplast (Sigma-Aldrich®) para a formação dos blocos.

Seccionaram-se os blocos em cortes histológicos de 5µm de espessura, os quais foram posicionados em lâminas previamente tratadas com solução de triethoxyl-silane (Sigma-Aldrich®) que foram levadas à estufa a 60°C por 12 horas.

Para a realização da técnica de imunofluorescência, as lâminas contendo os cortes histológicos foram desparafinizadas (banhos de xilol e álcool-xilol), hidratadas (banhos em soluções com concentração decrescente de álcool e água destilada) e imersas em tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7.4 (PBS). A recuperação antigênica foi realizada com 0,01 M de tampão citrato (pH 6,0) em panela de vapor por 30 minutos. Após o resfriamento do tampão citrato e a lavagem com PBS, as lâminas foram bloqueadas por 1 hora com solução 3% de soro anti-*donkey* e 3% de soro de albumina bovina em PBS, à temperatura ambiente. Em seguida, encubaram-se as lâminas *overnight*, a 4°C com anticorpo primário anti-GLUT2 (Santa Cruz Biotechnology, CA; sc-9117; *rabbit*), na diluição de 1:50. Após 2h de incubação com o anticorpo secundário específico (Abcam; ab150073; AlexaFluor® 488 *donkey* anti-*rabbit*, diluição 1:100), à temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas e montadas com meio Vectashield com DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA; H-1200). Os cortes foram examinados e as imagens capturadas por microscopia confocal de varredura a laser

(Leica TCS SP5 II) no Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD), da Universidade Estadual de Campinas. Nenhuma imunorreatividade foi observada em experimentos de controle em que anticorpos primários foram omitidos.

4.11. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) - Espectroscopia de ^1H e ^{13}C pós-injeção de ^{13}C -piruvato

Administração de ^{13}C -piruvato e extração dos tecidos

Camundongos dos grupos MET e HFD em jejum *overnight* de 12 horas receberam uma injeção IP de ^{13}C -piruvato (490709, Sigma-Aldrich; 250mg/mL PBS – pH 7,4) na dose de 1 g/Kg de peso corporal. Após 1h, os animais foram anestesiados por injeção IP de cetamina (100 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) e assim que a anestesia foi assegurada pela perda dos reflexos podal e corneano, abriu-se a cavidade abdominal, de onde foram extraídos fragmentos do fígado, cólon e o terço final do íleo.

Preparação de amostras e aquisição de espectros

As amostras de tecido foram lavadas com solução salina fria (0,9% NaCl), imediatamente pulverizadas sob nitrogênio líquido e mantidas no freezer a -80°C até a análise por RMN. Amostras de tecidos em pó foram adicionadas a uma solução fria de metanol/clorofórmio (2:1 v/v, total de 0,5 mL) e sonicadas (VCX 500, Vibra-Cell, Sonics & Material Inc., EUA) por 3 minutos com 10 segundos de intervalo de pausa entre cada minuto. Uma solução fria de clorofórmio/água deionizada (1:1 v/v, total de 0,5 mL) foi então adicionada às amostras, as quais foram rapidamente agitadas em vórtex e centrifugadas a $3,1 \times 10^3$ G por 20 min a 4°C . A fase superior foi coletada e seca em um concentrador a vácuo (miVac Duo Concentrator, GeneVac, Reino Unido). A fase sólida restante foi reidratada em 0,6 mL de tampão fosfato contendo D_2O (0,1 M, pH 7,4) e 0,5 mM de TMSPd_4 . As amostras foram adicionadas a um tubo de RMN de 5 mm para aquisição imediata.

Os espectros ^1H -NMR foram adquiridos usando um espectrômetro Varian Inova® (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, EUA) equipado com uma sonda fria de ressonância tripla e operando a uma frequência de ressonância ^1H de 600 MHz. A aquisição de espectros foi realizada com 256 varreduras coletadas com 32 mil pontos de dados em

uma largura espectral de 8.000 Hz. Um tempo de 1,5 s foi incorporado entre as varreduras, durante o qual um campo de radiofrequência (RF) de pré-saturação contínua de água foi aplicado para eliminar o sinal de água residual, bem como para a relaxação dos *spins* nucleares das moléculas de interesse.

Quantificação de metabólitos

Os metabólitos foram processados e quantificados usando o *software* NMR Suite versão 8.1 (Chenomx Inc™, Edmonton, AB, Canadá). O módulo processador deste *software* foi usado para ajustar as 3 correções de fase espectral e linha de base. Uma função de alargamento de linha de 0,5 Hz foi usada para reduzir o ruído do sinal e facilitar o ajuste dos sinais dos metabólitos nos picos espectrais. O sinal de água foi suprimido e os espectros foram calibrados usando o sinal de referência do TMSP-d4 0,5 mM. Os espectros foram transferidos individualmente para o módulo Profiling deste *software* para determinar o perfil metabolômico de cada grupo. Os metabólitos foram identificados e suas concentrações determinadas. Os dados de concentração foram exportados para Excel® (Microsoft Office™ 365) e normalizados quando necessário.

4.12. Cromatografia

Produtos químicos e reagentes

Todos os solventes e reagentes utilizados neste estudo eram de grau HPLC. A água foi purificada e deionizada pelo Sistema Milli-Q-UF (Millipore, Milford, MA) e utilizada em todas as soluções aquosas. Acetonitrila, cloridrato de metformina 97%, acetato de amônio, hidróxido de amônio, coluna Microcon YM-3 (Amicon Ultra 0,5 mL) com um filtro de membrana de 3kDa e 4-(dimetilamino)piridina 99% (DMAP; padrão interno - PI) foram provenientes da Merck/Sigma-Aldrich (EUA). A fase móvel utilizada no sistema HPLC foi filtrada a vácuo através de um filtro de membrana de 0,45 µm (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Alemanha).

Amostras de soro e tecidos

Diferentes volumes de sangue foram coletados das veias cava e porta e ventrículo esquerdo dos camundongos e imediatamente transferidos para microtubos secos. Essas amostras foram centrifugadas a 3.500 RPM por 15 min à temperatura ambiente. Em seguida, o soro foi coletado e armazenado a -20 °C até ser testado.

Amostras de tecido foram obtidas em diferentes intervalos após a administração de solução de metformina por via oral. Coração, pulmões, pâncreas, baço, músculo gastrocnêmio, rim esquerdo, parte do lobo frontal do cérebro, porção distal do íleo, cólon, fígado e tecido adiposo epididimal foram extraídos. As amostras foram pesadas e armazenadas em microtubos estéreis a -80 °C e, posteriormente, mantidas em gelo para seu processamento. *Beads* metálicas foram adicionadas aos tecidos extraídos e os microtubos submetidos à agitação no TissueLyser até que todo o conteúdo estivesse em suspensão. As amostras, então, foram armazenadas a -80°C até o preparo para as análises de HPLC.

Análise por HPLC

De acordo com a Tabela 2, todos os parâmetros foram estabelecidos para a análise por HPLC e se iniciaram as aquisições. A análise cromatográfica foi baseada na metodologia de quantificação relatada por Labuzek *et al.* (97)

A seletividade e especificidade para metformina e DMAP foram indicadas pela resolução nítida e simétrica dos picos, bem como pela ausência de picos interferentes significativos das matrizes biológicas. Outras evidências de melhorias na eficiência cromatográfica foram indicadas por uma redução no tempo de corrida cromatográfica de 8 min para tempos de retenção respectivos de 3,25 e 4,40 min para metformina e PI.

Tabela 2. Condições e parâmetros utilizados para análises de metformina em plasma e em matrizes de tecidos através de HPLC-UV.

Sistema de HPLC	Waters Alliance 2695 (Milford, MA, EUA), equipado com bomba quaternária, gerenciador de amostras e degaseificador	
Detector	Waters 2996 Uv-Vis ajustado na faixa de 210-400 nm	
Controle de sistema, aquisição de dados e processamento	<i>Software</i> de cromatografia Waters Empower 2002.	
Coluna	XSelect CSH™ Fluorofenil (150 x 4,6 mm; tamanho de partícula de 3,5 µm) Waters	
Guarda de coluna	XSelect CSH™ Fluorofenil (20 x 4,6 mm; tamanho de partícula de 3,5 µm) Waters	
Fase móvel	Solvente A- Acetonitrila Solvente B- acetato de amônio 0,010 M, pH 7,6	
Condições isocráticas	Tempo de corrida (min)	8
	A (%)	47.8
	B (%)	52.2
	Fluxo	1 mL/min
	Volume de injeção	25 µL
	Temperatura	30°C
	Deteção de metformina e DMAP	UV a 233 e 280 nm

Preparação de soluções estoque, padrões de calibração e amostras biológicas

Soluções estoques de metformina e do padrão interno DMAP foram preparadas em tampão de acetato de amônio (10 mM, pH 7,6) para produzir concentrações finais de 10 mM. Os padrões de calibração foram preparados por diluição seriada (500, 250, 100, 50, 25, 10 e 2,50 μ M) em plasma a partir de solução de metformina 10 mM. Além disso, a solução estoque do PI foi diluída a uma concentração de trabalho de 50 μ M.

Para a quantificação dos níveis de metformina em padrões de calibração e em amostras de plasma com concentração desconhecida, um volume de 50 μ L de cada amostra foi transferido para um microtubo (1,5 mL), seguido da adição de 40 μ L do PI a 50 μ M (para produzir uma concentração final de 5 μ M) e 310 μ L do tampão de acetato de amônio (10 mM, pH 7,6). As misturas foram agitadas em vórtex por 10 s e deixadas em banho ultrassônico por 5 min. Para remover proteínas e impurezas insolúveis, 400 μ L dos padrões e amostras de plasma passaram por um filtro de 3 KDa (Millipore Microcron YM3) lavado 5 vezes com água antes do uso para remover o conteúdo de glicerol da membrana. A filtração foi realizada por centrifugação a 14.000 RPM, 4°C por 20 minutos. A amostra filtrada foi seca utilizando-se o sistema *Speed Vac* e então cada uma foi ressuspensa em 300 μ L do tampão de acetato de amônio (10 mM, pH 7,6) e misturada em vórtex por 10 s. Posteriormente, um volume de 120 μ L foi transferido para *vials* e alíquotas de 25 μ L dos extratos reconstituídos foram injetadas no sistema HPLC-UV de fase reversa.

Para amostras de tecido homogeneizado, um volume de 200 μ L foi transferido para um microtubo (1,5 mL), seguido da adição de 40 μ L do padrão interno DMAP a 50 μ M (para produzir uma concentração final de 5 μ M) e 560 μ L do tampão de acetato de amônio (10mM, pH 7,6). As misturas foram agitadas em vórtex por 10 s e deixadas em banho ultrassônico por 5 min. A fim de remover proteínas e impurezas insolúveis, 500 μ L das amostras passaram por um filtro de 3kDa (Millipore Microcron YM3) enxaguado 5 vezes com água antes do uso para remover o conteúdo de glicerol da membrana. As demais etapas compreendem as mesmas descritas acima.

Gráficos de calibração variando de 2,5 a 500 μ M de metformina no plasma foram plotados com base nas proporções de área de pico de metformina para o padrão interno DMAP (eixo Y) contra as respectivas concentrações nominais de metformina (eixo X), usando Excel versão 2016. Em todas as calibrações, as curvas deveriam ter um valor de correlação

de pelo menos 0,998. A amostra de concentração zero (branco) foi utilizada para verificar a pureza dos reagentes e a ausência de outras substâncias potencialmente interferentes, mas não foi considerada para a análise de regressão dos padrões. A linearidade da curva de calibração foi avaliada pelo coeficiente de correlação. A seletividade dos ensaios foi testada pelo grau de separação do analito de interesse e de possíveis outros picos cromatográficos de substâncias interferentes presentes na matriz biológica. Os padrões foram preparados em triplicata para a corrida analítica. Amostras do branco também foram preparadas e injetadas em sextuplicata.

4.13. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) - Metabolômica

As amostras de tecido foram pulverizadas, submetidas aos protocolos de extração de metabólitos (metanol/clorofórmio) e preparadas para aquisição dos espectros de RMN. Os espectros $^1\text{H-NMR}$ foram adquiridos à temperatura ambiente, utilizando o equipamento de RMN de 600 MHz Agilent com sonda criogênica do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) do CNPEM (Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais). Seguiram-se o processamento e a análise dos mesmos utilizando-se o pacote Chenomx (chenomx.com), que permite a obtenção de dados sobre as identidades e concentrações de pequenas moléculas presentes na amostra. Análises estatísticas preliminares foram realizadas com o programa Prism 6.0.

Preparação de amostras e aquisição de espectros

As amostras de tecido foram lavadas com solução salina gelada (0,9% NaCl), imediatamente pulverizadas sob nitrogênio líquido e mantidas no freezer a -80°C até a análise por RMN. Amostras de tecidos pulverizadas foram adicionadas a uma solução de metanol/clorofórmio (2:1 v/v, total de 0,5 mL) e sonicadas (VCX 500, Vibra-Cell, Sonics & Material Inc., EUA) por 3 min com 10s de intervalo de pausa entre cada minuto. Uma solução de clorofórmio/água deionizada (1:1 v/v, total de 0,5 mL) foi então adicionada às amostras, as quais foram rapidamente agitadas em vórtex e centrifugadas a $3,1 \times 10^3$ G por 20 minutos a 4°C . A fase superior foi coletada e seca em um concentrador a vácuo (miVac Duo

Concentrator, GeneVac, Reino Unido). As amostras foram ressuspendidas em 0,6 mL de tampão fosfato contendo D₂O (0,1 M, pH 7,4) e 0,5 mM de TMSPd4 e adicionadas a um tubo de RMN de 5 mm para aquisição imediata.

Para a análise de perfil metabólico e determinação das concentrações de metabólitos utilizamos o Espectrômetro *Varian-Agilent Inova (Agilent Technologies Inc.™, Santa Clara, EUA)* do LNBio. Os espectros ¹H-NMR das amostras foram adquiridos utilizando um Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear equipado com sonda criogênica de tripla ressonância operando na frequência de ¹H de 600 MHz e temperatura constante de 298K (25°C). Um total de 256 varreduras, dependendo da concentração dos metabólitos, foram coletadas com 32.000 pontos, tempo de aquisição de 4s em uma janela de largura espectral de 16 ppm. Um tempo de espera de 1,5 s foi incorporado entre as varreduras, durante o qual um campo contínuo de radiofrequência de pré-saturação de água foi aplicado.

Quantificação de metabólitos

Os metabólitos foram processados e quantificados usando o *software* NMR Suite versão 8.1 (Chenomx Inc™, Edmonton, AB, Canadá). O módulo processador deste *software* foi utilizado para ajustar as correções de fase espectral e linha de base. Uma função de alargamento de linha de 0,5Hz foi usada para reduzir o ruído do sinal e facilitar o ajuste dos sinais dos metabólitos nos sinais espectrais. O sinal de água foi suprimido e os espectros foram calibrados utilizando-se o sinal de referência do TMSP-d4 como 0,5mM. Os espectros foram transferidos individualmente para o módulo *Profiling* deste *software* para determinar o perfil metabólico de cada grupo. Os metabólitos foram identificados e suas concentrações determinadas. Os dados de concentração foram exportados para Excel® (Microsoft Office™ 365) e normalizados quando necessário.

4.14. Cultura de células

A linhagem celular de câncer de cólon humano CaCo2 e a linhagem de células cancerígenas de fígado humano Huh7 foram obtidas respectivamente do Laboratório de

Imunoinflamação e do Laboratório de Biologia do Envelhecimento, ambos pertencentes ao Instituto de Biologia da UNICAMP. Células CaCo2 foram cultivadas em meio *Eagle* modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco ref 11885-084) contendo 20% de soro fetal bovino (FBS; Gibco ref. 12657-029) e células Huh7 foram cultivadas em DMEM contendo 10% de FBS com a adição de antibióticos e fungicidas. Ambas as linhagens foram mantidas a 37°C, com umidade controlada e 5% de saturação de CO₂.

Utilização e produção de glicose pelas células

A utilização de glicose pelas células CaCo2 foi calculada através da sua determinação no meio antes e após a adição de metformina, nos seguintes tempos: 1, 2, 4, 8 e 24 horas. A uma concentração de 5mM de glicose, sua utilização foi calculada pela diferença entre os tempos 8 e 4 horas, e a 10mM de glicose, pela diferença entre 24 e 4 horas. Esses tempos foram determinados depois de experimentos preliminares que os indicaram como pontos em que a concentração de glicose diminuiu linearmente. A quantificação foi determinada pelo método da glicose oxidase. A produção de glicose nas células Huh7 foi calculada através da área sob a curva da concentração basal por 30 minutos após a adição de piruvato nas células. Amostras do meio foram coletadas antes e 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos após esta etapa.

4.15. Transfecção

Um total de 2×10^4 células foram semeadas em uma placa de cultura tecidual em um meio de crescimento completo e incubadas durante a noite. No dia da transfecção, 100 pmol de siRNA foram diluídos em OPTI-MEM (Life Technologies) e misturados com 10 µL de Reagente de Transfecção X-tremeGene siRNA (Roche) de acordo com o protocolo do fornecedor. O meio de transfecção foi então substituído por um meio completo, e após 24 horas, as células foram tratadas com metformina (1mmol/L) e incubadas por um adicional de 24 horas. Dois siRNA para AMPK-PRKAA2 (EHU042081; Sigma-Aldrich), PRKAA1 (EHU074041; Sigma-Aldrich), Glut1—SLC2A1 (EHU028011; Sigma-Aldrich), Glut2—SLC2A2 (EHU144201; Sigma-Aldrich), ATF4—ATF4 (EHU114901; Sigma-Aldrich) foram utilizados.

Para os experimentos com animais, estes foram mantidos em jejum por 6 horas antes da administração do siRNA. 50 µg de siRNA Glut1—slc2a1 (EMU085671, Sigma-Aldrich) complexados com o reagente InvivoFectamine® 3.0 (ThermoFisher) foram administrados por gavagem e intraperitonealmente em camundongos 48 e 24 horas antes do tratamento com metformina. siRNA negativo, ou seja que não possui gene alvo, complexado com InvivoFectamine® 3.0 Reagent foi usado na mesma dose nos controles. Os dados são expressos como média ± DP do número de eventos independentes indicado. Os resultados dos *blots* são apresentados como comparações de bandas em autoradiografia, quantificadas por densitometria utilizando-se o *software* ImageLab (v. 5.2.1 build 11, Bio-Rad © Laboratories).

4.16. Análise Estatística

Todos os dados foram analisados para uma distribuição normal; Aqueles normalmente distribuídos foram analisados por Teste t de *Student* bicaudal ou análise de variância (ANOVA) unidirecional (*one-way*), com o teste de Bonferroni para comparações *post hoc*, quando apropriadas. Quando não normalmente distribuídos, os dados foram submetidos ao teste de Mann-Witney. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. Todas as análises e os gráficos conseguintes foram obtidos por meio do programa GraphPad PRISM 7 (GraphPad, San Diego).

5. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho serão apresentados em formato de artigo científico publicado no periódico *The Proceedings of the National Academy of Sciences* (PNAS) em 19/01/2023 e disponibilizado a seguir.



Metformin acts in the gut and induces gut-liver crosstalk

Natália Tobar^{a,1}, Guilherme Z. Rocha^{a,1,2}, Andrey Santos^a, Dioze Guadagnini^a, Heloisa B. Assalin^a, Juliana A. Camargo^a, Any E. S. S. Gonçalves^a, Flavia R. Pallis^a, Alexandre G. Oliveira^b, Silvana A. Rocco^c, Raphael M. Neto^c, Irene Layane de Sousa^c, Marcos R. Alborghetti^d, Mauricio L. Sforça^e, Patricia B. Rodrigues^d, Raissa G. Ludwig^e, Emerielle C. Vanzela^f, Sergio Q. Brunetto^g, Patricia A. Boer^h, José A. R. Gontijo^a, Bruno Geloneze^a, Carla R. O. Carvalho^h, Patricia O. Prada^{ai}, Franco Folli^{a,3,4}, Rui Curⁱ, Marcelo A. Mori^e, Marco A. R. Vinolo^d, Celso D. Ramos^k, Kleber G. Franchini^f, Claudio F. Tormena^l, and Mario J. A. Saad^{a,2}

Edited by C. Ronald Kahn, Harvard Medical School, Boston, MA; received July 14, 2022; accepted December 21, 2022

Metformin is the most prescribed drug for DM2, but its site and mechanism of action are still not well established. Here, we investigated the effects of metformin on basolateral intestinal glucose uptake (BIGU), and its consequences on hepatic glucose production (HGP). In diabetic patients and mice, the primary site of metformin action was the gut, increasing BIGU, evaluated through PET-CT. In mice and CaCo2 cells, this increase in BIGU resulted from an increase in GLUT1 and GLUT2, secondary to ATF4 and AMPK. In hyperglycemia, metformin increased the lactate (reducing pH and bicarbonate in portal vein) and acetate production in the gut, modulating liver pyruvate carboxylase, MPC1/2, and FBP1, establishing a gut-liver crosstalk that reduces HGP. In normoglycemia, metformin-induced increases in BIGU is accompanied by hypoglycemia in the portal vein, generating a counter-regulatory mechanism that avoids reductions or even increases HGP. In summary, metformin increases BIGU and through gut-liver crosstalk influences HGP.

Metformin | Diabetes | gut-liver crosstalk | glucose metabolism

Metformin is the most prescribed drug for treating type 2 diabetes (DM2), but its mechanism of action is still not fully understood (1–3). The most investigated site of action of metformin is the liver, where it may reduce hepatic glucose production (HGP) (1). However, this is not uniformly observed (4, 5), with data showing an increase in glucose utilization/effectiveness associated with increased HGP.

Some studies demonstrate that the metabolic benefit of metformin might be due to actions in the intestine (6–8). Recent data have shown that metformin modulates the gut microbiota without a well-characterized role in its antihyperglycemic effect (8, 9). Previous data showed that metformin concentrations are higher in the gut than in the blood (10–12), indicating that metformin action in the intestine may be relevant. In addition, intravenous administration (IV) of metformin is less effective than oral administration in reducing glucose levels (13, 14). Recent data demonstrated that oral administration of delayed-release metformin, with a low absorption rate, has similar effectiveness as standard release formulation in reducing fasting plasma glucose in DM2 (15, 16).

In the gut, metformin promotes glucose uptake through the basal side as demonstrated using imaging with positron emission tomography-computed tomography (PET/CT) (17). However, no previous study has evaluated the quantitative importance of the gastrointestinal tract in the antihyperglycemic effect of metformin, and if there is crosstalk between the intestine and the liver. The present study investigated how metformin increases basolateral intestinal glucose utilization (BIGU) and its consequences on HGP.

Results

Metformin Induces BIGU in Diabetic Patients. We used the archives of the Nuclear Medicine Service of our University Hospital to identify diabetic patients submitted to PET/CT on metformin and without metformin. Our search showed that diabetic patients on metformin ($n = 16$) submitted to PET/CT scanning presented an increase in 2-deoxy-2-[18F]fluoro-D-glucose (18F-FDG) uptake all over the intestine, including jejunum, ileum, and colon, compared to diabetic patients without metformin ($n = 5$) and to controls ($n = 11$) (Fig. 1A) (SI Appendix, Table S1). To quantify the relative contribution of the intestine to whole-body glucose disposal, we performed biodistribution analysis using 18F-FDG in both groups of patients and also of controls. The intestine exhibited the highest glucose uptake rate and became a significant tissue for glucose disposal after treatment with metformin (Fig. 1B).

Metformin Increases BIGU in Mice on a High-Fat Diet (HFD). To investigate more deeply the mechanism by which metformin enhances intestinal glucose uptake and utilization, we first examined whether the effect observed in humans is also reproducible in mice. We

Significance

The site and mechanisms of action of metformin are incompletely understood. Here, we show that in hyperglycemic conditions, metformin increases basolateral intestinal glucose uptake (BIGU), and its metabolites produced in the gut, through the portal vein reach the liver and reduce hepatic glucose production (HGP). In normoglycemic conditions, metformin increases modestly BIGU, inducing hypoglycemia in the portal vein, and in response there will be unincreased HGP. Although our data do not exclude a direct action of metformin in the liver, they indicate that the first site of metformin action is the gut, and through gut-portal vein-liver crosstalk, it may have a role in the control of HGP, integrating the sites and the mechanisms of metformin action.

The authors declare no competing interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Copyright © 2023 the Author(s). Published by PNAS. This open access article is distributed under Creative Commons Attribution License 4.0 (CC BY).

¹N.T. and G.Z.R. contributed equally to this work.

²To whom correspondence may be addressed. Email: gzrocha@gmail.com or msaad@unicamp.br.

³Present address: Departmental Unit of Diabetes, Endocrinology and Metabolism, San Paolo Hospital, Azienda Socio Sanitaria Territoriale Santi Paolo e Carlo, Milano, Italy, 20142.

⁴Present address: Department of Health Science, Università degli Studi di Milano, Milano, Italy, 20146.

This article contains supporting information online at <https://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.2211933120/-/DCSupplemental>.

Published January 19, 2023.

investigated whether different doses of metformin for 10 d improve glucose tolerance and increase BIGU. The results showed that the improvement in glucose tolerance presents a dose-response curve, with the maximal effect observed after 200 to 444 mg/kg (SI Appendix, Fig. S1A). Although 50 mg/kg of metformin (MET) significantly increased BIGU, a more pronounced increase in BIGU was observed with 444 mg/kg in parallel to a more efficient improvement in glucose tolerance (Fig. 1 C–E). The results also showed that the increase in glucose uptake after 50 mg/kg of metformin was only observed in the intestine (Fig. 1F). We present

most of our data with a metformin dose of 50 mg/kg/day in mice because this dose gives plasma metformin concentration similar to humans using 2 g/day (18). However, we also presented the results with the highest dose in supplemental figures, because the dose of 444 mg/kg of metformin gives the highest response in the glucose tolerance test (SI Appendix, Fig. S1) and in BIGU in our animal model.

We also determined metformin concentration on the 10th day after 50 mg/kg/day or 444 mg/kg/day 2 h after the last gavage, in the portal vein, in the ileum and liver, and after 8 h in the colon

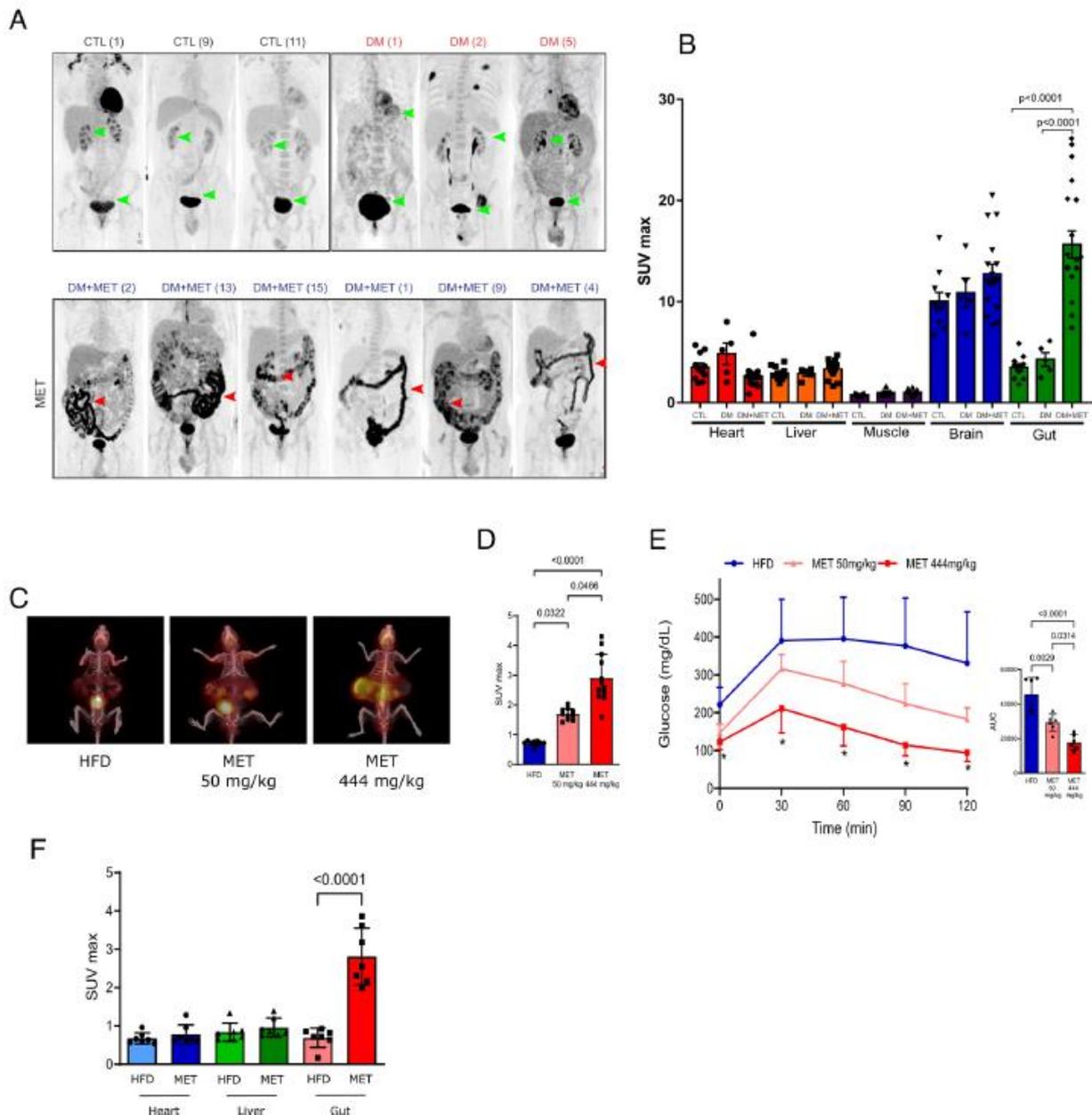


Fig. 1. Metformin increases basolateral intestinal glucose uptake and utilization (BIGU) in diabetic patients and in obese mice and improves glucose tolerance in these mice. (A) Representative images of whole-body ^{18}F -FDG PET/CT scanning from control individuals (CTL, $n = 11$) diabetic patients (DM, $n = 5$) and diabetic patients in use of metformin (DM+MET, $n = 16$). ^{18}F -FDG PET/CT uptake is color-coded, and areas of increased signal exhibit black color. (B) ^{18}F -FDG biodistribution analysis (SUVmax) in different tissues from CTL, DM and DM+MET diabetic patients. (C) Representative images of whole-body ^{18}F -FDG PET/CT scanning from mice on HFD and treated with vehicle or metformin (MET) with low (50 mg/kg) and high (444 mg/kg) dose for 10 d and 2 h before the PET/CT. ^{18}F -FDG PET/CT uptake is color coded, and areas of increased signal exhibit red-orange color. (D) ^{18}F -FDG biodistribution analysis (SUVmax) in the intestine from mice treated with vehicle (HFD) or treated with metformin (MET) at a low and high dose, respectively. (E) Blood glucose levels from HFD and MET treated mice during a glucose tolerance test (GTT). (F) ^{18}F -FDG biodistribution analysis (SUVmax) in different tissues from HFD and MET mice (50 mg/kg/day for 10 d). All tests performed were one-way ANOVA with Bonferroni's post-test.

(*SI Appendix Table S2*). The results showed higher concentrations of the drug in the ileum and colon, independent of the dose used. However, a dose-dependent increase in the levels was observed in the portal vein and the liver. Portal vein levels and tissue levels of metformin obtained after 50 mg/kg/day, 2 h after the last gavage, are very similar to previous data which are in the therapeutic range (15, 18).

Mechanism of Increased BIGU. Previous data showed that metformin actions inducing AMPK phosphorylation in the duodenum (19) are important for its antihyperglycemic effect. Our data show that 50 mg/kg of metformin induces AMPK phosphorylation in the ileum and colon of HFD mice, and in parallel induces an increase in GLUT2 protein expression (Fig. 2*A*), the primary glucose transporter in the basolateral side, in ileum and colon (20). We then investigated the effect of metformin on the expression and distribution of GLUT2. The results showed that metformin increased GLUT2 mRNA in the colon but not in the ileum and increased tissue protein levels in whole tissue extracts and plasma membrane in both tissues (Fig. 2*B* and *SI Appendix, Fig. S2A*). In the ileum of HFD mice, GLUT2 also co-localized in the nucleus (*SI Appendix, Fig. S2B*), and metformin treatment reduced GLUT2 in the nucleus, increasing this glucose transporter in the plasma membrane. This distribution may explain the lower level of this protein in the ileum of HFD mice because the concentration of cytoplasmic GLUT2 is probably diluted by the vast array of cytoplasmic protein in whole-tissue extracts pretreatment. In addition, by using immunofluorescence, we observed that obese mice presented higher levels of GLUT2 in the apical side of the intestine. After metformin treatment, there was an evident translocation of GLUT2 to the basolateral side of the intestinal epithelium of the ileum and colon (*SI Appendix, Fig. S2C–D*).

We subsequently investigated whether inhibition of AMPK α 2 can blunt this effect of metformin on BIGU. Although AMPK α 2 knockout (KO) mice have only a partial reduction in AMPK activation, these animals are the only AMPK KO mice without changes in the epithelial architecture of the intestine (21). In the ileum, there was a moderate reduction in metformin-induced AMPK phosphorylation in AMPK α 2 KO mice, associated with a reduction in GLUT2 protein expression, and in parallel, there was also a significant decrease in metformin-induced BIGU in these mice (Fig. 2*C–E*). These data indicate that partial reduction in AMPK and/or AMPK α 2 deletion blunts the metformin effect on BIGU.

Next, we investigated whether inhibition of AMPK, in two different concentrations of glucose in the medium, can also blunt this effect of metformin in CaCo-2 cells. Metformin-induced glucose utilization at 5 mM glucose was independent of AMPK or GLUT2 (*SI Appendix, Fig. S3A*). At 10 mM glucose metformin increased glucose uptake, and siRNA of AMPK dramatically reduces the expression of GLUT2 and metformin-induced glucose uptake (Fig. 2*F*). As expected, siRNA of GLUT2 reduces the expression of GLUT2 and metformin-induced glucose uptake (Fig. 2*F*). These data suggest that metformin independent of the glucose concentration, increase glucose uptake in cells. However, only at 10 mmol glucose, the effect of metformin depends on AMPK and GLUT2.

Since at 5 mM glucose metformin increases glucose uptake independent of GLUT2, we decided to investigate the effect of metformin in other glucose transporters. Previous data showed that the fetal intestine expresses GLUT1 (20, 22). We investigated whether metformin could increase the expression of this glucose transporter in the ileum and colon. The results showed that metformin induces an increase in mRNA and protein levels of GLUT-1 in both tissues (Fig. 2*G* and *SI Appendix, Fig. S3B*).

Previous data showed that metformin induces the integrated stress response through ATF4 (23), and that ATF4 promotes a transcriptional enhancement of the GLUT1 (24). We then investigated whether metformin could increase the expression of ATF4. The results showed that metformin increased ATF4 mRNA and protein in the ileum and colon (Fig. 2*H* and *SI Appendix, Fig. S3C*), suggesting that ATF4 may have a role in the effect of metformin on GLUT1 expression.

PET/CT scanning of HFD mice treated with an administration of siGLUT1 blunted metformin-induced intestinal 18F-FDG uptake (Fig. 2*J*), suggesting that GLUT1 mediates metformin-induced BIGU. In CaCo-2 cells, metformin-induced GLUT1 and ATF4 expression (Fig. 2*J*) and glucose utilization in different concentrations of glucose (Fig. 2*K* and *SI Appendix, Fig. S3D*). Our data also showed that at 5 mmol/L and at 10 mmol/L the knock-down of ATF4 or GLUT1 reduced metformin-induced glucose uptake in CaCo-2 cells (Fig. 2*K* and *SI Appendix, Fig. S3D*), reinforcing the importance of ATF4 and GLUT1 in metformin-induced glucose uptake in the intestine.

Metabolomics and Glucose Utilization. To better understand the fate of glucose metabolism in the ileum, colon, and liver, we performed metabolomics of these tissues from HFD mice treated or not with metformin (50 mg/kg/day for 10 d). In the ileum, colon, and liver, there was an increase in amino acids and metabolites which are substrates of gluconeogenesis, indicating inhibition of this pathway in the gut and liver (Fig. 3*A–C*). In accordance, this low dose of metformin reduced HGP evaluated through the pyruvate tolerance test (PTT) (Fig. 3*D*). It is interesting that in metformin-treated mice, despite an increase in glucose uptake in the gut, there was also a decrease in glucose in the ileum and colon and an increase in pyruvate and lactate suggesting glucose metabolism through the glycolytic pathway in these tissues (Fig. 3*A* and *B*). However, in liver, there was no decrease in glucose levels after metformin treatment and only a mild increase in lactate. These data might suggest a tissue-specific effect of metformin but we cannot exclude the possibility that the increase in liver lactate after metformin may reflect an increase in lactate coming from the gut. The increase in malate in the three tissues is not easy to explain, but may reflect an increase or inversion of the malate-aspartate shuttle, and may also indicate that metformin increases lactate oxidation, as previously described (25, 26). Metformin induced an increase in acetate in ileum and colon (Fig. 3*A* and *B*), which may be secondary to hyperactive glucose metabolism as previously demonstrated and/or increased deacetylation.

In mice treated with higher doses of metformin, we observed changes in the same direction induced by lower doses (*SI Appendix, Fig. S4 A–C*). It is noteworthy that independent of the dose, metformin-induced glucose metabolism in the glycolytic pathway in the ileum and colon, increasing lactate concentration (*SI Appendix, Fig. S4 A and B*). This lactate is predominantly L-lactate, evaluated through RMN spectroscopy, excluding an overproduction of lactate from microbiota (of which the lactate is mainly D-lactate) (*SI Appendix, Fig. S4D*). Metformin also induced an increase in acetate in ileum and colon (*SI Appendix, Fig. S4 A and B*). Similar to 50 mg/kg/day, the high dose of metformin also induced only a mild increase in acetate and lactate in the liver suggesting an effect of metformin in the liver and/or that these substrates came from the ileum and colon, reaching the liver through the portal vein. There was an increase in precursors of gluconeogenesis in the liver, indicating a block of this pathway (*SI Appendix, Fig. S4C*). The increase in glucose-6-phosphate (G-6-P), glucose-1-phosphate (G-1-P), and

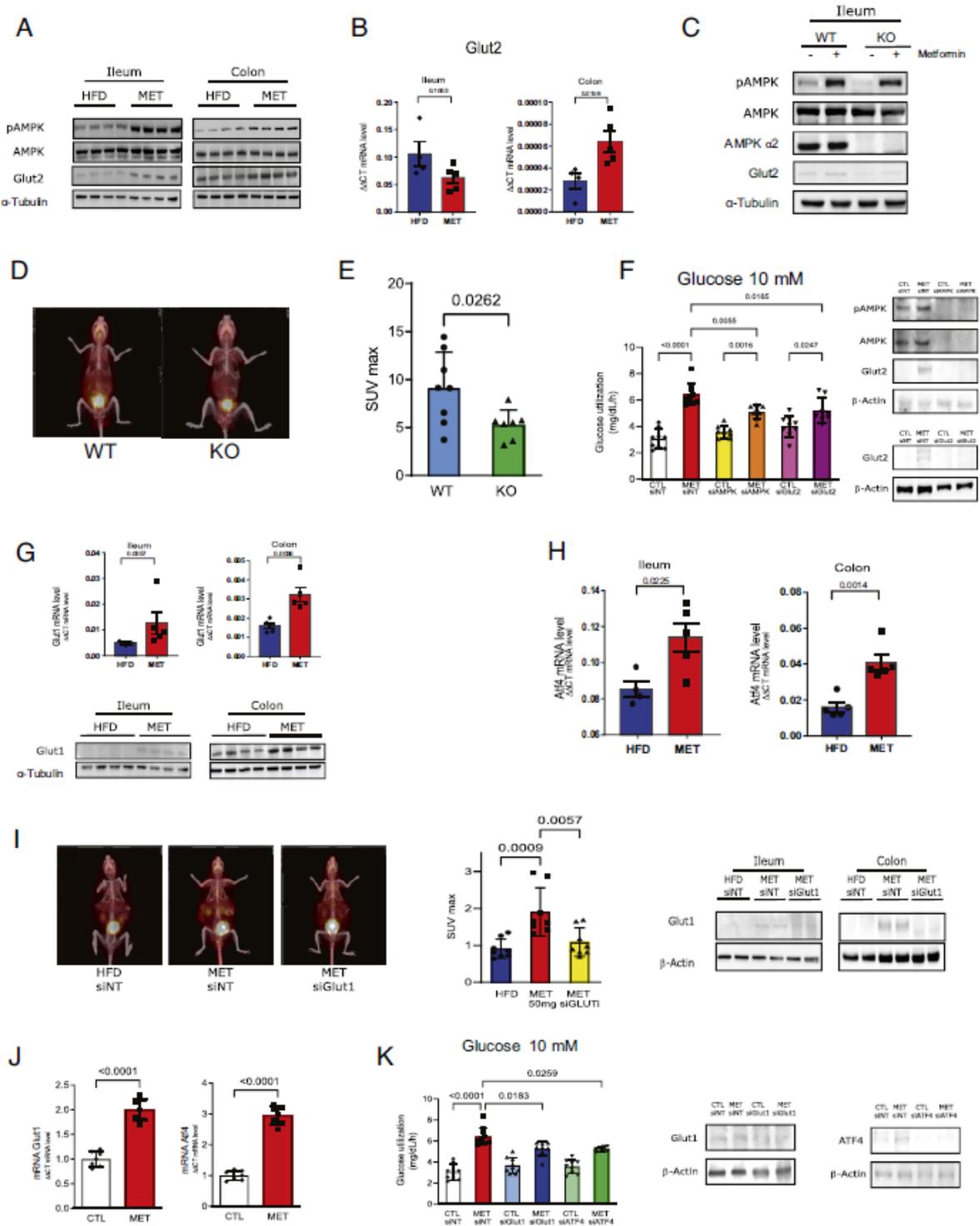


Fig. 2. Metformin induces AMPK phosphorylation and modulates GLUT2 and GLUT1 in ileum and colon. (A) Protein phosphorylation and expression of AMPK and protein expression of Glut2 in ileum and colon from HFD and MET-treated mice (50 mg/kg for 10 d). (B) Glut-2 mRNA expression in ileum and colon from HFD and MET mice (50 mg/kg for 10 d). (C) Protein phosphorylation and expression of AMPK and expression of Glut2 in ileum from wild type (WT) and AMPK knock-out (KO) littermates mice treated or not with metformin (MET) (50 mg/kg for 10 d). (D) Representative images of whole-body ^{18}F -FDG PET/CT scanning from mice and ^{18}F -FDG biodistribution analysis (SUVmax) in the intestine from AMPK wild type (WT) and knock-out (KO) mice treated with metformin and (E) SUVmax quantification in the intestine. (Student's *t* test, $P < 0.05$, $n = 5$). (F) Glucose uptake at 10 mM glucose concentrations in CaCo2 cells after the incubation with metformin (MET 1 mM to 16 h) in cells pre-treated with siRNA of AMPK, GLUT2 and non-targeting, as control (siNT) (one-way ANOVA and Bonferroni's test, $P < 0.05$). (G) Glut-1 mRNA and protein expression in ileum and colon from HFD and MET mice (50 mg/kg for 10 d). (H) ATF-4 mRNA expression in ileum and colon from HFD and MET mice (50 mg/kg for 10 d) ($n = 6$). (I) Representative images of whole-body ^{18}F -FDG PET/CT scanning from mice and ^{18}F -FDG biodistribution analysis (SUVmax) in the intestine from mice treated with non-targeting siRNA or Glut1 siRNA and with metformin (50 mg/kg for 10 d) and expression of Glut1 in ileum and colon (ANOVA, Bonferroni post test, $P < 0.05$, $n = 5$). (J) Glut-1 and ATF4 mRNA expressions in CaCo2 cells. (K) Glucose uptake at 10 mM glucose concentrations in CaCo2 cells after the incubation with metformin (MET 1 mM to 16 h) and siRNA-mediated knockdown of GLUT1, ATF4 and non-targeting, as control (siNT) and expression of Glut1 and Atf4 in CaCo2 cells (one-way ANOVA and Bonferroni's test).

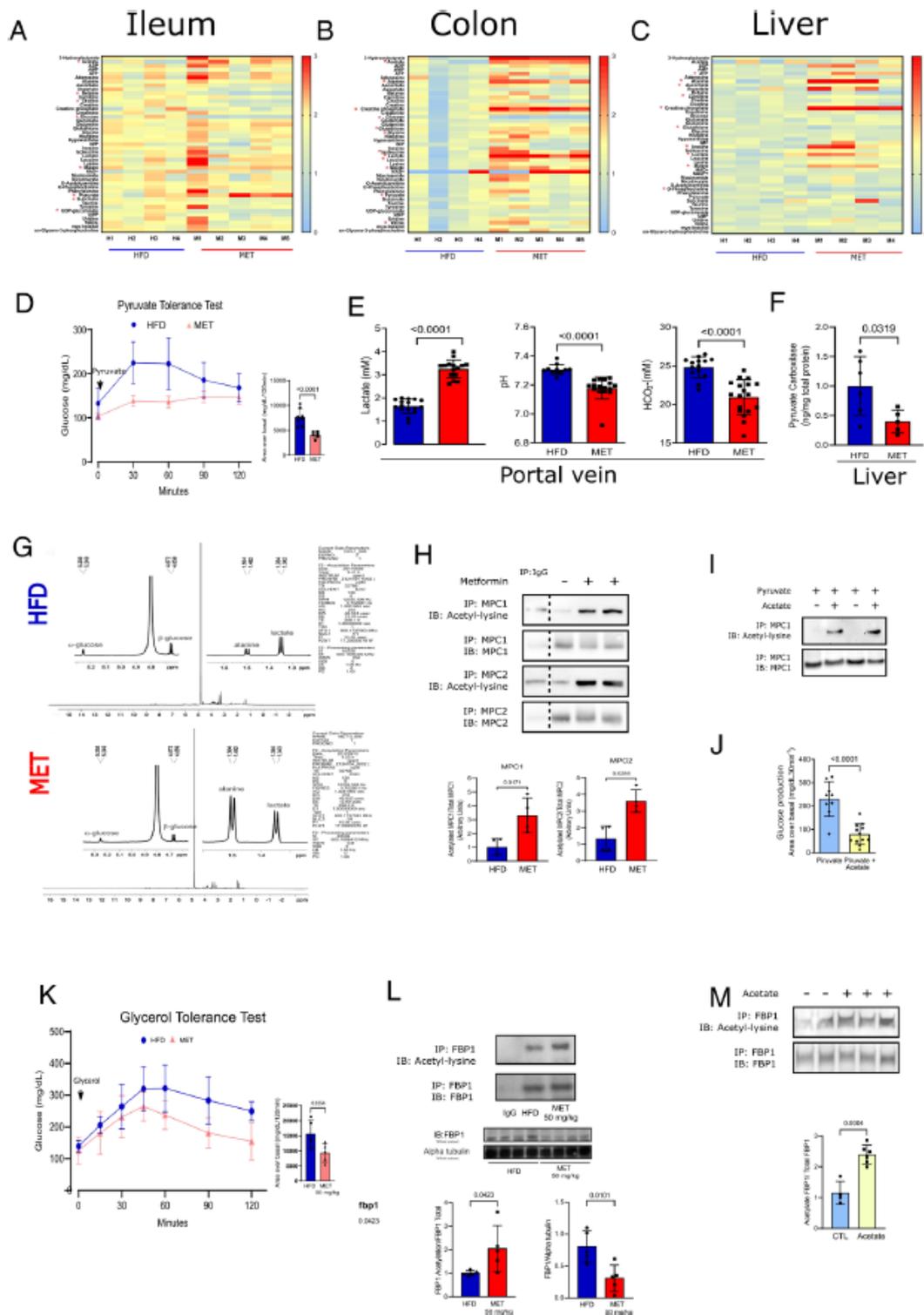


Fig. 3. Metformin increases glycolysis in ileum and colon and reduces HGP in animals on HFD (A–C) Metabolomic analysis of ileum, colon and liver from the HFD and MET mice treated (50 mg/kg/day) for 10 d (one-way ANOVA and Bonferroni's test, $*P < 0.05$, $n = 4$ to 5) (D) PTT curve and area under curve of metformin treated mice (50 mg/kg/day for 10 d) ($n = 5$). (E) Lactate, pH and bicarbonate levels in blood from the portal vein of HFD and MET Wistar rats. (F) Pyruvate carboxylase levels in liver from HFD and MET treated Wistar rats. (G) (1H) NMR spectra acquired at 600 MHz in D_2O . (H) Acetylation of MPC1/2 in the liver of HFD and MET treated C57BL/6J mice ($n = 5$). (I) Acetylation of MPC1 in Huh7 cells treated with pyruvate and acetate. (J) Glucose production of Huh7 cells treated with pyruvate and acetate. (K) Glycerol tolerance test curve and area under curve of metformin treated mice (50 mg/kg/day for 10 d) ($n = 5$). (L) Acetylation and tissue protein levels of FBP1 in the liver of HFD and MET treated C57BL/6J mice ($n = 5$). (M) Acetylation of FBP1 in Huh7 cells treated with acetate.

uridine diphosphate glucose with the high doses suggest that the glycogenesis pathway is activated in the liver (SI Appendix, Fig. S4C). This is an expected result after 10 d of high doses of

metformin treatment since previous data showed that the improvement in diabetes control and insulin resistance increases the glycogenic pathway (27).

Gut-Liver Crosstalk. The PTT confirmed that chronic metformin also reduced HGP in HFD mice in a dose-dependent manner (Fig. 3D and *SI Appendix, Fig. S4E*). Based on our metabolomics study, we investigated whether some of the metabolites from the intestine, modulated by metformin, could establish crosstalk with the HGP pathway. We came up with two suggestions: a modulation of pyruvate carboxylase (PC), a gluconeogenic enzyme, by pH and bicarbonate (28) secondary to the increase in lactate, and possible modulation of pyruvate carrier transport (MPC1/2) by acetylation (29–32), a consequence of increased acetate.

Our data showed that the lactate produced in the ileum and colon is delivered into mesenteric circulation and can reduce the pH and bicarbonate levels in the portal vein (Fig. 3E). However, after 12 h of metformin administration, the peripheral levels of lactate decreased to normal levels (*SI Appendix, Fig. S4F*). The increase in lactate oxidation induced by metformin (33) may have contributed to this result. Interestingly, PC is very sensitive to changes in pH, and reducing pH can dramatically reduce the activity of this enzyme (28). Moreover, the reduction in bicarbonate may also refrain gluconeogenesis because it is necessary to convert pyruvate into oxaloacetate. In accordance, metformin treatment reduced bicarbonate levels and pH in the portal vein and, in parallel, PC tissue protein levels in the liver of HFD mice (Fig. 3F). To show that metformin reduces pyruvate flux through gluconeogenesis in mice, we used a labeled ^{13}C -pyruvate injection in the portal vein and investigated the effect of metformin on the flux of pyruvate through gluconeogenesis by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. The results showed that in the liver of HFD mice without metformin, the detection of labeled ^{13}C -pyruvate is very low or absent. However, signals from glucose, lactate, and alanine were detected in a similar amount, indicating that the injected pyruvate is quickly converted to these metabolites. In contrast, in animals treated with metformin, a signal from labeled ^{13}C -pyruvate is also not observed, but lactate and alanine signals predominate over glucose (Fig. 3G). These data suggest that metformin reduced gluconeogenic flux through PC.

In HFD Wistar rats treated with metformin plus NaHCO_3 , there was an attenuation of the metformin effect on HGP in parallel to an increase in portal pH (*SI Appendix, Fig. S5A*), and the acidification of the portal vein with NH_4Cl reduced HGP (*SI Appendix, Fig. S5B*). Moreover, we observed a negative and significant correlation between portal lactate levels and HGP (*SI Appendix, Fig. S5C*) and a positive correlation between pH or bicarbonate with HGP (*SI Appendix, Fig. S5D and E*). Moreover, we also infused pyruvate, in the PTT, diluted in phosphate buffer with different pHs, and the results showed that pyruvate diluted at pH 7.1 induced a blunted glucose curve compared to pH 7.9 (*SI Appendix, Fig. S5F*). In Huh7 cells, we also showed that decreasing the pH from 7.4 to 7.2 reduced HGP generated by pyruvate, in parallel to a reduction in PC levels (*SI Appendix, Fig. S5G and H*).

Subsequently, we investigated if metformin treatment can induce acetylation in MPC1/2 in the liver. The results showed that treatment with metformin could increase acetylation and decrease MPC1/2 protein levels (Fig. 3H). An increase in acetylation may be a consequence of the deactivation of deacetylases and/or an increase in acetyl-CoA and acetylases. In this regard, previous data showed that metformin could reduce SIRT3, which is a critical mitochondrial deacetylase (30). However, since our data showed a marked increase in acetate induced by metformin, we would like to emphasize that acetate-derived acetyl groups could contribute to the cellular acetylation reactions (34). Moreover, the dependence on acetate to supply, in different cellular compartments, Acetyl-CoA pools have been identified in multiple cell types (35, 36). We subsequently investigated this

possibility in mice and cells. We treated HFD mice with low acetate doses and observed a decrease in HGP during PTT (*SI Appendix, Fig. S5I*). Accordingly, by treating Huh7 cells with acetate, there was an increase in acetylation and degradation of this carrier, associated with reduced HGP in these cells after pyruvate (Fig. 3I and J).

The crosstalk in PC and MPC1/2 induced by metformin may contribute to explaining the reduction in HGP from pyruvate but our data also showed that metformin blunts glycerol-induced HGP (Fig. 3K and *SI Appendix, Fig. S6A*). In this regard, we investigate whether other proteins from the gluconeogenic pathway may also be acetylated. Previous data showed that Fructose 1,6-bisphosphatase (FBP1) (5, 37), a critical enzyme of gluconeogenesis, in addition to being inhibited by AMP, can also be acetylated which is accompanied by reduced activity (38). We then investigated whether metformin treatment can induce acetylation of FBP1. The results showed that metformin can increase acetylation, corrected by FBP1 protein level (that showed a marked decrease in the liver) (see Fig. 3L). Previous data showed that metformin by itself does not modify the activity of FBP1 (39). We then investigated whether acetate can induce FBP1 acetylation in cells. By treating Huh7 cells with acetate, there was an increase in acetylation of this enzyme (corrected by FBP1 protein level that was reduced), associated with reduced HGP in these cells after pyruvate (Fig. 3M).

Metformin Effect under Normoglycemia. In conditions of normoglycemia or only mild hyperglycemia, metformin does not reduce HGP (4, 5). We then investigated the effect of metformin on BIGU in control individuals and BIGU and HGP in rats with standard glucose tolerance. Metformin induced a mild to moderate increase in BIGU in control individuals (Fig. 4A and B) and in control mice (Fig. 4C and D). In lean rodents, metformin does not change acid–base equilibrium in the portal vein (Fig. 4E and F), nor lactate and acetate in the gut, without changing gluconeogenesis precursors in the liver (*SI Appendix, Fig. S7A–C*), indicating no suppression of HGP. However, there was an apparent decrease in plasma glucose levels in the portal vein to hypoglycemic levels (Fig. 4G), which might induce glucose sensing in this vein, responding by increasing HGP. In accordance, in lean mice treated with metformin glycerol did not change but pyruvate increased HGP (*SI Appendix, Fig. S7D and E*). In this regard, we can suggest that in conditions of normoglycemia or mild hyperglycemia metformin increases BIGU mildly, and the hypoglycemia in the portal vein, through glucose sensing, may overcome a direct or indirect effect of metformin in the liver, increasing HGP as described (40, 41).

Discussion

The results of the present study showed that the main site of the glucose-lowering effect of metformin is the gut, and the initial glycemia and the amount of glucose metabolized by the gut contribute to determining HGP. In hyperglycemic conditions the marked increase in BIGU is accompanied by gut-liver crosstalk through metabolites that contribute to reducing HGP and, in normoglycemic conditions, the increase in BIGU induces hypoglycemia in the portal vein that generates a counter-regulatory response that might increase HGP.

Metformin-induced AMPK phosphorylation in the ileum and colon can have a role in increased BIGU, because in KO mice for AMPK2alpha and the genetic inhibition of AMPK in CaCo2 cells both showed a reduction in metformin-induced glucose uptake, in parallel to a reduction in GLUT2 expression. Additionally, metformin also induced GLUT1 expression, in parallel to an increase

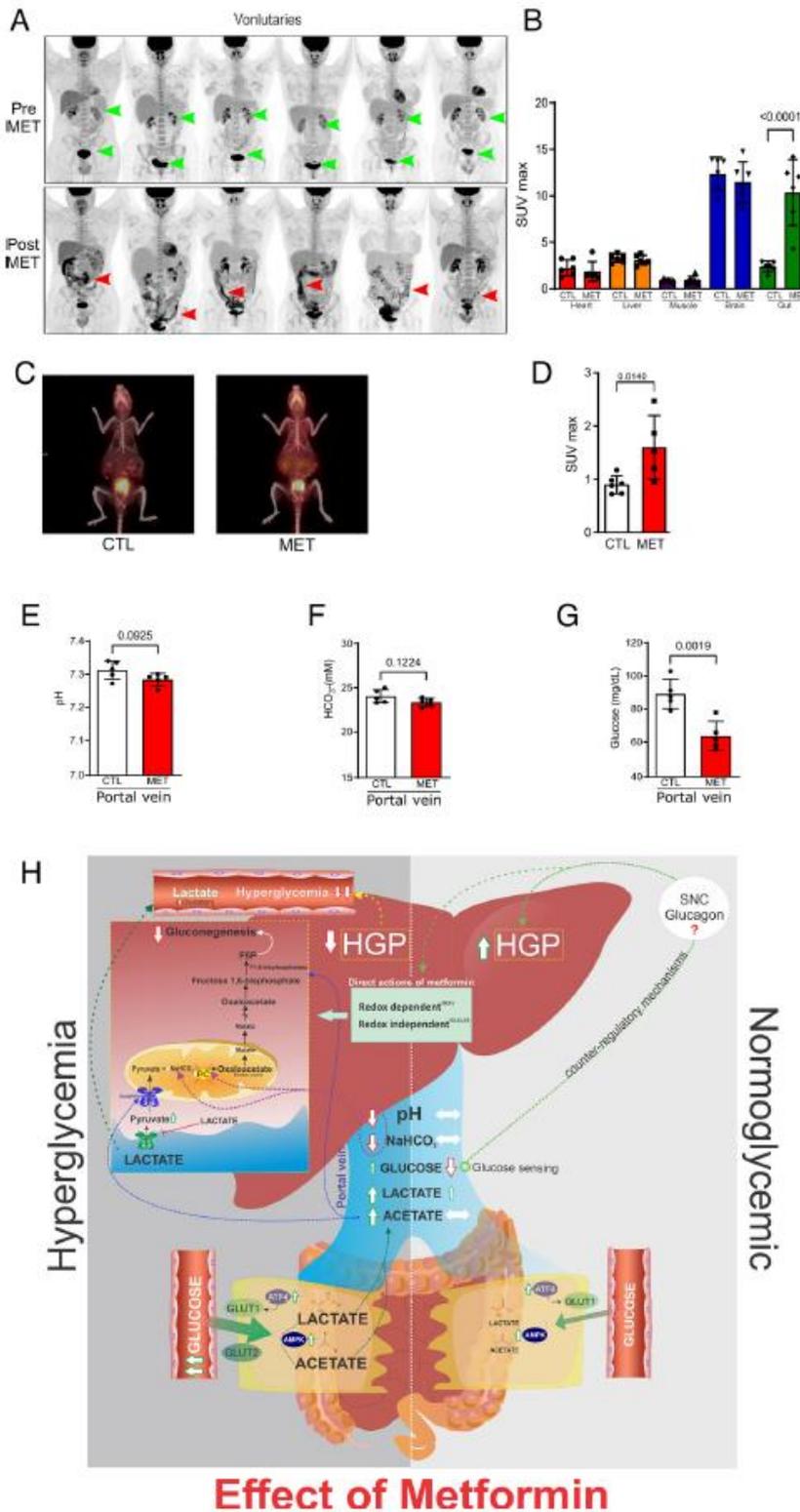


Fig. 4. Metformin induces moderate increase BIGU in control individuals and normal glucose-tolerant rodents and does not reduce HGP in the liver of these rodents. (A) Representative images of whole-body ¹⁸F-FDG PET/CT scanning from the same healthy subjects before (PRE) and after metformin (2 g/day for 5 d) (POST). ¹⁸F-FDG PET/CT uptake is color coded, and areas of increased signal exhibit black color. (B) ¹⁸F-FDG biodistribution analysis (SUVmax) in different tissues from CTL and MET subjects (one-way ANOVA and Bonferroni's test, $P < 0.001$, $n = 6$). (C) Representative images of whole-body ¹⁸F-FDG PET/CT scanning from mice on control chow mice treated with vehicle or metformin (MET 50 mg/kg/day for 10 d) and for 2 h before the PET/CT. ¹⁸F-FDG PET/CT uptake is color coded, and areas of increased signal exhibit red-orange color. ¹⁸F-FDG PET/CT images from lean mice (CTL) and treated with vehicle or metformin (MET). (D) SUVmax in the intestine of CTL and MET treated mice (50 mg/kg/day for 10 d) (one-way ANOVA and Bonferroni's test, $P < 0.05$, $n = 5$ to 6). (E and F) pH and bicarbonate levels in blood from the portal vein of CTL and MET (250 mg/kg/10 d) treated Wistar rats. (G) Glucose levels in CTL and MET treated (250 mg/kg/day for 10 d) in lean Wistar rats (Student's *t* test, $P < 0.05$, $n = 5$). (H) Schematic representation of metformin actions in conditions of hyperglycemia and normoglycemia. In hyperglycemic conditions, metformin induces GLUT1 and GLUT2 in the colon and ileum, where both these glucose transporters are expected to promote BIGU. In enterocytes, the glucose is metabolized to lactate, which will decrease pH and NaHCO₃ in the portal vein and decrease gluconeogenesis via PC inhibition. In parallel, an increase in acetate production in the gut will induce acetylation and inhibit MPC1/2, leading to cytosolic accumulation of pyruvate, which in turn prevents the uptake of extracellular lactate through MCT1. Acetylation also blocks FBP1. These mechanisms demonstrate that metformin establishes a crosstalk between gut and liver to reduce gluconeogenesis in hyperglycemic conditions. In normoglycemic conditions, metformin induces GLUT1 and 2 expressions, but considering the *K_m* of the glucose transporters, GLUT1 is expected to be preferentially used to modestly increase BIGU. In this condition, the increase in lactate will be discreet, and no alteration in acid-base equilibrium in the portal vein will be observed. The moderate increase in BIGU will induce hypoglycemia in the portal vein, which can induce portal glucose sensing and a possible counter-regulatory response that will avoid a decrease in HGP or even increase it. It is important to mention that other actions of metformin directly in the liver can synergize with the demonstrated gut-liver crosstalk to reduce HGP. However, in conditions of normoglycemia, the counter-regulatory mechanisms may overcome these direct actions.

in ATF4, which certainly contribute to increase glucose uptake in the gut. The induction of two glucose transporters with different *K_m* makes metformin action unique. In this regard, metformin-induced BIGU more pronounced in diabetic patients and HFD mice than in controls may also reflect the action of GLUT2, but the increase in GLUT1 is also important for metformin's effect in different concentrations of plasma glucose, indicating the relevance of the two glucose transporters. Metformin-induced BIGU may

also explain its effect on improving glucose effectiveness without changing insulin sensitivity (42) or HGP (43).

In accordance with our data, robust evidence coming from different sources showed the importance of the intestine in the glucose-lowering effect of metformin. When small intestinal AMPK was knocked down in HFD-treated rats, the glucose-reducing effect of metformin was blunted (19). Very recently, Ma et al. demonstrated that low-dose metformin targets the lysosomal AMPK

pathway through PEN2, but only intestine-specific knockout of Pen2 impairs the glucose-lowering effects of metformin (44).

Once in the gut, metformin induces glucose utilization predominantly through the glycolytic pathway generating lactate and acetate (45, 46). Lactate reduces bicarbonate and pH in the portal vein, modulating an early step of gluconeogenesis in the liver probably at two different sites. First, the carboxylation of pyruvate by PC to oxalacetate requires bicarbonate; and second, PC is very sensitive to pH, and even mild decreases in pH markedly reduce its activity, suggesting that the reduction in bicarbonate and pH in portal vein induced by metformin may contribute to blunt HGP (28, 47, 48).

In parallel, there was an increase in MPC1/2 and FBP1 acetylation, which might involve acetylases and/or deacetylases. However, we cannot rule out the possibility that acetate can contribute to the induction of acetylation of MPC1/2 and FBP1 (30). The acetylation of MPC1/2 reduces its protein expression and activity (30, 32), reducing pyruvate transport to mitochondria (31), and impairing the initiation of gluconeogenesis. Although lactate transport into mitochondria depends on MCT1, recent data showed that the blockade of pyruvate imported into mitochondria prevents extracellular lactate uptake as efficiently as an MCT1 inhibitor (49). The acetylation of FBP1 also reduced its protein levels, explaining the effect of metformin reducing not only pyruvate-induced glucose production but also glycerol-induced glucose production. These data suggest that lactate and acetate generated in the intestine, can establish gut-liver crosstalk, reducing HGP and that acetylation might be an important post-translational modulator of gluconeogenesis, which deserves further investigation (Fig. 4H).

These findings do not exclude other direct actions of metformin on liver gluconeogenesis as previously described (18, 50–53). However, the metabolomics showed differences in glucose metabolism induced by metformin between the gut and liver that deserves consideration. The reduction in glucose levels is accompanied by an increase in pyruvate and lactate in the ileum and colon, but in the liver the increase in lactate is not accompanied by an increase in pyruvate or a decrease in glucose, suggesting a tissue-specific metabolic pathway regulation induced by metformin and/or that the increased lactate in the liver is coming from the gut (lactate was increased in portal vein), reinforcing the gut-liver crosstalk. In addition, our data also highlight the important role of the gut on the glucose-lowering action of metformin: a) the levels of metformin in the ileum and colon are much higher than in the liver, after gavage of lower or higher doses of the drug; b) HGP seems to be driven by BIGU, because in hyperglycemic conditions there is an increase in BIGU accompanied by a reduction in HGP, and in normoglycemic conditions, the mild increase in BIGU does not reduce HGP or even increase; c) confirming the importance of acidosis in the portal vein and the increase in acetate to control gluconeogenesis, the treatment with bicarbonate abolishes at least partially the effect of metformin on HGP and the infusion of a low dose of acetate blunts HGP in obese animals. Taken together these data indicate that a gut-liver crosstalk also has a role in the glucose-lowering action of metformin.

Our data also explain the paradoxical effect of metformin increasing HGP in individuals with normal glycemia (4, 5). In normoglycemic mice, metformin increases BIGU to a lesser extent than in diabetic mice but is sufficient to induce hypoglycemia in the portal vein. It does not decrease bicarbonate and pH in the portal vein, avoiding the gut-liver crosstalk that reduces HGP. It is possible that the hypoglycemia in the portal vein, through the portal vein sensing and portal-hepatic cycle (40, 41, 54), activates counter-regulatory mechanisms to increase HGP, opposing indirect (through gut-liver crosstalk) and/or

direct actions metformin in the liver (18, 50–53) supposed to reduce HGP. We can suggest that the anatomical location of this glucose sensor in the portal vein and its physiological properties are very appropriate to prevent systemic hypoglycemia induced by metformin, which is very rare or nonexistent. In accordance, previous data showed that in non-diabetic individuals and individuals with recent-onset DM2 (4) and also in prediabetes (55) metformin increases glucagon levels. Interestingly, our data showed in non-diabetic mice that pyruvate but not glycerol increased HGP. Since glucagon increases the activity of PC, PEPCK (56, 57), and MPC1 (58) we can suggest that glucagon is more efficient to stimulate gluconeogenesis starting from pyruvate than glycerol. Previous data also showed that glucagon is not able to increase HGP from glycerol (59, 60).

The hypoglycemia in the portal vein induced by metformin can also be considered gut-liver crosstalk to drive HGP (Fig. 4H). Even though metformin might have direct actions in the liver modulating gluconeogenesis (18, 50–53), this effect might not be dominant because in conditions of normoglycemia it is supplanted by mild hypoglycemia in the portal vein, with the final effect being an increase in HGP.

In summary, our data show mechanisms of metformin action, integrating effects in the gut and the liver, without excluding the direct effect of the drug on liver enzymes. Metformin has unique actions, modulating BIGU and inducing metabolic gut-liver crosstalk, which modulates HGP in opposite directions depending on initial blood glucose levels.

Research Design and Methods

Materials.

Humans.

PET/CT. Patients in the control group are under medication for their respective morbidities, but none has taken metformin. Patients that are in use of metformin are in use of medication for their respective diseases. ^{18}F -FDG was injected in an arm vein of patients fasted for 6 h. The dose of ^{18}F -FDG is calculated using the patient weight (kg) multiplied by 0.12 (mCi/kg), which then gives the dose of ^{18}F -FDG in mCi. All participants in this study provided written informed consent. The present study was approved by CEP/FCM/UNICAMP through CAAE: 38906820.9.0000.5404.

Animals. Male Swiss, C57BL6/J and B6.129-Prkaa2tm1.1Vio/Orl (AMPK alpha2 KO) mice and Wistar rats were provided by the Multidisciplinary Center for Biological Investigation on Laboratory Animal Science—Unicamp (Campinas, Brazil). Metformin and routine reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Animal procedures were performed according to the guidelines of the local animal care and use committee. The Ethics Committee of the University of Campinas approved all experiments (CEUA 4437-1 A and B). Eight-week-old male mice were maintained under specific pathogen-free conditions in a regimen of 12-h dark, 12-h light cycles, and room temperature of 21 °C. The animals were submitted to a HFD for 8 wk (HFD) (61) to induce obesity, insulin resistance, and glucose intolerance. Food and water were ad libitum.

Metformin Administration Protocol

Mice. Metformin was diluted in the drinking water for 10 d and 2 h before all experiments. The drug was administered by gavage at a final dosage of 444 mg/kg (MET group). HFD group received only a vehicle solution (water). Low-dose metformin treatment (50 mg/kg) was administered by gavage.

Rats. Metformin was diluted in the drinking water for 10 d and 2 h before all experiments, and the drug was administered by gavage at a final dosage of 250 mg/kg (MET group). HFD group received only a vehicle solution (water).

Assays. Blood glucose was measured from the tail venous blood of all animals with a glucose analyzer. Lactate, pH, and HCO₃⁻ were measured from the portal vein of Wistar rats with a Blood gas analyzer—ABL800 FLEX—Radiometer.

Tissue Extraction, Immunoprecipitation, and Protein Analysis by Immunoblotting. After 12 h fasting, animals were anesthetized by intraperitoneal injection of Ketamine (100 mg/kg) and Xylazine (10 mg/kg). The abdominal cavity was opened 10 to 15 min later, i.e., as soon as anesthesia was assured by the loss of pedal and corneal reflexes. The portal vein and the aorta artery were exposed, and blood was taken in syringes specific to gasometry analysis. Then, the liver, colon, and the final third of ileum were extracted, washed, minced coarsely, and homogenized immediately in the extraction buffer. Experiments utilizing immunoprecipitation or immunoblotting were performed according to previously published work (61).

Real-Time PCR. Total RNA was obtained from the ileum and colon from both groups of mice according to the methods published previously (62) and CaCo2 cells according to the manufacturer's protocol (RNeasy Mini Kit—QIAGEN). For tissue or cell samples, the first-strand cDNA was synthesized using SuperScript II reverse transcriptase as described in the manufacturer's protocol (Invitrogen Corp.). Quantitative PCR was run to determine the expressions of GLUT1, GLUT2, and ATF4 in each tissue fraction and GLUT1 and ATF4 in CaCo2 cells. Real-time detection of amplification was performed in an QuantStudio™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) using TaqMan™ Gene Expression Master Mix 2× (Applied Biosystems) and Taqman (Applied Biosystems). 100 ng of each cDNA sample were used in the reaction as described in *SI Appendix, SI Materials and Methods*.

Confocal Microscopy. The sections were processed for indirect immunofluorescence. Antigen retrieval was performed using 0.01 M citrate buffer (pH 6.0) boiling in a microwave oven (1,300 W) twice for 5 min each. After washing, the slides were blocked with 3% donkey normal serum and 3% bovine serum albumin in PBS for 1 h at room temperature. The rabbit anti-Glut 2 (Santa Cruz Biotechnology, CA) primary antibody at 1:50 dilution was used. After incubation with the specific secondary antibody (Abcam, 1:100 dilution) donkey anti-rabbit (DyLight®594), the sections were washed and mounted in a commercial anti-fading agent with DAPI (Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Samples were examined and images captured by confocal laser scanning microscopy (Leica TCS SP5 II) in the Life Sciences Core Facility (LaCTAD) from the University of Campinas. No immunoreactivity was seen in control experiments in which primary antibodies were omitted.

Glucose Tolerance Test. The glucose tolerance tests were performed on mice that were fasted for 6 h. A fasting blood sample was taken to assess fasting glucose and insulin levels, and then the animals were challenged with an injection of 20% glucose into the peritoneum. The glucose and insulin levels were assessed in tail blood samples at 0, 15, 30, 45, 60, 90, and 120.

PTT. For the pyruvate tolerance test, mice fasted for 12 h followed by i.p. injection of sodium pyruvate solution (0.454 g/mL PBS - pH 7.4)

at a dose of 1.5 g/kg body weight. Tail blood was taken at specified times, and glucose levels were measured by a glucometer (63).

Glycerol Tolerance Test. For the glycerol tolerance test, mice fasted for 12 h followed by i.p. injection of glycerol (0.333 g/mL PBS—pH 7.4) at a dose of 1.5 g/kg body weight. Tail blood was taken at specified times, and glucose levels were measured by a glucometer.

FDG-PET/CT Imaging. The animals fasted for 6 h before PET/CT scans (positron emission tomography/computed tomography). For a precise 18F-FDG injection and imaging acquisition, mice were anesthetized via intraperitoneal injection of Ketamine (100 mg/kg) and Xylazine (10 mg/kg). 37MBq (1 mCi) of 18F-FDG (in approximately 0.1 mL of NaCl 0.9% solution) was injected via caudal vein (*SI Appendix, SI Materials and Methods*).

NMR.

1H and 13C NMR spectroscopy-pyruvate injection. 1H-NMR spectra were acquired using a Varian Inova® spectrometer (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) equipped with a triple-resonance cold probe and operating at a 1H resonance frequency of 600 MHz. Spectra acquisition was performed with 256 scans collected with 32 K data points over a spectral width of 8,000 Hz (*SI Appendix, SI Materials and Methods*).

Chromatography.

Chemicals and reagents. All solvents and reagents used in this study were HPLC grade. Water was purified and deionized by the Milli-Q-UF system (Millipore, Milford, MA) and used throughout in all aqueous solutions. Acetonitrile, metformin hydrochloride 97%, ammonium acetate, ammonium hydroxide, Microcon YM-3 column (Amicon Ultra 0.5 mL) with a 3 kDa membrane filter, and 4-(dimethylamino)pyridine 99% (DMAP; internal standard) were purchased from Merck/Sigma-Aldrich (USA). The mobile phase used in the HPLC system was vacuum filtered through a 0.45 µm membrane (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen, Germany).

Serum and Tissue Samplings. Different volumes of blood were collected from the cava and portal veins and left ventricle of the animals and immediately transferred to dry microtubes. These samples were centrifuged at 3,500 rpm for 15 min at room temperature. Afterward, the serum was collected and stored at -20 °C until assayed.

Tissue samples were obtained at different intervals after the administration of metformin solution orally. The entire heart, lungs, pancreas, spleen, gastrocnemius muscle, and left kidney were removed. Sections from the frontal lobe of the brain, the distal portion of the ileum, the colon, the liver, and the epididymal adipose tissue were also extracted. The samples were weighed and stored in sterile microtubes at -80 °C. For their processing, the microtubes were kept on ice. Metallic beads were added to the tissue, and the microtubes were subjected to agitation in the TissueLyser until all content was in suspension. The samples were stored at -80 °C until the preparation for the HPLC analyses.

HPLC Analysis. According to *SI Appendix, Table S3*, all relevant parameters were set for the HPLC analysis and started the measurement. The chromatographic analysis was based on the quantification method reported by Labuzek et al. (64).

Cell Culture. The human colon cancer cell line Caco2 and human liver cancer cell line Huh7 were obtained from Dr. Marcelo Bispo de Jesus, from the Institute of Biology, UNICAMP. Caco2 cells were cultured

in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 20% FBS, and Huh7 cells were cultured in DMEM containing 10% FBS with the addition of antibiotics or fungicides. Both cell lines were maintained at 37 °C in a humid atmosphere and 5% CO₂.

Glucose Utilization and Glucose Production in Cells. Glucose utilization in CaCo2 cells was calculated through glucose determination in the medium before and after metformin addition, in the following times: 1, 2, 4, 8, and 24 h. At 5 mM glucose concentration, glucose utilization was calculated by the differences between the times 8 and 4 h, and at 10 mM glucose, the differences between 24 and 4 h. These times were chosen after preliminary experiments that showed these times as the points when glucose concentration declined linearly. Glucose was determined by the glucose oxidase method.

Glucose production in Huh7 cells was calculated through the area over the basal glucose curve for 30 min after the addition of pyruvate to the cells. Samples from the medium were collected before and 5, 10, 15, 20, 25, and 30 min after pyruvate addition.

Transfection. A total of 2×10^4 cells were seeded in a tissue culture plate in a complete growth medium and incubated overnight. On the day of transfection, 100 pmol of siRNA was diluted into OPTI-MEM (Life Technologies) and mixed with 10 μ L of X-tremeGene siRNA Transfection Reagent (Roche) according to the supplier's protocol. The transfection medium was then replaced by a complete medium, and after 24 h, cells were treated with metformin (1 mmol/L) and incubated for an additional 24 h. Two siRNA for AMPK-PRKAA2 (EHU042081; Sigma-Aldrich) and PRKAA1 (EHU074041; Sigma-Aldrich), for Glut1—SLC2A1 (EHU028011; Sigma-Aldrich), for Glut2—SLC2A2 (EHU144201; Sigma-Aldrich), and for ATF4—ATF4 (EHU114901; Sigma-Aldrich) were used.

The animals were fasted for 6 h before siRNA administration. A total of 50 μ g of siRNA Glut1—slc2a1 (EMU085671, Sigma-Aldrich) complexed with InvivoFectamine® 3.0 reagent (ThermoFisher) was administered by oral gavage and intraperitoneally in mice 48 and 24 h before of treatment with metformin. Nontargeting control siRNA complexed with InvivoFectamine® 3.0 Reagent was used at the same dose as a control.

Data are expressed as mean \pm SD of the number of independent experiments indicated. The results of blots are presented as direct

comparisons of bands in autoradiography and quantified by optical densitometry using the software ImageLab (v. 5.2.1 build 11, Bio-Rad © Laboratories). All data were analyzed for a normal distribution; normally distributed data were analyzed by two-tailed Student's *t* test or one-way ANOVA, with the Bonferroni test for post hoc comparisons, when appropriate and non-normally distributed data were subjected to the Mann–Witney test. The level of significance adopted was $P < 0.05$ unless specified elsewhere. All graphs were made with GraphPad PRISM 7 (GraphPad, San Diego).

Data, Materials, and Software Availability. All study data are included in the article and/or *SI Appendix*.

ACKNOWLEDGMENTS. This study was supported by funding from INCT Obesidade e Diabetes CNPq (465693/2014-8) and FAPESP (2014/50907-5). G.Z.R. received a fellowship from PNPd/CAPES (88882.305918/2018-1). This research used facilities of the Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), part of the Brazilian Centre for Research in Energy and Materials (CNPEM), a private non-profit organization under the supervision of the Brazilian Ministry for Science, Technology, and Innovations (MCTI). The NMR Laboratory staff is acknowledged for their assistance during the experiments. We also would like to thank Maria Cristina de Souza and Marielza Crosnag Feres Lot—from Gasometria/HC, Josimo Garcia from Cyclobrás, and LACTAD/UNICAMP for providing assistance and/or materials during the experiments.

Author affiliations: ^aDepartment of Internal Medicine, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, 13083-887 Brazil; ^bDepartment of Physical Education, São Paulo State University, Rio Claro, 13506-900 Brazil; ^cBrazilian Biosciences National Laboratory and Brazilian Center for Research in Energy and Materials, Campinas, 13083-100 Brazil; ^dDepartment of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, 13083-970 Brazil; ^eDepartment of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, São Paulo, 13083-970; ^fDepartment of Structural and Functional Biology, University of Campinas, Campinas, 13083-865 Brazil; ^gBiomedical Engineering Center, University of Campinas, Campinas, 13083-881 Brazil; ^hInstitute Biomedical Sciences, University of São Paulo-Department of Physiology and Biophysics, São Paulo, 05508-000 Brazil; ⁱSchool of Applied Sciences, University of Campinas, Limeira, 13484-3501 Brazil; ^jButantan Institute São Paulo, 05503-900 Brazil; ^kDivision of Nuclear Medicine, Department of Radiology, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, 13083-888 Brazil; and ^lInstitute of Chemistry, University of Campinas, Campinas, 13083-970 Brazil

Author contributions: N.T., G.Z.R., and M.J.A.S. designed research; N.T., G.Z.R., A.S., D.G., H.B.A., J.A.C., A.E.S.S.G., F.R.P., A.G.O., S.A.R., R.M.N., L.L.d.S., M.R.A., M.L.S., P.B.R., R.G.L., E.C.V., M.A.M., M.A.R.V., C.D.R., and C.F.T. performed research; S.A.R., R.M.N., S.Q.B., P.A.B., J.A.R.G., C.R.O.C., P.O.P., R.C., and K.G.F. contributed new reagents/analytic tools; N.T., G.Z.R., A.S., D.G., H.B.A., S.A.R., R.M.N., S.Q.B., P.A.B., J.A.R.G., B.G., C.R.O.C., P.O.P., F.F., R.C., K.G.F., and M.J.A.S. analyzed data; and N.T., G.Z.R., A.S., H.B.A., and M.J.A.S. wrote the paper.

1. C. J. Bailey, Metformin: Historical overview. *Diabetologia* **60**, 1566–1576 (2017), 10.1007/s00125-017-4318-z.
2. C. J. Bailey, C. Wilcock, J. H. Scarpello, Metformin and the intestine. *Diabetologia* **51**, 1552–1553 (2008), 10.1007/s00125-008-1053-5.
3. E. Sanchez-Rangel, S. E. Inzucchi, Metformin: Clinical use in type 2 diabetes. *Diabetologia* **60**, 1586–1593 (2017), 10.1007/s00125-017-4336-x.
4. L. C. Gormsen et al., Metformin increases endogenous glucose production in non-diabetic individuals and individuals with recent-onset type 2 diabetes. *Diabetologia* **62**, 1251–1256 (2019), 10.1007/s00125-019-4872-7.
5. L. J. McCreight et al., Metformin increases fasting glucose clearance and endogenous glucose production in non-diabetic individuals. *Diabetologia* **63**, 444–447 (2020), 10.1007/s00125-019-05042-1.
6. L. J. McCreight, C. J. Bailey, E. R. Pearson, Metformin and the gastrointestinal tract. *Diabetologia* **59**, 426–435 (2016), 10.1007/s00125-015-3844-9.
7. T. Wu, M. Horowitz, C. K. Rayner, New insights into the anti-diabetic actions of metformin: From the liver to the gut. *Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **11**, 157–166 (2017), 10.1080/17474124.2017.1273769.
8. P. V. Bauer et al., Metformin alters upper small intestinal microbiota that impact a glucose-SGLT1-sensing glucoregulatory pathway. *Cell Metab.* **27**, 101–117.e105 (2018), 10.1016/j.cmet.2017.09.019.
9. K. Forslund et al., Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature* **528**, 262–266 (2015), 10.1038/nature15766.
10. G. G. Graham et al., Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin. Pharmacokinet.* **50**, 81–98 (2011), 10.2165/11534750-000000000-00000.
11. C. Wilcock, C. J. Bailey, Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse. *Xenobiotica* **24**, 49–57 (1994), 10.3109/00498259409043220.
12. J. B. Jensen et al., [¹¹C]-labeled metformin distribution in the liver and small intestine using dynamic positron emission tomography in mice demonstrates tissue-specific transporter dependency. *Diabetes* **65**, 1724–1730 (2016), 10.2337/db16-0032.
13. E. Bonora et al., Lack of effect of intravenous metformin on plasma concentrations of glucose, insulin, C-peptide, glucagon and growth hormone in non-diabetic subjects. *Curr. Med. Res. Opin.* **9**, 47–51 (1984), 10.1185/03007998409109558.
14. C. F. Sum et al., The effect of intravenous metformin on glucose metabolism during hyperglycaemia in type 2 diabetes. *Diabet Med.* **9**, 61–65 (1992), 10.1111/j.1464-5491.1992.tb01716.x.
15. J. B. Buse et al., The primary glucose-lowering effect of metformin resides in the gut, not the circulation: Results from short-term pharmacokinetic and 12-week dose-ranging studies. *Diabetes Care* **39**, 198–205 (2016), 10.2337/dc15-0488.
16. R. R. Henry et al., Improved glycemic control with minimal systemic metformin exposure: Effects of metformin delayed-release (Metformin DR) targeting the lower bowel over 16 weeks in a randomized trial in subjects with type 2 diabetes. *PLoS One* **13**, e0203946 (2018), 10.1371/journal.pone.0203946.
17. E. Gontier et al., High and typical 18F-FDG bowel uptake in patients treated with metformin. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **35**, 95–99 (2008), 10.1007/s00259-007-0563-6.
18. A. K. Madiraju et al., Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature* **510**, 542–546 (2014), 10.1038/nature13270.
19. F. A. Duca et al., Metformin activates a duodenal Ampk-dependent pathway to lower hepatic glucose production in rats. *Nat. Med.* **21**, 506–511 (2015), 10.1038/nm.3787.
20. B. Thorens, Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes. *Am. J. Physiol.* **270**, G541–G553 (1996), 10.1152/ajpgi.1996.270.4.G541.
21. Y. Sakar et al., Positive regulatory control loop between gut leptin and intestinal GLUT2/GLUT5 transporters links to hepatic metabolic functions in rodents. *PLoS One* **4**, e9735 (2009), 10.1371/journal.pone.0007935.

22. J. Pácha, Development of intestinal transport function in mammals. *Physiol. Rev.* **80**, 1633–1667 (2000), 10.1152/physrev.2000.80.4.1633.
23. A. P. Coll *et al.*, GDF15 mediates the effects of metformin on body weight and energy balance. *Nature* **578**, 444–448 (2020), 10.1038/s41586-019-1911-y.
24. B. Selvarajah *et al.*, mTORC1 amplifies the ATF4-dependent de novo serine-glycine pathway to supply glycine during TGF- β . *Sci. Signal* **12**, eaav3048 (2019), 10.1126/scisignal.aav3048.
25. D. A. Kane, Lactate oxidation at the mitochondria: A lactate-malate-aspartate shuttle at work. *Front. Neurosci.* **8**, 366 (2014), 10.3389/fnins.2014.00366.
26. A. Vancura, P. Bu, M. Bhagwat, J. Zeng, I. Vancurova, Metformin as an anticancer agent. *Trends Pharmacol. Sci.* **39**, 867–878 (2018), 10.1016/j.tips.2018.07.006.
27. M. M. Adeva-Andany, E. Rantal-Muino, C. Fernández-Fernández, C. Pazos-García, M. Vila-Altesor, Metabolic effects of metformin in humans. *Curr. Diabetes Rev.* **15**, 328–339 (2019), 10.2174/1573399814666181009125348.
28. D. B. Keech, M. F. Utter, Pyruvate carboxylase II properties. *J. Biol. Chem.* **238**, 2609–2614 (1963).
29. X. Liu *et al.*, Acetate production from glucose and coupling to mitochondrial metabolism in mammals. *Cell* **175**, 502–513.e513 (2018), 10.1016/j.cell.2018.08.040.
30. L. Liang, Q. Li, L. Huang, D. Li, X. Li, Sirt3 binds to and deacetylates mitochondrial pyruvate carrier 1 to enhance its activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **468**, 807–812 (2015), 10.1016/j.bbrc.2015.11.036.
31. L. R. Gray *et al.*, Hepatic mitochondrial pyruvate carrier 1 is required for efficient regulation of gluconeogenesis and whole-body glucose homeostasis. *Cell Metab.* **22**, 669–681 (2015), 10.1016/j.cmet.2015.07.027.
32. S. S. Vadvalkar *et al.*, Decreased mitochondrial pyruvate transport activity in the diabetic heart: Role of mitochondrial pyruvate carrier 2 (MPC2) acetylation. *J. Biol. Chem.* **292**, 4423–4433 (2017), 10.1074/jbc.M116.753509.
33. M. Stumvoll, N. Nurjhan, G. Perriello, G. Dailey, J. E. Gerich, Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* **333**, 550–554 (1995), 10.1056/NEJM199508313330903.
34. T. Narita, B. T. Weinert, C. Choudhary, Functions and mechanisms of non-histone protein acetylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 156–174 (2019), 10.1038/s41580-018-0081-3.
35. P. Mews *et al.*, Acetyl-CoA synthetase regulates histone acetylation and hippocampal memory. *Nature* **546**, 381–386 (2017), 10.1038/nature22405.
36. Z. T. Schug, J. Vande Voorde, E. Gottlieb, The metabolic fate of acetate in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 708–717 (2016), 10.1038/nrc.2016.87.
37. C. Yang *et al.*, FBP1 binds to the bromodomain of BRD4 to inhibit pancreatic cancer progression. *Am. J. Cancer Res.* **10**, 523–535 (2020).
38. R. A. V. Bell, K. B. Storey, Stable suppression of skeletal muscle fructose-1,6-bisphosphatase during ground squirrel hibernation: Potential implications of reversible acetylation as a regulatory mechanism. *Cryobiology* **102**, 97–103 (2021), 10.1016/j.cryobiol.2021.07.006.
39. R. W. Hunter *et al.*, Metformin reduces liver glucose production by inhibition of fructose-1,6-bisphosphatase. *Nat. Med.* **24**, 1395–1406 (2018), 10.1038/s41591-018-0159-7.
40. O. Chan, R. S. Sherwin, Is there cross talk between portal and hypothalamic glucose-sensing circuits? *Diabetes* **63**, 2617–2619 (2014), 10.2337/db14-0755.
41. C. M. Donovan, Portal vein glucose sensing. *Diabetes Nutr. Metab.* **15**, 308–312 (2002), discussion 313–304.
42. C. T. Pau, C. Keefe, J. Duran, C. K. Welt, Metformin improves glucose effectiveness, not insulin sensitivity: Predicting treatment response in women with polycystic ovary syndrome in an open-label, interventional study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **99**, 1870–1878 (2014), 10.1210/jc.2013-4021.
43. T. Yoshida *et al.*, Metformin primarily decreases plasma glucose not by gluconeogenesis suppression but by activating glucose utilization in a non-obese type 2 diabetes Goto-Kakizaki rats. *Eur. J. Pharmacol.* **623**, 141–147 (2009), 10.1016/j.ejphar.2009.09.003.
44. T. Ma *et al.*, Low-dose metformin targets the lysosomal AMPK pathway through PEN2. *Nature* **603**, 159–165 (2022), 10.1038/s41586-022-04431-8.
45. C. J. Bailey, K. J. Mynett, T. Page, Importance of the intestine as a site of metformin-stimulated glucose utilization. *Br. J. Pharmacol.* **112**, 671–675 (1994).
46. L. Pénicaud, Y. Hittler, P. Ferré, J. Girard, Hypoglycaemic effect of metformin in genetically obese (fa/fa) rats results from an increased utilization of blood glucose by intestine. *Biochem. J.* **262**, 881–885 (1989), 10.1042/bj2620881.
47. G. B. Warren, K. F. Tipton, Pig liver pyruvate carboxylase. Purification, properties and cation specificity. *Biochem. J.* **139**, 297–310 (1974), 10.1042/bj1390297.
48. L. David, M. M. C. Nelson, *Lehninger Principles of Biochemistry* (ed. 6, 2013).
49. C. Corbet *et al.*, Interruption of lactate uptake by inhibiting mitochondrial pyruvate transport unravels direct antitumor and radiosensitizing effects. *Nat. Commun.* **9**, 1208 (2018), 10.1038/s41467-018-03525-0.
50. R. A. Miller *et al.*, Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature* **494**, 256–260 (2013), 10.1038/nature11808.
51. A. K. Madiraju *et al.*, Metformin inhibits gluconeogenesis via a redox-dependent mechanism in vivo. *Nat. Med.* **24**, 1384–1394 (2018), 10.1038/s41591-018-0125-4.
52. A. Alshawi, L. Agius, Low metformin causes a more oxidized mitochondrial NADH/NAD redox state in hepatocytes and inhibits gluconeogenesis by a redox-independent mechanism. *J. Biol. Chem.* **294**, 2839–2853 (2019), 10.1074/jbc.RA118.006670.
53. T. Moonira *et al.*, Metformin lowers glucose 6-phosphate in hepatocytes by activation of glycolysis downstream of glucose phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **295**, 3330–3346 (2020), 10.1074/jbc.RA120.012533.
54. A. L. Hevener, R. N. Bergman, C. M. Donovan, Portal vein afferents are critical for the sympathoadrenal response to hypoglycemia. *Diabetes* **49**, 8–12 (2000), 10.2337/diabetes.49.1.8.
55. A. R. Konopka *et al.*, Hyperglucagonemia mitigates the effect of metformin on glucose production in prediabetes. *Cell Rep.* **15**, 1394–1400 (2016), 10.1016/j.celrep.2016.04.024.
56. R. J. Perry *et al.*, Glucagon stimulates gluconeogenesis by INSP3R1-mediated hepatic lipolysis. *Nature* **579**, 279–283 (2020), 10.1038/s41586-020-2074-6.
57. G. Jiang, B. B. Zhang, Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **284**, E671–E678 (2003), 10.1152/ajpendo.00492.2002.
58. M. D. Lou *et al.*, Glucagon up-regulates hepatic mitochondrial pyruvate carrier 1 through cAMP-responsive element-binding protein; inhibition of hepatic gluconeogenesis by ginsenoside Rb1. *Br. J. Pharmacol.* **176**, 2962–2976 (2019), 10.1111/bph.14758.
59. S. J. Pilakis, J. P. Riou, T. H. Claus, Hormonal control of [14C]glucose synthesis from [U-14C] dihydroxyacetone and glycerol in isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **251**, 7841–7852 (1976).
60. C. M. Veneziale, Gluconeogenesis from fructose in isolated rat liver stimulation by glucagon. *Biochemistry* **10**, 3443–3447 (1971), 10.1021/bi00794a020.
61. A. E. S. S. Gonçalves *et al.*, Pulmonary hypertension in obese mice is accompanied by a reduction in PPAR- γ expression in pulmonary artery. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **12**, 701994 (2021), 10.3389/fendo.2021.701994.
62. C. Handschin *et al.*, Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1 α muscle-specific knock-out animals. *J. Biol. Chem.* **282**, 30014–30021 (2007), 10.1074/jbc.M704817200.
63. H. Nam *et al.*, Synergistic inhibitory effects of hypoxia and iron deficiency on hepatic glucose response in mouse liver. *Diabetes* **65**, 1521–1533 (2016), 10.2337/db15-0580.
64. K. Łabuzek *et al.*, Quantification of metformin by the HPLC method in brain regions, cerebrospinal fluid and plasma of rats treated with lipopolysaccharide. *Pharmacol. Rep.* **62**, 956–965 (2010), 10.1016/s1734-1140(10)70357-1.

Supporting Information for Metformin acts in the gut and induces gut-liver crosstalk

Natália Tobar^{1§}, Guilherme Z. Rocha^{1§}, Andrey Santos¹, Dioze Guadagnini¹, Heloísa B. Assalin¹, Juliana A. Camargo¹, Any E. S. S. Gonçalves¹, Flavia R. Pallis¹, Alexandre G. Oliveira², Silvana A. Rocco³, Raphael M. Neto³, Irene Layane de Sousa³, Marcos R Alborghetti³, Maurício L Sforça³, Patrícia B. Rodrigues⁴, Raissa G .Ludwig⁵, Emerielle C. Vanzela⁶, Sergio Q. Brunetto⁷, Patrícia A. Boer¹, José A. R. Gontijo¹, Bruno Geloneze¹, Carla R. O. Carvalho⁸, Patricia O. Prada^{1,9}, Franco Folli^{1,13}, Rui Curi¹⁰, Marcelo A. Mori⁵, Marco A R. Vinolo⁴, Celso D. Ramos¹¹, Kleber G. Franchini³, Claudio F. Tormena¹², Mario J. A. Saad^{1*}.

1 Department of Internal Medicine, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil

2 Department of Physical Education, São Paulo State University (UNESP), Rio Claro, Brazil

3 Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio) and Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Campinas, Brazil.

4 Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, Brazil

5 Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

6 Department of Structural and Functional Biology, University of Campinas

7 Biomedical Engineering Center, University of Campinas, Campinas, Brazil

8 Institute Biomedical Sciences, University of Sao Paulo-Department of Physiology and Biophysica

9 School of Applied Sciences, University of Campinas, Limeira, Brazil

10 Butantan Institute-São Paulo, Brazil

11 Division of Nuclear Medicine, Department of Radiology, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil.

12 Institute of Chemistry, University of Campinas.

13 Current address: Departmental Unit of Diabetes, Endocrinology and Metabolism, San Paolo Hospital, ASST Santi Paolo e Carlo; Department of Health Science, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy.

§ These authors contributed equally to this work

Corresponding authors:

Mario J. A. Saad; e-mail: msaad@unicamp.br

Guilherme Z. Rocha e-mail: gzrocha@gmail.com

This PDF file includes:

Supporting text

Figures S1 to S7

Tables S1 to S3

Supporting Information Text

Materials and Methods.

1. Real-time PCR

Probe for animal tissues: GLUT1- Slc2a1 (Mm00441480_m1), GLUT2 - Slc2a2 (Mm00446229_m1) and ATF4-Atf4(Mm00515325_g). GAPDH (4352339E), b-actin-ACTB (4352341E) or B2M (Mm00437762_m1) expression were used as endogenous control, and samples from control mice were used as calibrators. 100 ng of each cDNA sample were used in the reaction with the following probe for Caco2 cells SLC2A1 (Hs00892681_m1) and ATF4 (Hs00900959_g1). GAPDH (4333764T), ACTB (4333762T) or B2M (HS00187842_m1) expression were used as endogenous control, and samples from control Caco2 cells were used as calibrators. A negative "No Template Control" was also included for each primer pair. Three replicas were run on the same plate for each sample. Results are expressed as relative expression values

2. FDG-PET/CT imaging

The radioactive activity was measured prior to and following injection to verify the net injected dose. Sixty minutes after 18F-FDG injection, each animal was subjected to PET/CT imaging in a prone position. The scans were performed in PET/CT imaging system (Siemens – Biograph mCT40). A CT image was acquired for attenuation correction purposes. CT acquisition conditions were set to 70 kV, 155 mA, and 0.5 mm slice thickness. The only bed was scanned for 15 minutes from head to tail. A 3-dimensional reconstruction model was used to analyze: OSEM 3D with 24 subsets and 2 interactions. PET and CT images were fused through True D software (Siemens). Regions of interest (ROI) were drawn by the semi-quantitative method (Isocontour), determining the maximal 18F-FDG uptake (SUV_{max} - standardized uptake value) in the intestine and in other tissues. SUV is defined as $(A \cdot W) / A_{inj}$, where A (Bq/mL) is the radioactivity measured in a ROI, W (g) is the animal weight, and A_{inj} (Bq) is the activity of 18F-FDG injected. SUV_{max} is more accurate to estimate the true SUV than SUV mean for this kind of analysis.

3. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

¹H and ¹³C NMR spectroscopy-pyruvate injection

A 1.5 s relaxation delay was incorporated between scans, during which a continual water pre-saturation radio frequency (RF) field was applied to eliminate residual water signal.

3.1 Sample preparation and spectra acquisition

Tissue samples were washed with cold saline (0.9% NaCl) and immediately ground to a powder under liquid nitrogen and kept in the -80°C freezer until the analysis by NMR. Powdered tissues samples were added to a cold methanol/chloroform solution (2:1 v/v, total of 0.5 mL) and sonicated (VCX 500, Vibra-Cell, Sonics & Material Inc., USA) for 3 min with a 10 s pause interval between each minute. A cold chloroform/deionized water solution (1:1 v/v, total of 0.5 mL) was then added to the samples. Samples were briefly vortexed and centrifuged at 3.1×10^3 g for 20 min at 4 °C. The upper phase was collected and dried in a vacuum concentrator (miVac Duo Concentrator, GeneVac, UK). The remaining solid phase was rehydrated in 0.6 mL of D₂O-containing phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) and 0.5 mM of TMSPd₄. Samples were added to a 5 mm NMR tube for immediate acquisition. ¹H-NMR spectra were acquired using a Varian Inova® spectrometer (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) equipped with a triple-resonance cold probe and operating at a ¹H resonance frequency of 600 MHz. Spectra acquisition was performed with 256 scans collected with 32 K data points over a spectral width of 8000 Hz. A 1.5-s relaxation delay was incorporated between scans, during which a continual water pre-saturation radio frequency (RF) field was applied to eliminate residual water signal.

3.2 Quantification of metabolites

The metabolites were processed and quantified using NMR Suite software version 8.1 (Chenomx Inc™, Edmonton, AB, Canada). The processor module of this software was used to adjust the

spectral phase and baseline corrections. A 0.5 Hz line-broadening function was used to reduce signal noise and facilitate the fitting of the metabolite signals in spectral peaks. The water signal was suppressed, and the spectra were calibrated using the reference signal of the TMSP-d4 as 0.5 mM. The spectra were individually transferred to the Profiling module of this software to determine the metabolomic profile of each group. Metabolites were identified, and their concentrations were measured. Metabolite concentration data were exported to Excel® (Microsoft Office™ 365) and normalized when necessary.

A

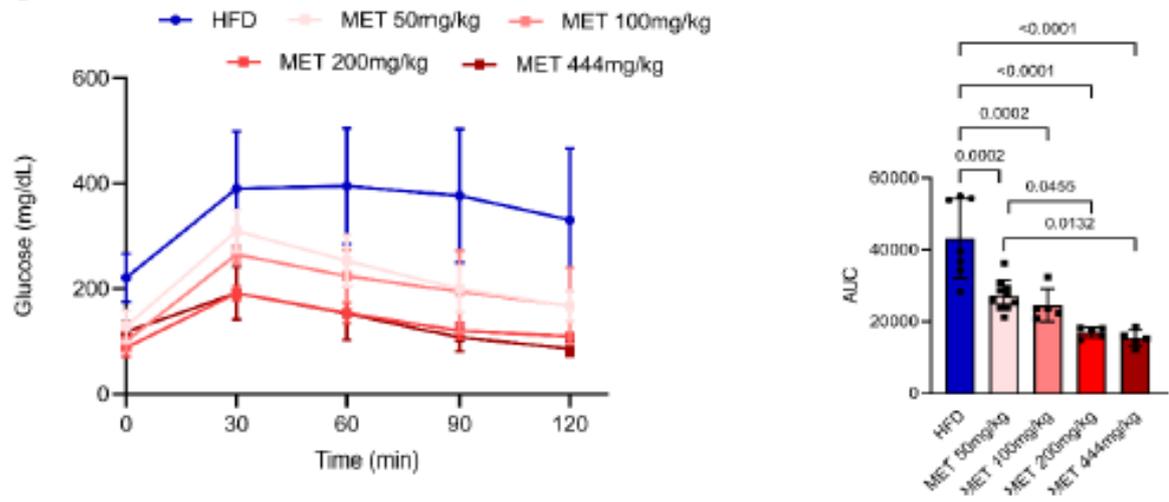


Fig. S1: A. Blood glucose levels from HFD and different doses of MET treated mice during a glucose tolerance test (GTT) and area under curve.

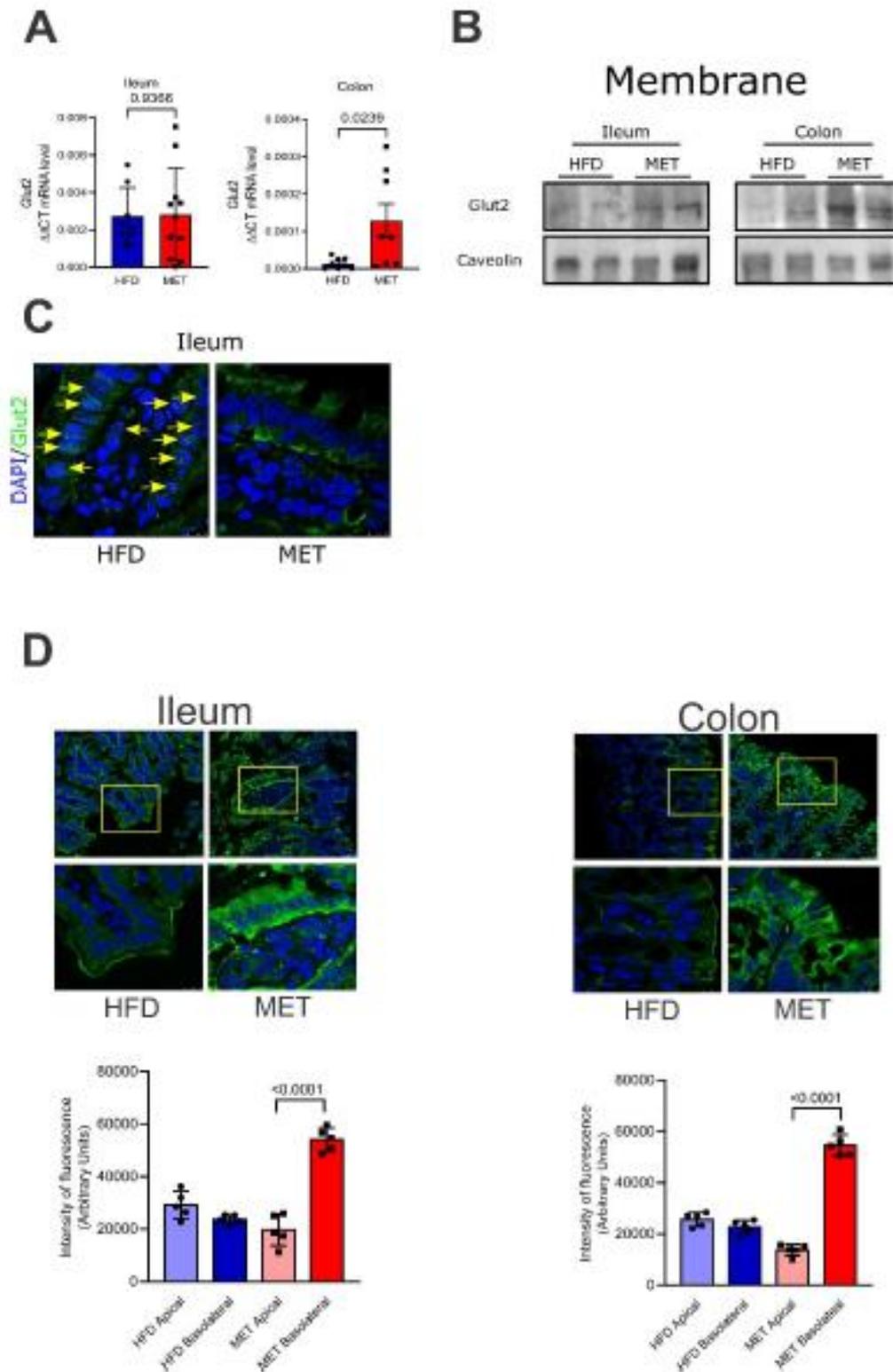
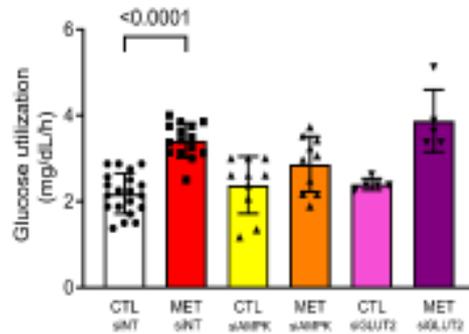
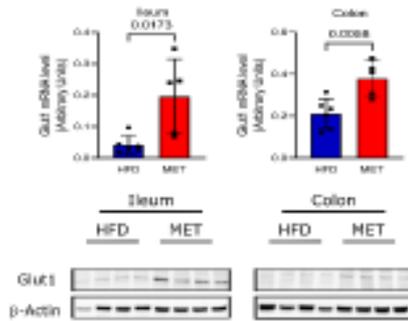


Fig. S2: A, Glut-2 mRNA expression in ileum and colon from HFD and MET mice (444 mg/kg for 10 days) B, Cytoplasmic membrane Glut-2 protein expression in ileum and colon from HFD and MET mice (444 mg/kg for 10 days). C, Confocal images of Glut-2 expression in ileum of HFD and MET mice (444 mg/kg for 10 days), arrows indicate nuclear localization of Glut-2. D, Confocal images of Glut-2 expression in the ileum and colon of HFD and MET mice and the corresponding bar graph indicated translocation of Glut-2 from the apical to the basolateral side after metformin.

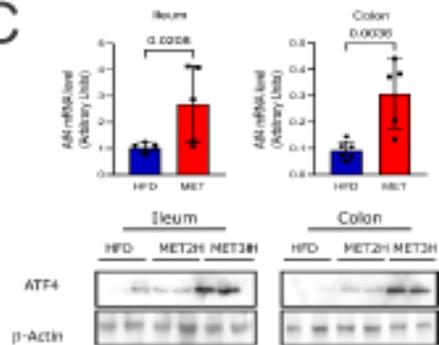
A Glucose 5 mM



B



C



D

Glucose 5 mM

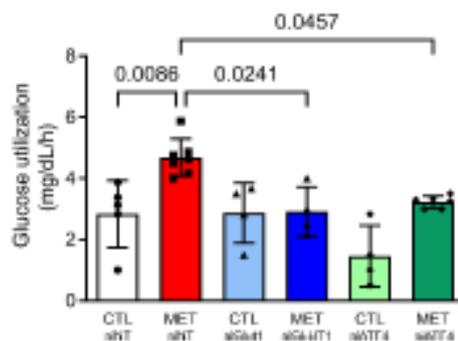


Fig. S3: A, Glucose uptake in physiological (5 mM) glucose concentrations in CaCo2 cells after the incubation with metformin (MET) in cells pre-treated with siRNA of AMPK and GLUT2 an non-targeting, as control (siNT) and protein expression showing the effect of the gene silencing. **B**, Glut-1 mRNA and protein expression in ileum and colon from HFD and MET mice (444 mg/kg for 10 days). **C**, ATF-4 mRNA expression in ileum and colon from HFD and MET mice (444 mg/kg for 10 days), and time course of metformin-induced (444 mg/kg) ATF4 protein expression in ileum and colon (n=6). **D**, Glucose uptake in physiological (5 mM) glucose concentrations in CaCo2 cells after the incubation with metformin (MET) in cells pre-treated with siRNA of GLUT1 and ATF4 an non-targeting, as control (siNT).

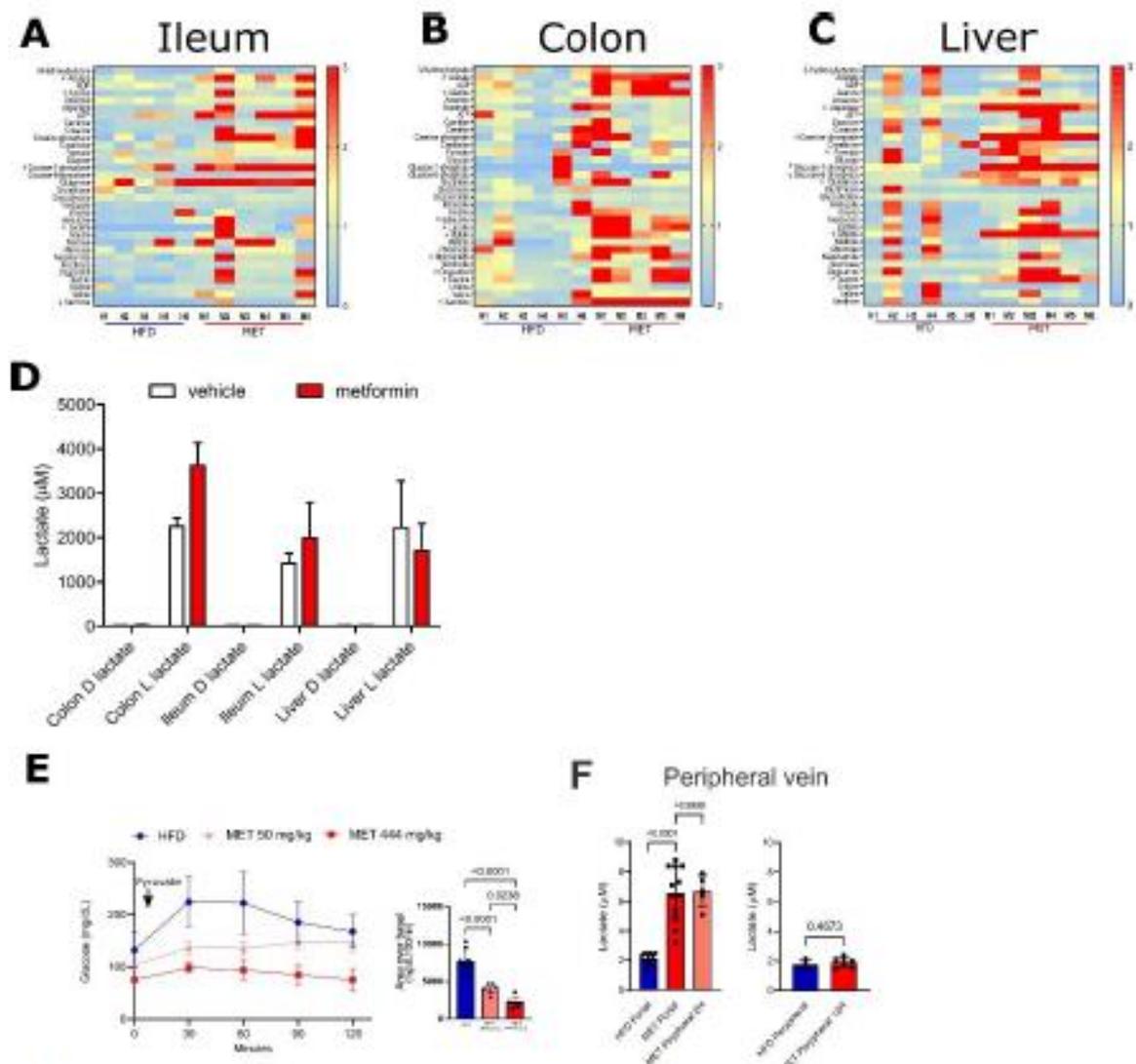


Fig S4: Metformin increases glucose anaerobic metabolism in ileum and colon and reduces hepatic glucose output in animals on HFD. A, B and C, Metabolomic analysis of ileum, colon, and liver from HFD and MET treated mice (444mg/kg for 10 days). D, RMN-spectroscopy analysis of lactate in ileum, colon and liver from the HFD and MET mice treated for 10 days (one-way ANOVA and Bonferroni's test, $p < 0.05$, $n = 3$). E, Pyruvate tolerance test curve and area over basal from HFD and MET (50 mg/kg and 444 mg/kg) treated mice ($n = 6$). F, Lactate in blood from portal and peripheral vein 2 h and 12 h after metformin treatment in Wistar rats.

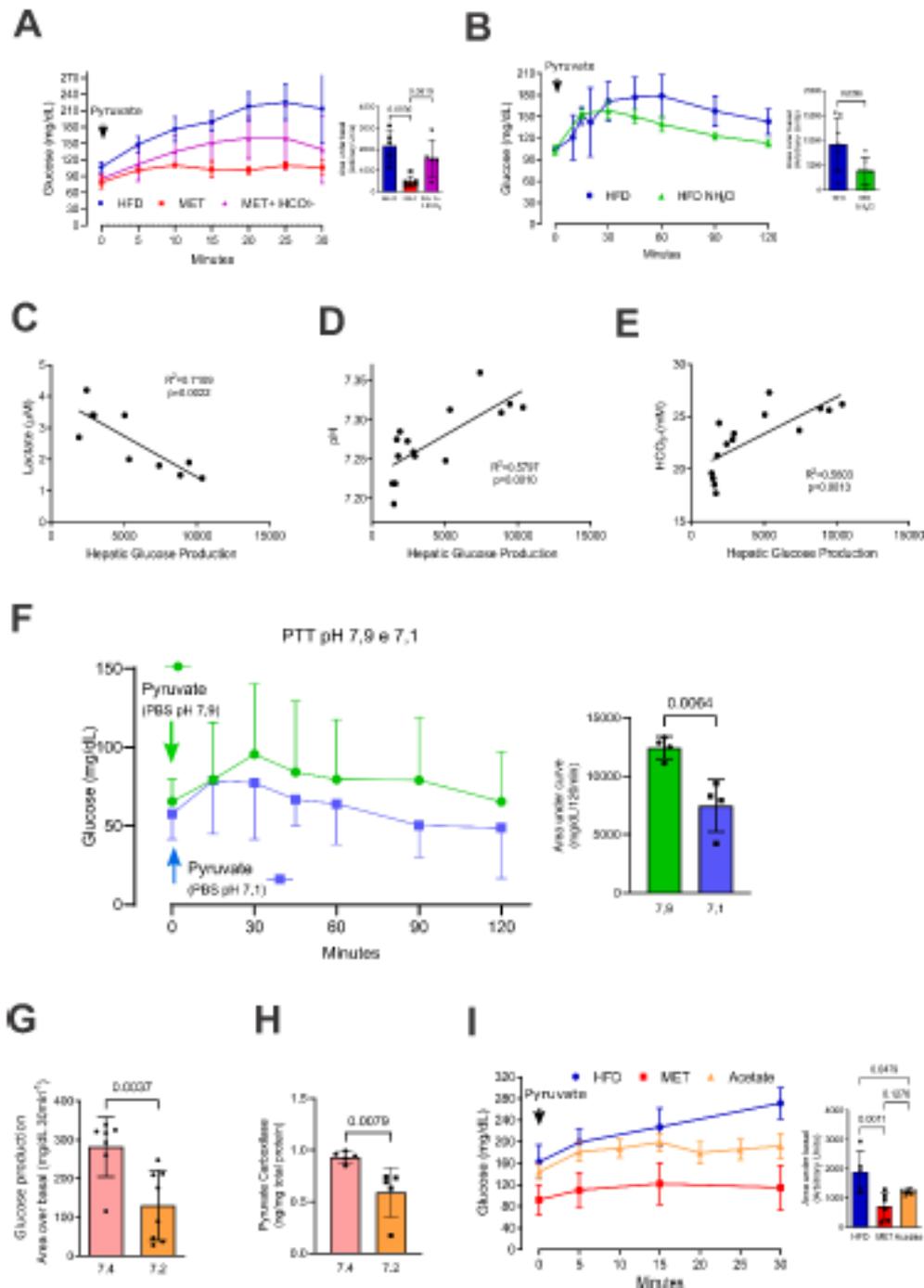


Fig. S5: A, Pyruvate tolerance test (30 min) curve and area over basal from Wistar rats on HFD, MET treated rats and MET (250 mg/kg) treated rats submitted to an ip injection of sodium bicarbonate (500 mg/kg) 30 min before pyruvate administration (n=5-6). B, Pyruvate tolerance test curve and area over basal of Wistar rats from HFD and HFD treated for 2 days by gavage with ammonium chloride (0.25M) (n=7). C Negative correlation between portal lactate levels and hepatic glucose production in obese rats treated or not with metformin (n=9). D and E, Positive correlation between pH or bicarbonate with hepatic glucose output in obese rats treated or not with metformin (n=15). F, Pyruvate tolerance test (120 min) curve and area over basal of control mice. The pyruvate (1.5g/kg) was diluted in PBS pH:7.9 or pH:7.1. G, reduced glucose production after a decrease in pH from 7.4 to 7.2. H, pyruvate carboxylase protein expression in Huh7 cells in different pH. I, Pyruvate tolerance test (30 min) curve and area over basal from Wistar rats on HFD, MET and MET submitted to an i.p. injection of sodium acetate (50 mg/kg) (n=5-8).

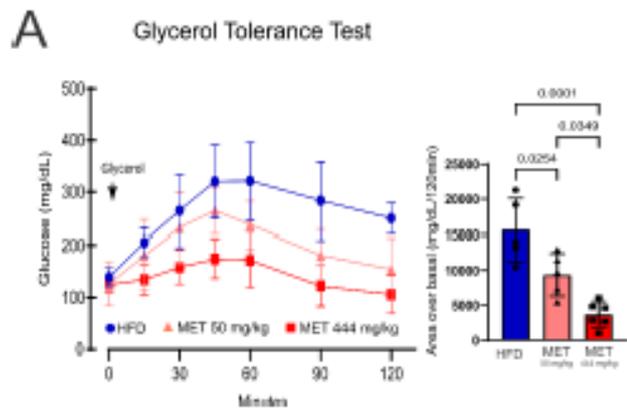


Fig. S6: A, Glycerol tolerance test curve and area under curve of mice treated with metformin at low (50 mg/kg) and high dose (444 mg/kg) ($n=5$).

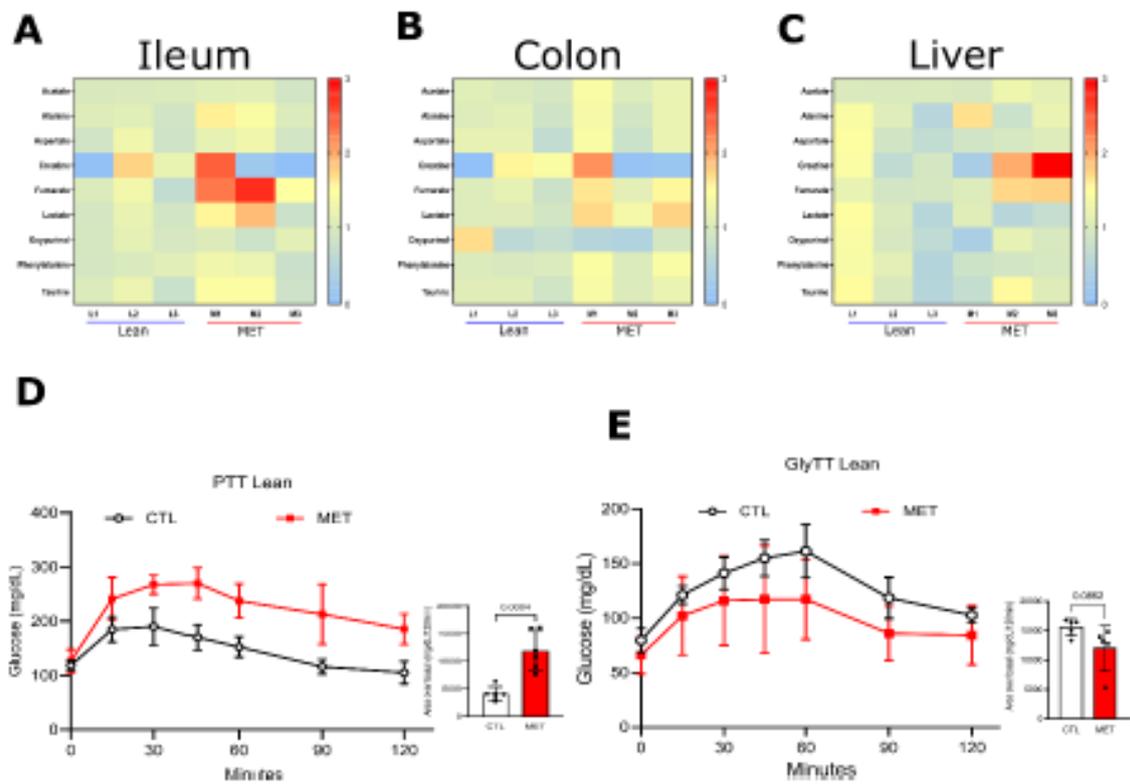


Fig. S7: A, B and C, Metabolomic analysis of ileum, colon and liver from lean mice treated with vehicle or and MET (50 mg/kg for 10 days) (n=3). D, Pyruvate and E, Glycerol tolerance tests curve and area under curve of metformin treated lean mice at low dose 50 mg/kg (n=5).

Table S1. Baseline Features of Study Participants by Treatment Group

	CTL	DM	DM+MET	p-value
Sex (M/F)	8/3	2/3	9/7	0.2517
Age (years)	52	62	58	CTL vs DM 0.6195 CTL vs DM+MET 0.8957 D vs D MET >0.9999
BMI (kg/m²)	22.3	25.7	27.3	CTL vs DM 0.3025 CTL vs DM+MET 0.0115 D vs D MET 0.6969
Glucose (mg/dL)	89	112	125	CTL vs DM 0.5618 CTL vs DM+MET 0.0027 DM vs DM+ MET 0.1988
Antihypertensive treatment (%)	60%	60%	75%	0.2390

Table S2 Metformin concentration in portal vein and tissues after treatment with 50 mg/kg or 444 mg/kg for ten days in HFD mice. Samples from portal vein, liver and ileum were collected two hours after and colon eight hours after last gavage.

Tissue	Metformin		p-value
	50 mg/kg	444 mg/kg	
Portal vein ($\mu\text{mol/L}$)	10,4 \pm 4,2	25,1 \pm 3,9	0,000434
Liver ($\mu\text{mol/kg}$ wet weight)	157,2 \pm 63,8	317,3 \pm 114,4	0,02572
Ileum ($\mu\text{mol/kg}$ wet weight)	539,9 \pm 257,7	814,8 \pm 514,9	0,317006
Colon ($\mu\text{mol/kg}$ wet weight)	824,5 \pm 178,5	1013,9 \pm 142,2	0,100479

Table S3. Conditions and parameters to be used for HPLC-UV analyses of metformin in plasma and tissues matrices.

HPLC system	Waters Alliance 2695 (Milford, MA, USA), equipped with a quaternary pump, sample manager, and degasser	
Detector	Waters 2996 Uv-Vis set in 210-400 nm range	
System control, data acquisition, and processing	Waters Empower 2002 chromatography software	
Column	XSelect CSH™ Fluoro-Phenyl (150 x 4.6 mm I.D.; 3.5 μ m particle size) Waters	
Guard Column	XSelect CSH™ Fluoro-Phenyl (20 x 4.6 mm I.D.; 3.5 μ m particle size) Waters	
Mobile phase	Solvent A- Acetonitrile Solvent B- 0.010 M ammonium acetate, pH 7.6	
Isocratic conditions	Time (min.)	8
	A (%)	47.8
	B(%)	52.2
	Flow	1.0 mL/min
	Injection volume	25 μ L
	Temperature	30°C
	Metformin and DMAP (IS) Detections	UV @ 233 and 280 nm
	Run time	8 minutes

6. CONCLUSÕES

Em condições hiperglicêmicas, a metformina induz a expressão de GLUT1 e GLUT2 no íleo e cólon, onde se espera que esses transportadores promovam a captação de glicose da circulação mesentérica. Nos enterócitos, a glicose é metabolizada em lactato, o que diminuirá o pH e os níveis de NaHCO_3^- na veia porta e conseqüentemente a gliconeogênese, por meio da inibição da enzima piruvato carboxilase, crítica para esse processo. Paralelamente, um aumento na produção de acetato no intestino acarretará a acetilação e inibição de MPC1/2, levando ao acúmulo citosólico de piruvato, o que, por sua vez, impede a captação extracelular de lactato através de MCT1. Além disso, a acetilação bloqueia também FBP1, outra enzima chave para a neoglicogênese hepática. Assim, esses mecanismos demonstram que a metformina estabelece um *crosstalk* entre o intestino e o fígado para reduzir a gliconeogênese face à hiperglicemia.

Em condições normoglicêmicas, por sua vez, o fármaco também induz a expressão de GLUT1 e GLUT2, mas considerando o Km desses transportadores, espera-se que o GLUT1 em particular seja utilizado para aumentar modestamente a captação intestinal. Nesse contexto, a elevação nos níveis de lactato é discreta e nenhuma alteração no equilíbrio ácido-base na veia porta é observada. O aumento moderado na captação intestinal leva à hipoglicemia na veia porta, que pode induzir a detecção de glicose neste local e uma possível resposta contrarregulatória, evitando a diminuição da PHG ou até mesmo aumentando-a. É importante ressaltar que outras ações da metformina diretamente no fígado podem ser sinérgicas com o *crosstalk* demonstrado a fim de reduzir a PHG; no entanto, em condições de normoglicemia, mecanismos contrarregulatórios podem ser capazes de superá-las.

Em resumo, nossos dados demonstram mecanismos de ação da metformina que integram intestino e fígado, sem excluir o efeito direto da droga nas enzimas hepáticas. Assim, a metformina tem propriedades farmacológicas únicas, modulando a captação intestinal de glicose, como efeito primário e, portanto, principal, e induzindo o *crosstalk* metabólico intestino-fígado secundariamente, que regula a PHG em direções opostas, a depender dos níveis iniciais de glicose no sangue.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1796-808.
2. Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000;404(6778):635-43.
3. Wing RR, Goldstein MG, Acton KJ, Birch LL, Jakicic JM, Sallis JF, Jr., et al. Behavioral science research in diabetes: lifestyle changes related to obesity, eating behavior, and physical activity. *Diabetes Care*. 2001;24(1):117-23.
4. Pinhas-Hamiel O, Dolan LM, Daniels SR, Standiford D, Khoury PR, Zeitler P. Increased incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus among adolescents. *J Pediatr*. 1996;128(5 Pt 1):608-15.
5. Robertson RP, Nathan DM, Rubinow K. Type 2 diabetes mellitus: Prevalence and risk factors 2023 29/06/2023. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/type-2-diabetes-mellitus-prevalence-and-risk-factors#>.
6. Federation ID. IDF Atlas 10th edition. International Diabetes Federation. 2021.
7. Organization WH. World health statistics 2023: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals. 2023.
8. GLOBAL REPORT ON DIABETES [Internet]. 2016 [cited 17/04/2020]. Available from: www.who.int.
9. Association AD. Standards of medical care in diabetes--2006. *Diabetes Care*. 2006;29 Suppl 1:S4-42.
10. Krentz AJ, Bailey CJ. Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus. *Drugs*. 2005;65(3):385-411.
11. Matos MCG, Branchtein L. O uso de antidiabéticos orais no paciente com diabetes mellitus e doença cardíaca. *Revista da Sociedade de Cardiologia do Rio Grande do Sul*. 2006;1-4.
12. D. Carvalho, Nunes JS, Raposo JF, Medina JL, Castro Jd, Carrilho F. Agonistas dos Receptores do GLP-1 no Tratamento da Diabetes Tipo 2. *Revista Portuguesa de Diabetes*. 2016;11.
13. Filho R, Albuquerque L, Cavalcanti S, Tambascia M, Valente F, Bertoluci M. Tratamento farmacológico da hiperglicemia no DM2. *Diretriz Oficial da Sociedade Brasileira de Diabetes (2022)* 2023 19/07/2023:[50 p.].
14. Hundal RS, Krssak M, Dufour S, Laurent D, Lebon V, Chandramouli V, et al. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. *Diabetes*. 2000;49(12):2063-9.
15. Inzucchi SE, Maggs DG, Spollett GR, Page SL, Rife FS, Walton V, et al. Efficacy and metabolic effects of metformin and troglitazone in type II diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1998;338(13):867-72.
16. Sauer WH, Cappola AR, Berlin JA, Kimmel SE. Insulin sensitizing pharmacotherapy for prevention of myocardial infarction in patients with diabetes mellitus. *Am J Cardiol*. 2006;97(5):651-4.
17. Johnson JA, Majumdar SR, Simpson SH, Toth EL. Decreased mortality associated with the use of metformin compared with sulfonylurea monotherapy in type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2002;25(12):2244-8.

18. Katakami N, Yamasaki Y, Hayaishi-Okano R, Ohtoshi K, Kaneto H, Matsuhisa M, et al. Metformin or gliclazide, rather than glibenclamide, attenuate progression of carotid intima-media thickness in subjects with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2004;47(11):1906-13.
19. Wu T, Horowitz M, Rayner CK. New insights into the anti-diabetic actions of metformin: from the liver to the gut. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;11(2):157-66.
20. Bailey CJ, Day C. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes Care*. 1989;12(8):553-64.
21. Witters LA. The blooming of the French lilac. *J Clin Invest*. 2001;108(8):1105-7.
22. Diamanti-Kandarakis E, Christakou CD, Kandaraki E, Economou FN. Metformin: an old medication of new fashion: evolving new molecular mechanisms and clinical implications in polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*. 2010;162(2):193-212.
23. Hollenbeck CB, Johnston P, Varasteh BB, Chen YD, Reaven GM. Effects of metformin on glucose, insulin and lipid metabolism in patients with mild hypertriglyceridaemia and non-insulin dependent diabetes by glucose tolerance test criteria. *Diabete Metab*. 1991;17(5):483-9.
24. Huttunen KM, Rautio J, Leppänen J, Vepsäläinen J, Keski-Rahkonen P. Determination of metformin and its prodrugs in human and rat blood by hydrophilic interaction liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal*. 2009;50(3):469-74.
25. Group U. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*. 1998;352(9131):837-53.
26. Selvin E, Bolen S, Yeh HC, Wiley C, Wilson LM, Marinopoulos SS, et al. Cardiovascular outcomes in trials of oral diabetes medications: a systematic review. *Arch Intern Med*. 2008;168(19):2070-80.
27. Group U. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*. 1998;352(9131):854-65.
28. Markowicz-Piasecka M, Huttunen KM, Mateusiak L, Mikiciuk-Olasik E, Sikora J. Is Metformin a Perfect Drug? Updates in Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Curr Pharm Des*. 2017;23(17):2532-50.
29. Palomba S, Falbo A, Zullo F, Orio F. Evidence-based and potential benefits of metformin in the polycystic ovary syndrome: a comprehensive review. *Endocr Rev*. 2009;30(1):1-50.
30. Batchuluun B, Inoguchi T, Sonoda N, Sasaki S, Inoue T, Fujimura Y, et al. Metformin and liraglutide ameliorate high glucose-induced oxidative stress via inhibition of PKC-NAD(P)H oxidase pathway in human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2014;232(1):156-64.
31. Stumvoll M, Nurjhan N, Perriello G, Dailey G, Gerich JE. Metabolic effects of metformin in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1995;333(9):550-4.
32. Cusi K, Consoli A, DeFronzo RA. Metabolic effects of metformin on glucose and lactate metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81(11):4059-67.
33. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. 2001;108(8):1167-74.
34. Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, et al. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science*. 2005;310(5754):1642-6.

35. HOLLUNGER G. Guanidines and oxidative phosphorylations. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 1955;11(Suppl 1):1-84.
36. He L, Sabet A, Djedjos S, Miller R, Sun X, Hussain MA, et al. Metformin and insulin suppress hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB binding protein. *Cell*. 2009;137(4):635-46.
37. Cool B, Zinker B, Chiou W, Kifle L, Cao N, Perham M, et al. Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab*. 2006;3(6):403-16.
38. Bailey CJ. Metformin: historical overview. *Diabetologia*. 2017;60(9):1566-76.
39. Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, Viollet B. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab*. 2014;20(6):953-66.
40. Yuan L, Ziegler R, Hamann A. Metformin modulates insulin post-receptor signaling transduction in chronically insulin-treated Hep G2 cells. *Acta Pharmacol Sin*. 2003;24(1):55-60.
41. Ashokkumar N, Pari L. Effect of N-benzoyl-D-phenylalanine and metformin on carbohydrate metabolic enzymes in neonatal streptozotocin diabetic rats. *Clin Chim Acta*. 2005;351(1-2):105-13.
42. Gunton JE, Delhanty PJ, Takahashi S, Baxter RC. Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(3):1323-32.
43. Cheng JT, Huang CC, Liu IM, Tzeng TF, Chang CJ. Novel mechanism for plasma glucose-lowering action of metformin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*. 2006;55(3):819-25.
44. Mithieux G, Guignot L, Bordet JC, Wiernsperger N. Intrahepatic mechanisms underlying the effect of metformin in decreasing basal glucose production in rats fed a high-fat diet. *Diabetes*. 2002;51(1):139-43.
45. Lutz TA, Estermann A, Haag S, Scharrer E. Depolarization of the liver cell membrane by metformin. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1513(2):176-84.
46. Madiraju AK, Erion DM, Rahimi Y, Zhang XM, Braddock DT, Albright RA, et al. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature*. 2014;510(7506):542-6.
47. Guigas B, Demaille D, Chauvin C, Batandier C, De Oliveira F, Fontaine E, et al. Metformin inhibits mitochondrial permeability transition and cell death: a pharmacological in vitro study. *Biochem J*. 2004;382(Pt 3):877-84.
48. Fulgencio JP, Kohl C, Girard J, Pégrier JP. Effect of metformin on fatty acid and glucose metabolism in freshly isolated hepatocytes and on specific gene expression in cultured hepatocytes. *Biochem Pharmacol*. 2001;62(4):439-46.
49. McCreight LJ, Mari A, Coppin L, Jackson N, Umpleby AM, Pearson ER. Metformin increases fasting glucose clearance and endogenous glucose production in non-diabetic individuals. *Diabetologia*. 2020;63(2):444-7.
50. Perriello G, Misericordia P, Volpi E, Santucci A, Santucci C, Ferrannini E, et al. Acute antihyperglycemic mechanisms of metformin in NIDDM. Evidence for suppression of lipid oxidation and hepatic glucose production. *Diabetes*. 1994;43(7):920-8.
51. Hother-Nielsen O, Schmitz O, Andersen PH, Beck-Nielsen H, Pedersen O. Metformin improves peripheral but not hepatic insulin action in obese patients with type II diabetes. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1989;120(3):257-65.

52. Natali A, Ferrannini E. Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake in type 2 diabetes: a systematic review. *Diabetologia*. 2006;49(3):434-41.
53. Christensen MM, Højlund K, Hother-Nielsen O, Stage TB, Damkier P, Beck-Nielsen H, et al. Endogenous glucose production increases in response to metformin treatment in the glycogen-depleted state in humans: a randomised trial. *Diabetologia*. 2015;58(11):2494-502.
54. Wilcock C, Bailey CJ. Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse. *Xenobiotica*. 1994;24(1):49-57.
55. Bailey CJ, Wilcock C, Scarpello JH. Metformin and the intestine. *Diabetologia*. 2008;51(8):1552-3.
56. Stepensky D, Friedman M, Raz I, Hoffman A. Pharmacokinetic-pharmacodynamic analysis of the glucose-lowering effect of metformin in diabetic rats reveals first-pass pharmacodynamic effect. *Drug Metab Dispos*. 2002;30(8):861-8.
57. Wu T, Rayner CK, Horowitz M. Incretins. *Handb Exp Pharmacol*. 2016;233:137-71.
58. Phillips LK, Deane AM, Jones KL, Rayner CK, Horowitz M. Gastric emptying and glycaemia in health and diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(2):112-28.
59. Wu T, Thazhath SS, Bound MJ, Jones KL, Horowitz M, Rayner CK. Mechanism of increase in plasma intact GLP-1 by metformin in type 2 diabetes: stimulation of GLP-1 secretion or reduction in plasma DPP-4 activity? *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;106(1):e3-6.
60. Mulherin AJ, Oh AH, Kim H, Grieco A, Lauffer LM, Brubaker PL. Mechanisms underlying metformin-induced secretion of glucagon-like peptide-1 from the intestinal L cell. *Endocrinology*. 2011;152(12):4610-9.
61. Maida A, Lamont BJ, Cao X, Drucker DJ. Metformin regulates the incretin receptor axis via a pathway dependent on peroxisome proliferator-activated receptor- α in mice. *Diabetologia*. 2011;54(2):339-49.
62. Eissele R, Göke R, Willemer S, Harthus HP, Vermeer H, Arnold R, et al. Glucagon-like peptide-1 cells in the gastrointestinal tract and pancreas of rat, pig and man. *Eur J Clin Invest*. 1992;22(4):283-91.
63. Tucker GT, Casey C, Phillips PJ, Connor H, Ward JD, Woods HF. Metformin kinetics in healthy subjects and in patients with diabetes mellitus. *Br J Clin Pharmacol*. 1981;12(2):235-46.
64. Buse JB, DeFronzo RA, Rosenstock J, Kim T, Burns C, Skare S, et al. The Primary Glucose-Lowering Effect of Metformin Resides in the Gut, Not the Circulation: Results From Short-term Pharmacokinetic and 12-Week Dose-Ranging Studies. *Diabetes Care*. 2016;39(2):198-205.
65. DeFronzo RA, Buse JB, Kim T, Burns C, Skare S, Baron A, et al. Once-daily delayed-release metformin lowers plasma glucose and enhances fasting and postprandial GLP-1 and PYY: results from two randomised trials. *Diabetologia*. 2016;59(8):1645-54.
66. Caspary WF, Creutzfeldt W. Inhibition of bile salt absorption by blood-sugar lowering biguanides. *Diabetologia*. 1975;11(2):113-7.
67. Scarpello JH, Hodgson E, Howlett HC. Effect of metformin on bile salt circulation and intestinal motility in type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med*. 1998;15(8):651-6.
68. Rudling M, Camilleri M, Graffner H, Holst JJ, Rikner L. Specific inhibition of bile acid transport alters plasma lipids and GLP-1. *BMC Cardiovasc Disord*. 2015;15:75.
69. Sonne DP, Knop FK. Comment on Xu et al. Effects of Metformin on Metabolite Profiles and LDL Cholesterol in Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2015;38:1858-1867. *Diabetes Care*. 2015;38(12):e215.

70. Nguyen A, Bouscarel B. Bile acids and signal transduction: role in glucose homeostasis. *Cell Signal*. 2008;20(12):2180-97.
71. Sonne DP, Hare KJ, Martens P, Rehfeld JF, Holst JJ, Vilsbøll T, et al. Postprandial gut hormone responses and glucose metabolism in cholecystectomized patients. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2013;304(4):G413-9.
72. Pournaras DJ, Glicksman C, Vincent RP, Kuganlipava S, Alaghband-Zadeh J, Mahon D, et al. The role of bile after Roux-en-Y gastric bypass in promoting weight loss and improving glycaemic control. *Endocrinology*. 2012;153(8):3613-9.
73. Ferrannini E, Camastra S, Astiarraga B, Nannipieri M, Castro-Perez J, Xie D, et al. Increased Bile Acid Synthesis and Deconjugation After Biliopancreatic Diversion. *Diabetes*. 2015;64(10):3377-85.
74. Zhang X, Liu T, Wang Y, Zhong M, Zhang G, Liu S, et al. Comparative Effects of Bile Diversion and Duodenal-jejunal Bypass on Glucose and Lipid Metabolism in Male Diabetic Rats. *Obes Surg*. 2016;26(7):1565-75.
75. Ma K, Saha PK, Chan L, Moore DD. Farnesoid X receptor is essential for normal glucose homeostasis. *J Clin Invest*. 2006;116(4):1102-9.
76. Reimann F, Habib AM, Tolhurst G, Parker HE, Rogers GJ, Gribble FM. Glucose sensing in L cells: a primary cell study. *Cell Metab*. 2008;8(6):532-9.
77. Duca FA, Côté CD, Rasmussen BA, Zadeh-Tahmasebi M, Rutter GA, Filippi BM, et al. Metformin activates a duodenal Ampk-dependent pathway to lower hepatic glucose production in rats. *Nat Med*. 2015;21(5):506-11.
78. Ma T, Tian X, Zhang B, Li M, Wang Y, Yang C, et al. Low-dose metformin targets the lysosomal AMPK pathway through PEN2. *Nature*. 2022;603(7899):159-65.
79. Sakar Y, Meddah B, Faouzi MA, Cherrah Y, Bado A, Ducroc R. Metformin-induced regulation of the intestinal D-glucose transporters. *J Physiol Pharmacol*. 2010;61(3):301-7.
80. Lenzen S, Lortz S, Tiedge M. Effect of metformin on SGLT1, GLUT2, and GLUT5 hexose transporter gene expression in small intestine from rats. *Biochem Pharmacol*. 1996;51(7):893-6.
81. Wu T, Xie C, Wu H, Jones KL, Horowitz M, Rayner CK. Metformin reduces the rate of small intestinal glucose absorption in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2017;19(2):290-3.
82. Gontier E, Fourme E, Wartski M, Blondet C, Bonardel G, Le Stanc E, et al. High and typical 18F-FDG bowel uptake in patients treated with metformin. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2008;35(1):95-9.
83. Oh JR, Song HC, Chong A, Ha JM, Jeong SY, Min JJ, et al. Impact of medication discontinuation on increased intestinal FDG accumulation in diabetic patients treated with metformin. *AJR Am J Roentgenol*. 2010;195(6):1404-10.
84. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110(22):9066-71.
85. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(44):15718-23.
86. Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem*. 2002;277(2):1531-7.

87. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008;57(6):1470-81.
88. Martin FP, Wang Y, Sprenger N, Yap IK, Lundstedt T, Lek P, et al. Probiotic modulation of symbiotic gut microbial-host metabolic interactions in a humanized microbiome mouse model. *Mol Syst Biol*. 2008;4:157.
89. Shin NR, Lee JC, Lee HY, Kim MS, Whon TW, Lee MS, et al. An increase in the *Akkermansia* spp. population induced by metformin treatment improves glucose homeostasis in diet-induced obese mice. *Gut*. 2014;63(5):727-35.
90. Napolitano A, Miller S, Nicholls AW, Baker D, Van Horn S, Thomas E, et al. Novel gut-based pharmacology of metformin in patients with type 2 diabetes mellitus. *PLoS One*. 2014;9(7):e100778.
91. Forslund K, Hildebrand F, Nielsen T, Falony G, Le Chatelier E, Sunagawa S, et al. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature*. 2015;528(7581):262-6.
92. Zhang Q, Hu N. Effects of Metformin on the Gut Microbiota in Obesity and Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2020;13:5003-14.
93. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. 2008;22(3):659-61.
94. Nam H, Jones D, Cooksey RC, Gao Y, Sink S, Cox J, et al. Synergistic Inhibitory Effects of Hypoxia and Iron Deficiency on Hepatic Glucose Response in Mouse Liver. *Diabetes*. 2016;65(6):1521-33.
95. Handschin C, Chin S, Li P, Liu F, Maratos-Flier E, Lebrasseur NK, et al. Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1alpha muscle-specific knock-out animals. *J Biol Chem*. 2007;282(41):30014-21.
96. REILLY RW, KIRSNER JB. RUNT INTESTINAL DISEASE. *Lab Invest*. 1965;14:102-7.
97. Łabuzek K, Suchy D, Gabryel B, Bielecka A, Liber S, Okopień B. Quantification of metformin by the HPLC method in brain regions, cerebrospinal fluid and plasma of rats treated with lipopolysaccharide. *Pharmacol Rep*. 2010;62(5):956-65.

8. APÊNDICE

Apêndice 1 - Quantificação e valores nutricionais das substâncias componentes da dieta hiperlipídica e ração padrão consumidas pelos grupos HFD e CTL

Ingredientes	Ração convencional		Dieta hiperlipídica	
	(g/Kg)	Kcal/Kg	(g/Kg)	Kcal/Kg
Amido de milho (Q.S.P)	397,5	1.590	115,5	462
Caseína	200	800	200	800
Sacarose	100	400	100	400
Amido dextrinado	132	528	132	528
Banha de porco	-	-	312	2.808
Óleo de Soja	70	630	40	360
Celulose	50	-	50	-
Mistura/minerais	35	-	35	-
Mistura/vitaminas	10	-	10	-
L-cistina	3	-	3	-
Colina	2,5	-	2,5	-
Total	1.000	3.948	1.000	5.358

9. ANEXOS

ANEXO 1 - Pareceres consubstanciados IB/UNICAMP



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Comissão de Ética no Uso de Animais



Parecer Inicial de Assessoria CEUA	
Situação	Aprovado
Parecer Inicial de Assessoria CEUA	
NÚMERO DO PROTOCOLO:	4437-1(A)/2018
VIGÊNCIA:	Início: 01/01/2017 Término 31/12/2020
RESPONSÁVEL:	Mario José Abdalla Saad



Cadastro de Protocolo de Pesquisa para uso de animais em pesquisa

- Após 01/08/2017 não será mais feito protocolamento inicial de formulários na versão impressa.

Os protocolos que forem recebidos no banco de dados da CEUA/UNICAMP serão automaticamente numerados e analisados e somente após aprovação final pela CEUA/UNICAMP deverão ser entregues na versão impressa e assinada pelo docente responsável e pelo executor.

Importante: antes do preenchimento do formulário leia atentamente as recomendações da CEUA/UNICAMP disponíveis em http://www.ib.unicamp.br/comissoes/ceua_formularios

Nº protocolo principal	4437-1(A)/2018
Nº protocolo adendo	4437-1(B)/2019
Data de envio à CEUA	28/06/2019
Dados do remetente	
Nome	Natália Tobar Toledo Prudente Da Silva
E-mail	ntobar18@gmail.com
1 Prazo	
	Início 01/01/2017 Término 30/06/2021
2 Título do projeto	
Título do projeto	Avaliação dos efeitos da metformina na composição da microbiota intestinal e captação de glicose por enterócitos de camundongos e ratos obesos
Área de conhecimento	Área do conhecimento: Ciências da saúde. Medicina. Clínica Médica (código 40101002)
3 RESPONSÁVEL	
Matrícula	143405
Nome completo	Mario José Abdalla Saad
Instituição	Universidade Estadual de Campinas
Unidade	ECM - Faculdade de Ciências Médicas

ANEXO 2 - Parecer consubstanciado CEP/UNICAMP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da composição da microbiota intestinal e captação de glicose por enterócitos de indivíduos saudáveis em uso de metformina

Pesquisador: Mario Jose Abdalla Saad

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 38906820.9.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLOGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.484.871

Apresentação do Projeto:

As informações contidas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram obtidas dos documentos apresentados para apreciação ética e das informações inseridas pelo Pesquisador Responsável do estudo na Plataforma Brasil.

A prevalência mundial de obesidade aumentou nos últimos 30-40 anos devido a mudanças nos padrões alimentares e à redução da atividade física. Atualmente esta condição se tornou uma pandemia. Embora a principal razão para o surgimento da obesidade seja um desequilíbrio entre a ingestão e o gasto de energia, fica cada vez mais evidente que a microbiota intestinal desempenha um importante papel no controle do balanço energético e da homeostase imune. A microbiota intestinal humana compreende 10-100 trilhões de microorganismos entre eucariotos, vírus e principalmente bactérias, das quais mais de 1000 espécies bacterianas diferentes já foram catalogadas. Também desempenha papéis importantes na regulação do metabolismo do hospedeiro e na extração de energia dos alimentos ingeridos pelo mesmo. Além das funções benéficas para o hospedeiro, a microbiota intestinal pode potencialmente participar de interações fisiopatológicas com o mesmo, particularmente no caso de obesidade e distúrbios metabólicos relacionados. Estudos recentes mostraram que mudanças na microbiota podem desempenhar um papel na patogênese dos fenótipos obeso e diabético. Uma dieta hiperlipídica contribui para a disbiose intestinal, levando a distúrbios metabólicos. Por exemplo, camundongos livres de germes são protegidos contra a obesidade e disfunções metabólicas, incluindo intolerância à glicose

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 4.484.871

induzidas pela dieta hiperlipídica. Além disso, a colonização de animais livres de germes com microbiota intestinal isolada de doadores obesos mantidos em criadouros convencionais (com germe) levou a um aumento significativo no teor de gordura corporal e na resistência à insulina nos camundongos receptores. De forma similar, a transferência de microbiota intestinal de camundongos deficientes para o receptor Toll-like 5 para camundongos selvagens sem germes também transferiu o fenótipo diabético do doador deficiente para o receptor. Tomados em conjunto, esses estudos sugerem que as alterações na comunidade microbiana intestinal aumentam a capacidade do hospedeiro para extrair energia de uma determinada dieta, desencadeando dessa maneira o desenvolvimento da obesidade e diabetes. Isso indica um vínculo entre a microbiota intestinal e o fenótipo diabético do hospedeiro. Conseqüentemente, várias intervenções dietéticas - incluindo drogas, probióticos e prebióticos - que alteram a composição da microbiota são usadas para melhorar os parâmetros metabólicos. Além disso, a microbiota intestinal afeta a homeostase imune no intestino e respostas imunes alteradas no tecido adiposo estão ligadas a distúrbios metabólicos. A obesidade e diabetes tipo 2 (T2D) estão associados à inflamação tecidual crônica de baixo grau. A metformina é a farmacoterapia mais prescrita para o tratamento de indivíduos com diabetes tipo 2 devido à sua relativa segurança, baixo custo e efeitos benéficos sobre a glicemia e a mortalidade cardiovascular. No entanto, seu mecanismo de ação ainda permanece não completamente elucidado. Embora a metformina seja geralmente considerada como mediadora de seus efeitos antihiperlipidêmicos pela supressão da produção hepática de glicose através da ativação de vias dependentes e independentes da proteína quinase dependente de AMP (AMPK) no fígado, evidências recentes indicam que ela também pode atuar através de vias no intestino. Por exemplo, seu efeito de redução da glicose é mais pronunciado quando administrado por via oral do que quando administrado por via intravenosa. Além disso, um estudo comparando formulações de metformina com exposição plasmática reduzida e normal forneceu evidências para indicar que o intestino é um importante sítio de ação para a metformina. Também, estudos recentes em roedores e humanos sugerem que as alterações microbianas intestinais podem contribuir para o efeito antidiabético da metformina. Até o momento, no entanto, não se sabe como a metformina afeta ou interage com a microbiota intestinal de indivíduos com T2D. Os poucos achados científicos aumentam a possibilidade de que a metformina influencia direta e indiretamente a microbiota intestinal, o que pode, por sua vez, contribuir para seus efeitos antidiabéticos. Muitos estudos tem avaliado o efeito da metformina na absorção intestinal de glicose. Enquanto a metformina in vitro pode reduzir a produção de ATP pelos enterócitos, levando à redução da atividade de cotransportadores de glicose dependentes de

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.484.871

sódio tipo 1 (SGLT1), há um aumento na expressão de GLUT2 na borda em escova do jejuno de ratos, através da ativação de AMPK. Também em ratos, a administração in vivo de metformina em dose terapêutica (125 mg/Kg, duas vezes ao dia) por três dias foi associada ao aumento de SGLT1 no duodeno e jejuno e GLUT5 apenas no jejuno, mas não de GLUT2 ao longo do intestino delgado. Por outro lado, em pacientes com DM2, a administração de metformina (850 mg duas vezes ao dia) por 4 ou 7 dias diminuiu modestamente a absorção de glicose no intestino delgado, embora ainda não esteja claro se esse efeito está relacionado à atividade ou expressão reduzidas de transportadores de membrana. Nesse contexto, em diabéticos tipo 2, a metformina demonstrou aumentar no intestino grosso e, em menor grau, no delgado, a captação vascular do radiofármaco 18F-fluorodeoxiglicose (18F-FDG), um análogo radioativo de glicose administrado intravenosamente em exames de PET/CT para imagens funcionais de órgãos e tecidos. O aumento da captação intestinal de 18F-FDG induzido pela metformina indica uma atividade metabólica mais intensa nos enterócitos e, embora seja um fenômeno conhecido há décadas em Medicina Nuclear, até hoje nenhuma justificativa para o fenômeno foi fornecida com convicção. Gontier et al. relataram que se trata tipicamente de uma captação intensa e difusa, o que pode mascarar lesões intestinais malignas e levar a resultados falso-negativos. Desta maneira, pacientes que consomem metformina são orientados a suspender o uso por 48 horas antes da realização de exames PET/CT.

Hipótese: Face ao exposto, hipotetizamos que as principais ações hipoglicemiantes da metformina dão-se em diferentes porções do intestino, através da modulação de seu microbioma e da indução da captação de glicose por enterócitos, o que vai de encontro ao que tem sido considerado até então no meio científico como o principal mecanismo de ação do medicamento, a inibição da neoglicogênese hepática.

Metodologia Proposta: Voluntários serão submetidos a exames de PET/CT, antes e após tratamento de 5 dias consecutivos com cloridrato de metformina (2g/dia). Nas datas reservadas a este estudo, os participantes deverão permanecer 6 horas em jejum e serão orientados a coletar suas fezes em recipiente próprio para posterior análise microbiana. Uma dose de glicose marcada com F-18 (18F-FDG), proporcional à massa de cada participante (0.12 mCi x massa corporal), será injetada em acesso venoso periférico por equipe de enfermagem especializada e após 1 hora de repouso imagens da biodistribuição do radiofármaco serão adquiridas da cabeça à raiz das coxas por 20 minutos no equipamento PET/CT Biograph 40mCT (TrueX, TOF, HD PET, Exp FOV), localizado no setor de Medicina Nuclear do Hospital de Clínicas da Unicamp. Critério de Inclusão: Indivíduos saudáveis (sem uso de medicação crônica), de ambos os sexos, entre 30 e 45 anos.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 4.484.871

Critério de Exclusão: Gestantes, lactantes, diagnóstico de doenças intestinais prévias (últimos 6 meses) e não tolerância a permanência em ambientes parcialmente fechados (equipamento PET/CT).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O principal objetivo do presente trabalho é investigar os efeitos da metformina sobre o metabolismo glicolítico de enterócitos e a composição microbiana intestinal, que contribuiriam para a diminuição da glicemia induzida pelo fármaco e caracterizariam um novo possível mecanismo de ação para a metformina, relacionado, portanto ao aumento da captação e utilização de glicose pelo intestino.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Para o exame PET/CT, o participante será exposto à radiação, que, neste caso, provem do radiofármaco 18F-FDG, injetado intravenosamente, e também do aparelho de tomografia computadorizada acoplado ao equipamento. É importante ressaltar que os níveis de radiação são calculados com segurança para que esta exposição não traga danos à saúde. Não existe risco sabido de câncer associado à injeção do radiofármaco. A dose efetiva estimada de radiação para o FDG-18F PET/CT está na faixa de 2 a 3 anos de exposição natural à radiação ambiental. Embora não haja como prever maiores complicações com a participação no estudo, os possíveis riscos e desconfortos decorrentes da administração oral de metformina são muito raros e podem incluir náuseas, cólica abdominal e diarreia. Os associados ao exame de PET/CT podem ser o de sangramento e dor durante a inserção de cateteres intravenosos para injeção do material radioativo (18F-FDG), além da necessidade de permanecer imóvel durante o procedimento (por no máximo 30 minutos), desconfortos estes minimizados, pois pernas e braços dos participantes estarão acomodados em suportes específicos fornecidos pelo fabricante do equipamento.

Benefícios: O participante não irá se beneficiar diretamente desta pesquisa, porém, nos ajudará a entender melhor o mecanismo de ação da metformina que, embora seja o fármaco mais amplamente prescrito no mundo no combate ao diabetes tipo 2, atua através de mecanismos

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
UF: SP Município: CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 4.484.871

ainda pouco compreendidos, sobretudo em órgãos alvo diferentes do fígado; por essa razão, é de grande interesse social e científico a investigação de suas ações, refinando os alvos terapêuticos deste medicamento. Acreditamos ainda que desta pesquisa provirão importantes benefícios sociais com relação às terapias voltadas para modular positivamente parâmetros metabólicos relacionados à captação e utilização da glicose pelo intestino, melhorando a sensibilidade à insulina e tolerância à glicose e, portanto, reduzindo a morbidade e mortalidade causadas pelo diabetes tipo 2.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Respostas às pendências:

1- Cronograma: consta como início da coleta de dados em junho de 2020, porém os experimentos só podem ser iniciados após a aprovação pelo CEP.

RESPOSTA: Como informado em caráter de observação no campo "Outras informações, justificativas ou considerações a critério do Pesquisador" da Plataforma Brasil, as datas programadas serão readequadas para depois das devidas aprovações em comitês de análise. Todavia, após apontamento, nova programação foi elaborada com datas estipuladas num futuro mais distante.

PENDÊNCIA SOLUCIONADA.

2- Orçamento: não estão incluídos os custos relativos à realização dos exames de imagem (PET-CT), que, de acordo com a descrição metodológica, serão realizados para fins exclusivos de pesquisa no HC Unicamp, com potencial custeio realizado através de recursos destinados à assistência. É necessário que haja carta de anuência ou declaração do responsável pelo serviço de Medicina Nuclear declarando ciência deste fato e autorização para realização da pesquisa.

RESPOSTA: O documento referente à ciência e aprovação do estudo a ser realizado em parte no Serviço de Medicina Nuclear do Hospital de Clínicas da Unicamp encontra-se anexado em campo apropriado na Plataforma Brasil.

PENDÊNCIA SOLUCIONADA.

3- TCLE: o TCLE postado na atual submissão não contempla diversos aspectos obrigatórios (descrição pormenorizada em linguagem acessível de todos os procedimentos que serão realizados, previsão de ressarcimento e indenização) e a formatação não é adequada. Sugere-se a redação de novo TCLE baseado no modelo aceito por esta instituição conforme o link abaixo:

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126			
Bairro: Barão Geraldo		CEP: 13.083-887	
UF: SP	Município: CAMPINAS		
Telefone: (19)3521-8936	Fax: (19)3521-7187	E-mail: cep@fcm.unicamp.br	



Continuação do Parecer: 4.484.871

http://www.fcm.unicamp.br/fcm/sites/default/files/3_estrutura_basica_tcle.docx

RESPOSTA: Novo TCLE foi redigido segundo as orientações fornecidas e modelo oficial.

Encontra-se anexado na Plataforma Brasil em campo apropriado.

PENDÊNCIA SOLUCIONADA.

4- Riscos e desconfortos: são citados os potenciais riscos do uso de Metformina, mas não há menção aos possíveis desconfortos, efeitos adversos ou riscos da realização do exame de PETCT e da coleta de fezes. Mesmo que sejam mínimos, precisam ser detalhados na aba "Riscos" e no TCLE.

RESPOSTA: Alterações realizadas.

PENDÊNCIAS SOLUCIONADAS.

5- Anexar o Regulamento do biorrepositório (<https://www.prp.unicamp.br/pt-br/biorrepositorio>)

RESPOSTA: Documento anexado em campo apropriado na Plataforma Brasil.

PENDÊNCIA SOLUCIONADA.

6. Não é informado no projeto detalhado de que forma os participantes serão recrutados, critérios de inclusão e exclusão.

RESPOSTA: Informações incluídas e detalhadas no projeto no item "Critérios de inclusão e exclusão", na seção 4 (Metodologia).

PENDÊNCIA SOLUCIONADA.

7. No documento "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1557243.pdf 18/09/2020

16:51:48 " lê-se: "Detalhamento: Trinta pacientes encaminhados ao Serviço de Medicina

Nuclear do Hospital de Clínicas da UNICAMP entre os anos de 2013 e 2016 para a realização

de exames de PET/CT, sob indicações clínicas diversas, terão as imagens diagnósticas e

prontuários reanalisados para a investigação da captação intestinal de glicose em função da presença ou

não de diabetes mellitus tipo 2 e comorbidades associadas por eles apresentados. Os resultados

encontrados serão tabelados e correlacionados também a outras variáveis, como idade, sexo e medicações

ingeridas, dentre elas e principalmente, o cloridrato de metformina. Trata-se de um estudo observacional

complementar, cujo principal objetivo é investigar, por meio de análises e processamentos de imagens de

PET/CT anteriormente adquiridas, além de revisão de prontuários médicos, os efeitos da metformina sobre o

metabolismo glicolítico em enterócitos, que contribuiriam para maior captação intestinal de glicose e,

conseqüentemente, para a

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.484.871

diminuição da glicemia induzida pelo fármaco em diabéticos tipo 2."

7.1. Estas informações não constam no projeto detalhada. Solicitamos que as informações no documento devem ser uniformizadas.

RESPOSTA: Informações incluídas e detalhadas no projeto original. Encontram-se na seção "Metodologia", item "Grupos amostrais", subitem "Diabéticos tipo 2 e indivíduos controles".

PENDÊNCIA SOLUCIONADA.

7.2. Os pacientes que terão seus prontuários acessados são denominados participantes da pesquisa e devem ser inseridos como um grupo na tabela "Grupos em que serão divididos os participantes da pesquisa neste centro".

RESPOSTA: Alteração realizada.

PENDÊNCIA SOLUCIONADA.

7.3. A questão "Informe o número de indivíduos abordados pessoalmente, recrutados, ou que sofrerão algum tipo de intervenção neste centro de pesquisa" e "Tamanho da Amostra no Brasil" deverá ser alterada para 36.

RESPOSTA: Alteração realizada.

PENDÊNCIA SOLUCIONADA.

7.4. Anexar uma nova folha de rosto contemplando o novo tamanho amostral.

RESPOSTA: Nova folha de rosto foi anexada em campo apropriado na Plataforma Brasil (Documento: Folha_de_Rosto_3).

PENDÊNCIA SOLUCIONADA.

7.5. Anexar o TCLE que deverá ser apresentado para o grupo em que o prontuário será acessado. Cabe ressaltar que a Lei Geral de Proteção de Dados Pessoais (LGPD – Lei nº 13.709/2018) foi promulgada este ano e visa proteger os direitos fundamentais de liberdade e de privacidade e a livre formação da personalidade de cada indivíduo. Essa Lei versa sobre o tratamento de dados pessoais, dispostos em meio físico ou digital, feito por pessoa física ou jurídica de direito público ou privado. Para utilização dos dados, esta lei exige consentimento do titular do dado. Lembramos que estudos apenas com dados de prontuários não são necessariamente passíveis de dispensa de TCLE. Além da LGPD, há diversas orientações do Conselho Federal de Medicina que impedem o acesso ao prontuário médico quando não houver

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



UNICAMP - CAMPUS
CAMPINAS



Continuação do Parecer: 4.484.871

autorização expressa do paciente. O TCLE é o instrumento pelo qual o participante manifestará a sua anuência e autorização para que os documentos-fonte sejam consultados. Por tanto, o pesquisador deverá apresentar o TCLE para os participantes estejam em acompanhamento ou que possam ser contatados.

RESPOSTA: Temos ciência da Lei Geral de Proteção de Dados Pessoais (LGPD - Lei nº

13.709/2018), no entanto, gostaríamos de solicitar a dispensa para aplicação de TCLE no grupo amostral referente à revisão de imagens de PET/CT e prontuários médicos, uma vez que

transcorrido o período contemplado de análise de dados, relativamente antigo (2013 a 2016), cerca de 45% dos participantes perderam seguimento no Hospital de Clínicas da Unicamp ou vieram a óbito, enquanto os demais realizaram o exame uma única vez, por solicitação das mais diversas especialidades clínicas, o que tornaria inviável contatá-los pessoalmente em seus devidos retornos médicos para a assinatura do documento, sobretudo no período de pandemia de COVID-19 que ainda enfrentamos, o qual tem obrigado todos os ambulatórios do Hospital de Clínicas da Unicamp a restringir ou cancelar suas consultas. Seria também extremamente oneroso, inviável e completamente desnecessário solicitarmos novo PET/CT para a parcela ativa de participantes, pois as imagens de interesse já constam no banco de dados do hospital e serão empregadas apenas para comparações quali e quantitativas entre o consumo ou não consumo de metformina. Esta conduta não violaria, em nossa opinião, os direitos fundamentais de liberdade e de privacidade de todos os participantes (ativos ou inativos nos ambulatórios do Hospital de Clínicas), assegurados pela LGPD. Embasados ainda em disposto na resolução CNS 466/2012, item IV, o qual determina "... caso não seja possível a obtenção dos consentimentos (por exemplo, pacientes que não se tenha contato ou falecidos) pode ser dada uma justificativa..." acreditamos que nossa solicitação se justifique e seja viável.

PENDÊNCIA SOLUCIONADA.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram analisados os seguintes documentos:

- PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1557243.pdf 11/12/2020
- Carta_resposta.pdf 11/12/202
- TCLE_Metformina_PETCT_2.pdf 18/11/2020
- Declaracao_SMN.pdf 18/11/2020
- Regulamento_de_biorrepositorio.pdf 18/11/2020
- Projeto_Plataforma_Brasil3.pdf 18/11/2020
- Folha_de_Rosto_3.pdf 18/11/2020

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.484.871

Ver o campo Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações.

Recomendações:

Ver o campo Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram observados óbices éticos na emenda proposta.

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012 e da NO 001/2013, o CEP Unicamp manifesta-se pela aprovação da emenda proposta ao projeto de pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.484.871

apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

- O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1557243.pdf	11/12/2020 09:44:20		Aceito
Outros	Carta_resposta.pdf	11/12/2020 09:43:43	Natália Tobar Toledo Prudente da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Metformina_PETCT_2.pdf	18/11/2020 21:56:07	Natália Tobar Toledo Prudente da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_SMN.pdf	18/11/2020 21:53:56	Natália Tobar Toledo Prudente da Silva	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Regulamento_de_biorrepositorio.pdf	18/11/2020 21:51:16	Natália Tobar Toledo Prudente da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Plataforma_Brasil3.pdf	18/11/2020 21:50:43	Natália Tobar Toledo Prudente da Silva	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_3.pdf	18/11/2020 21:48:04	Natália Tobar Toledo Prudente da Silva	Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.484.871

Outros	MarioSaad_cracha.jpeg	11/09/2020 10:22:09	Mario Jose Abdalla Saad	Aceito
--------	-----------------------	------------------------	----------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 26 de Dezembro de 2020

Assinado por:
Alessandro Rozim Zorzi
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

ANEXO 3 – Termo de consentimento livre esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**Avaliação da composição da microbiota intestinal e captação de glicose por enterócitos de indivíduos saudáveis em uso de metformina****Pesquisador principal:** Prof. Dr. Mario José Abdalla Saad**Pesquisadora principal local:** Natália Tobar Toledo Prudente da Silva**Número do CAAE:** 38906820.9.0000.5404

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante da pesquisa e é elaborado em duas vias, assinadas e rubricadas pelo pesquisador e pelo participante/responsável legal, sendo que uma via deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se houver perguntas antes ou mesmo depois de assiná-lo, você poderá esclarecê-las com os pesquisadores. Se preferir, pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo se você não aceitar participar ou retirar sua autorização em qualquer momento.

Justificativa e objetivos:

Esta é uma pesquisa que pretende analisar a composição da microbiota intestinal, ou seja, os tipos de bactérias que existem em seu intestino, e a captação de glicose pelas células intestinais moduladas pela metformina, droga que diminui a glicemia (açúcar no sangue), de primeira linha para o tratamento de diabetes tipo 2 e que está disponível no mercado há mais de 60 anos. Este trabalho nos ajudará a esclarecer os mecanismos de ação deste medicamento, ainda hoje esclarecidos apenas parcialmente.

Procedimentos:

Participando do estudo você será convidado a doar uma pequena amostra de fezes (em recipiente apropriado e fornecido gratuitamente, o que pode ser feito em sua residência), e a fazer um exame de PET/CT, um procedimento de imagem muito comum, seguro e bem estabelecido que permite estudar o metabolismo dos órgãos em geral. Isso acontecerá em dois períodos distintos: antes e após o consumo por 5 dias consecutivos de 2 gramas de metformina por dia, via oral. A medicação também será fornecida gratuitamente, será em forma de comprimidos de 1 grama fabricados pela empresa farmacêutica EMS SIGMA PHARMA (CNPJ: 57.507.378/0001-01) e deverão ser ingeridos 2 vezes ao dia, logo após o café da manhã e o jantar.

A realização do PET/CT acontecerá no Serviço de Medicina Nuclear, que está localizado no 2º andar do Hospital de Clínicas da Unicamp, situado na Rua Vital Brasil, 251 - Cidade Universitária, Campinas - SP. Nos dias deste exame, você deverá cumprir 6 horas de jejum, ter seu peso e altura aferidos e receberá através de uma injeção na veia, uma dose do radiofármaco 18F-FDG (18F-fluordesoxiglicose) proporcional ao seu peso. Após a injeção,

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

ficará em repouso em uma sala privativa por 1 hora, deitado em uma maca e aquecido por cobertor e terá que ingerir alguns copos de água para hidratação adequada. Logo após, será encaminhado (a) ao equipamento PET/CT para a aquisição de imagens por um período de 20 minutos. A administração do radiofármaco não acarreta qualquer efeito colateral a curto ou a longo prazos, nem demanda nenhuma restrição comportamental. Sua visita ao Serviço de Medicina Nuclear não durará mais que 2 horas, aproximadamente.

Desconfortos e riscos

Você **não** deve participar deste estudo se estiver grávida, amamentando, tiver tido diagnóstico de doenças intestinais em menos de 6 meses e não tolerar ambientes parcialmente fechados, como o de dentro do equipamento PET/CT.

Para o exame de imagem, você será exposto à radiação, que, neste caso, vem do material injetado na veia (o radiofármaco 18F-FDG) e também do aparelho de tomografia computadorizada acoplado ao PET/CT. É importante entender que os níveis de radiação são calculados com segurança para que esta exposição não traga danos à sua saúde. Não existe risco sabido de câncer associado à injeção do radiofármaco. A dose efetiva estimada de radiação para o FDG-18F PET/CT está na faixa de 2 a 3 anos de exposição natural à radiação do meio ambiente.

Embora não haja como prever maiores complicações com a participação no estudo, os possíveis riscos e desconfortos decorrentes da administração oral de metformina são muito raros e podem incluir náuseas, cólica abdominal e diarreia. Os associados ao exame de PET/CT podem ser o de sangramento e dor durante a inserção de cateteres na sua veia para injeção do material radioativo (18F-FDG), além da necessidade de permanecer imóvel durante o procedimento (por no máximo 30 minutos), mas mesmo assim são desconfortos mínimos, pois suas pernas e braços estarão acomodados em suportes específicos fornecidos pelo fabricante do equipamento.

Benefícios:

Você não irá se beneficiar diretamente desta pesquisa, porém, nos ajudará a entender melhor o mecanismo de ação da metformina que, embora seja o fármaco mais amplamente prescrito no mundo no combate ao diabetes tipo 2, atua através de mecanismos ainda pouco compreendidos, sobretudo em órgãos diferentes do fígado; por essa razão, é de grande interesse social e científico a investigação de suas ações, refinando os alvos terapêuticos deste medicamento.

Acreditamos ainda que esta pesquisa trará importantes benefícios sociais com relação às terapias voltadas para modular positivamente a captação e utilização da glicose pelo intestino, melhorando a sensibilidade à insulina e tolerância à glicose e, portanto, reduzindo a morbidade e mortalidade causadas pelo diabetes tipo 2.

Acompanhamento e assistência:

Você tem o direito à assistência integral e gratuita devido a danos diretos e indiretos, imediatos e tardios, pelo tempo que for necessário e não terá despesa alguma ao longo do estudo.

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

Ligaremos para você apenas ao longo da semana em que estiver consumindo a metformina para acompanhá-lo ou assisti-lo em suas eventuais queixas.

Você terá direito ao acesso às imagens do exame de PET/CT sempre que solicitadas, porém, caso não cumpra o período de jejum adequado ou as orientações quanto ao consumo de metformina, poderá ser retirado do estudo.

Você tem total liberdade de decidir não mais participar desta pesquisa, em qualquer fase da mesma, independentemente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. Nestas circunstâncias, as imagens do PET/CT (se já adquiridas), bem como as análises referentes às coletas de fezes às quais você foi submetido enquanto vinculado a esse estudo serão retiradas do nosso banco de dados.

Sigilo e privacidade:

Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, como por exemplo através da publicação em revistas científicas especializadas e apresentação em congressos nacionais ou internacionais, seu nome não será citado.

Ressarcimento e Indenização:

Informamos que seus custos com transporte e alimentação nos dias de PET/CT serão ressarcidos. Disponibilizaremos a quantia de 50 (cinquenta) reais para o atendimento de suas necessidades em cada dia que comparecer ao Serviço de Medicina Nuclear para a realização do exame, que se dará em dois sábados consecutivos, no período da manhã. Esse valor poderá ser complementado, caso necessário.

Você terá a garantia ao direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Armazenamento de material:

As fezes coletadas antes e após o consumo de metformina serão armazenadas por um período de no máximo 6 meses, com o único objetivo de realizar estudos metagenômicos, ou seja, investigar que tipos de bactérias estão presentes em seu intestino, sendo descartadas logo após os testes e suas replicatas, quando necessárias. Portanto, o material armazenado, assim que utilizado e tendo-se um resultado de análise validado, mesmo que remanescente, não será empregado em experimentos futuros.

Em caso de falecimento ou condição incapacitante, os direitos sobre o material armazenado durante os testes deverão ser dados a:

(Nome de uma pessoa a ser contatada)

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

Contato:

Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores: NATÁLIA TOBAR TOLEDO PRUDENTE DA SILVA, doutoranda no Laboratório de Investigação Clínica em Resistência à Insulina da Faculdade de Ciências Médicas, situada na Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Cidade Universitária Zeferino Vaz, CEP 13083-887 Campinas – SP, telefone (19) 3521-9039, de segunda a sexta-feira, das 08 às 12 horas ou em seu telefone particular (19) 982006644 e PROF. DR. MARIO JOSÉ ABDALLA SAAD, chefe do mesmo laboratório e disponível de segunda a sexta-feira, das 08 às 10 horas ou em seu telefone particular (19) 991361010.

Em caso de denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre questões éticas do estudo, você poderá entrar em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNICAMP das 08:00hs às 11:30hs e das 13:00hs as 17:30hs na Rua Tessália Vieira de Camargo, 126; CEP 13083-887 Campinas – SP; telefone (19) 3521-8936 ou (19) 3521-7187; e-mail: cep@unicamp.br

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), tem por objetivo desenvolver a regulamentação sobre proteção dos seres humanos envolvidos nas pesquisas. Desempenha um papel coordenador da rede de Comitês de Ética em Pesquisa (CEPs) das instituições, além de assumir a função de órgão consultor na área de ética em pesquisas

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar, aceito participar:

Nome do (a) participante da pesquisa:

_____ Data: ____/____/____.

(Assinatura do (a) participante da pesquisa ou nome e assinatura de seu RESPONSÁVEL LEGAL)

Responsabilidade do Pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante da pesquisa. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado e pela CONEP, quando pertinente. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante da pesquisa.

_____ Data: ____/____/____.

(Assinatura do pesquisador)

Rubrica do pesquisador: _____

Rubrica do participante: _____

ANEXO 4 – Licença para inclusão do artigo científico no corpo da tese

PNAS Author Center

MENU

Publication Charges

Information on PNAS article processing charges and publication licenses available is on this page.

Article Processing Charges

PNAS depends, in part, on the payment of article processing charges (APCs) to finance its operations. Papers are accepted or rejected for publication and published solely on the basis of merit. Beginning with articles in volume 119, PNAS has implemented a simplified APC and license structure that removes dependency on article length. PNAS will grant waivers for authors who do not have funding to cover APCs (for example, in mathematics and astronomy, or from lower-income countries). Articles that publish in volume 119 will have the [2022 APC structure](#).

Regular research articles:

	APC	Available Licenses
Delayed Open Access	\$2,595	CC BY-NC-ND
Immediate Open Access	\$4,995 for corresponding authors from institutions with current-year site licenses (compared to our \$5,495 regular fee)	CC BY-NC-ND or CC BY

Brief Report articles: \$2,285 per article with either a CC BY or CC BY-NC-ND license. All Brief Report articles are immediately open access upon publication.

All PNAS articles, regardless of their license, are free within 6 months of publication.

Publication charges may be paid by credit card, check, or wire transfer. On receipt of the publication estimate, authors may log into the author billing system to review their charges. Email questions regarding billing and payment of APCs to PNASsupport@copyright.com. Submit requests for waivers of charges to PNASWaiverRequests@nas.edu.

Licenses for PNAS Articles

This page explains which licenses govern the reuse of PNAS content. Users are advised to check each article for its publication license and corresponding reuse and distribution policies.

Licenses for PNAS Articles

PNAS offers two Creative Commons licenses: [CC BY-NC-ND](#) and [CC BY](#). Please visit the respective websites for information on license terms.

The standard PNAS license has been discontinued beginning with articles published in volume 119 (2022). Information on the terms that apply to articles that published with this license can be found here: [standard PNAS License terms](#).

Open Access Policy

All PNAS articles are free to read within 6 months of publication, without a subscription, and PNAS automatically deposits the version of record in PubMed Central for the authors. Authors who choose the immediate open access option can have their articles made freely available immediately upon publication. The following content is freely available upon publication:

- Front matter
- Special Features



- Classics
- Editorials
- In This Issue
- Corrections
- Retractions
- Retrospectives
- Editorial Expression of Concern
- At the National Academies
- Nobel papers

Open access articles are published under a [nonexclusive License to Publish](#) and distributed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives ([CC BY-NC-ND](#)) or a Creative Commons Attribution ([CC BY](#)) license. Some funders and institutions have explicit open access and license requirements. Authors are advised to confirm these requirements with their funding or institutional representatives to ensure compliance or to request policy waivers. Changes to license selections, or open access status, after publication may not be possible.

Since 2004, PNAS has offered green open access to everyone: Authors may deposit their accepted manuscript in their funding body's archive or designated noncommercial institutional repository, under the same license as the published article, provided that a link to the published article in PNAS is included. Authors may make their deposited manuscripts publicly available 6 months after publication or immediately on publication if the article was published in PNAS under the immediate open access option.

PNAS offers an immediate open access option. Note that Plan S-funded authors may not be able to use Plan S funds to pay for open access fees. If Plan S-funded scientists do not have funds available, PNAS will grant waivers for the CC BY fee on a case-by-case basis.

In light of the ongoing COVID-19 pandemic, PNAS continues to make relevant content free to access. Any data or preprints shared ahead of submission of research articles relevant to the outbreak will not preempt publication in PNAS. Please read the full statement [here](#).

PNAS also participates in the following open access initiatives:

- All content, regardless of license, is automatically deposited by PNAS in [PubMed Central](#). Articles that publish with the delayed open access option are free within 6 months of publication on PubMed Central. Articles that publish under an immediate open access option are free to read immediately.
- Articles published in PNAS are compliant with the [NIH Public Access Policy](#).
- PNAS participates in [CHORUS](#) and supports the [CHORUS Principles](#).
- Articles published in PNAS are sent to the Open Access Switchboard so that funders and institutional administrators are notified of publication milestones.
- All PNAS articles are freely available in [124 lower-income countries](#).

Authors Rights and Permissions

Rights and Permissions

For volumes 1–89 (1915–1992), the author(s) retains copyright to individual articles, and the NAS holds copyright to the collective work.

For volumes 90–105 (1993–2008), the articles are copyright NAS.

For volumes 106–119 (2009–2022), except for open access articles submitted beginning September 2017, the author(s) retains copyright to individual articles, and NAS retains an [exclusive License to Publish](#) these articles and holds copyright to the collective work.

For articles published under either a [CC BY-NC-ND](#) or [CC BY](#) license beginning September 2017, the NAS retains a [nonexclusive License to Publish](#).

Visit the [Permissions FAQ](#) for information about PNAS copyright and self-archiving guidelines. See the [PNAS listing](#) on Sherpa RoMEO.

PNAS authors do not need permission for the following cases:

1. to use their original figures or tables in their future works;
2. to make copies of their articles for their own personal use, including classroom use, or for the personal use of colleagues, provided those copies are not for sale and are not distributed in a systematic way;
3. to include their articles as part of their dissertations; or
4. to use all or part of their articles in printed compilations of their own works.

The full journal reference must be cited and, for articles published in volumes 90–105 (1993–2008), "Copyright (copyright year) National Academy of Sciences" must be included as a copyright note.



Requesting Permission

For permission to reuse material in volumes 90–118 (1993–2021) that published under the exclusive PNAS License to Publish, requests should be sent to PNASpermissions@nas.edu and must include the following information about the requestor and the material:

1. Your full name, affiliation, and title
2. Your complete mailing address, phone number, and email
3. PNAS volume number, issue number, and issue date
4. PNAS article title
5. PNAS authors' names
6. Figure/table number or portion of text to be reprinted

Requests must also include the following information about the intended use of the material:

1. Title of work in which PNAS material will appear
2. Authors/editors of work
3. Publisher of work
4. Retail price of work
5. Number of copies of work to be produced
6. Intended audience
7. Whether work is for nonprofit or commercial use

Permission is not required to use original figures or tables for noncommercial and educational use (i.e., in a review article, in a book that is not for sale) if the article published under the exclusive PNAS License to Publish. Please include a full journal reference and, for articles published in volumes 90–105 (1993–2008), include "Copyright (copyright year) National Academy of Sciences" as a copyright note. Commercial reuse of figures and tables (i.e., in promotional materials, in a textbook for sale) requires permission from PNAS.

Reproducing full articles (whether physically or electronically) published under the exclusive PNAS License to Publish requires permission from PNAS and will also incur an article reprint fee. Sharing the URL of a PNAS article does not require permission and will not incur any fees.

In September 2017 (partway through volume 114), PNAS started offering [CC BY-NC-ND](#) and [CC BY](#) licenses. PNAS is not authorized to grant permission for material published under either license, as the authors hold copyright. However, depending on the intended use, permission may not be required at all. Users are advised to check each article for its publication license and corresponding reuse and distribution policies.

As a courtesy, please notify PNAS authors when reusing their work, regardless of the license to publish. Use of PNAS material must not imply any endorsement by PNAS or NAS.

Text and data mining are permitted for noncommercial institutions with an active institutional site license to PNAS for internal noncommercial research purposes. Other requests should be sent to PNASpermissions@nas.edu.

PNAS cannot supply original artwork. Such requests should be directed to the article's corresponding author (contact information is available in the article's footnotes).

Additional Permissions Requests

Copyright Clearance Center offers the following pay-per-use options for PNAS material:

- Use in electronic or print course materials (i.e., coursepacks, classroom handouts, posting on an academic institution intranet)
- Delivery via Interlibrary Loan (ILL) or other document delivery
- Photocopying for general business or academic use
- Sharing content electronically (i.e., sending in an email, posting on an intranet or extranet)

Pay-per-use orders can be submitted directly through the [Copyright Clearance Center website](#).

Authorization to photocopy items for the internal or personal use of specific clients is granted by the NAS provided that the proper fee is paid directly to the Copyright Clearance Center.

For questions regarding any of the above, including permission to photocopy beyond that permitted by [Section 107 or 108 of the US Copyright Law](#), contact:

[Copyright Clearance Center](#), 222 Rosewood Drive Danvers, MA 01923 Phone: 978-750-8400 Fax: 978-750-4770 Email: info@copyright.com

License to Publish

Signing the [License to Publish](#) grants NAS nonexclusive rights to publish the work in PNAS.



PNAS Pilot Transformative Agreements

The National Academy of Sciences (NAS) has select pilot transformative agreements with institutions and consortia to provide immediate public access to PNAS, the peer reviewed journal of the NAS. These agreements offer a [sustainable open access framework](#) and provide the following benefits to researchers at participating institutions:

- Researchers have unlimited access to all content published in PNAS, including subscription-only content, immediately after publication.
- Research articles by corresponding authors based at participating institutions are published immediate open access under a CC BY license, directly deposited to PubMed Central (PMC) and to Europe PMC, and archived in LOCKSS/CLOCKSS and Portico.
- Depending on the agreement, authors within the institution qualify for reduced or no research article publication fees, with no limit to the number of articles that may be published immediate open access.

Jisc Publish-and-Read Transformative Agreement

Jisc has signed a Publish-and-Read agreement with the NAS. The agreement, which benefits all corresponding authors from participating UK institutions, runs from July 1, 2021, to December 31, 2023.

Under the agreement, corresponding authors from an institution that has signed up with Jisc may publish open access in PNAS without incurring article page charges. A CC BY license is applied to the article by default. Authors who opt out of publishing their articles with an open access license will be responsible for paying the full PNAS charges for their articles, as outlined in the [Article Processing Charges](#).

How to take advantage of this agreement:

- The corresponding author must be affiliated with an institution participating in this pilot agreement, and the author must publish under this affiliation.
- The author should use their institutional email address when submitting their paper, if possible. The author will be asked to validate their institution if a validated institution is not already linked to the author's user profile.
- If invited to submit a final revision, the author will receive a request to sign the License to Publish once the revision is received. The corresponding author should choose a CC BY license to qualify for this agreement.
- The article must be accepted for publication in PNAS between July 1, 2021, and December 31, 2023.
- Authors who publish in PNAS always retain copyright ownership or have the ability to set the copyright owner as their institutions when required.

For a complete list of institutions participating in this pilot program with Jisc, please visit <https://www.pnas.org/author-center/jisc-publish-and-read>.

University of California Publish-and-Read Transformative Agreement

California Digital Library has signed a Publish-and-Read Transformative Agreement with the NAS on behalf of the University of California. The agreement, which benefits researchers at all University of California campuses and the Lawrence Berkeley and Lawrence Livermore National Laboratories, runs from August 1, 2021, to July 31, 2023.

Under the agreement, corresponding authors from any University of California institution, including the Lawrence Berkeley and Lawrence Livermore National Laboratories, may publish open access in PNAS for a discounted total rate of \$3,000 per article, with no separate article page charges. A CC BY license is applied to the article by default; authors may opt to change to CC BY-NC-ND.

Authors may also opt out of using an open access license to publish their article and choose subscription-only access instead. These authors will pay PNAS article charges as outlined in the [Article Processing Charges](#).

How to take advantage of this agreement:

- The corresponding author must be affiliated with a University of California campus, the Lawrence Berkeley National Laboratory, or the Lawrence Livermore National Laboratory, and the author must publish under this affiliation.
- The author should use their institutional email address when submitting their paper, if possible. The author will be asked to validate their institution if a validated institution is not already linked to the author's user profile. A University of California institution or either the Lawrence Berkeley or the Lawrence Livermore National Laboratories must be indicated.
- If invited to submit a final revision, the author will receive a request to sign the License to Publish once the revision is received. The corresponding author must choose either a CC BY or CC BY-NC-ND license to qualify for this agreement.
- The article must be accepted for publication in PNAS between August 1, 2021, and July 31, 2023.
- Authors who publish in PNAS always retain copyright ownership and have the ability to set the copyright owner as their institutions when required.

Max Planck Society Publish-and-Read Transformative Agreement



Max Planck Digital Library (MPDL) has signed a Publish-and-Read Transformative Agreement with the NAS on behalf of the Max Planck Society. The agreement, which benefits corresponding authors affiliated with the Max Planck Society, runs from May 1, 2023, to April 30, 2026.

Under the agreement, corresponding authors from any Max Planck Society institute may publish open access in PNAS without incurring individual article processing charges (APCs). A CC BY license must be selected. Authors who opt out of publishing their articles with an open access license should contact PNASaubilting@nas.edu for guidance on covering the PNAS charges for their articles.

How to take advantage of this agreement:

- The corresponding author must be affiliated with an institution participating in this pilot agreement, and the author must publish under this affiliation.
- The author should use their institutional email address when submitting their paper, if possible. The author will be asked to validate their institution if a validated institution is not already linked to the author's user profile.
- If invited to submit a final revision, the author will receive a request to sign the License to Publish once the revision is received. The corresponding author should choose a CC BY license to qualify for this agreement.
- The article must be accepted for publication in PNAS between May 1, 2023, and April 30, 2026.
- Authors who publish in PNAS always retain copyright ownership or have the ability to set the copyright owner as their institutions when required.

PNAS and Funder Mandates

All authors who publish in PNAS under a CC BY license retain copyright ownership for their work, along with the right to post their accepted manuscript under the same CC BY license. PNAS makes all published articles available through PMC and Europe PMC at the close of each weekly issue.

Bill & Melinda Gates Foundation

Authors whose research was funded in part or in whole by the Gates Foundation may comply with the [Gates Foundation open access policy](#) as follows:

- Include the following acknowledgment in your manuscripts submitted for publication to PNAS:

"This work was supported, in whole or in part, by the Bill & Melinda Gates Foundation [grant number]. Under the grant conditions of the Foundation, a Creative Commons Attribution 4.0 Generic License has already been assigned to the Author Accepted Manuscript version that might arise from this submission."

- Choose a CC BY license for your article. Note that the Gates Foundation does not permit you to use their funds to pay the article processing charges (APCs) associated with publishing open access in PNAS.
- Include a data availability statement with your article that describes where any primary data, associated metadata, original software, and any additional relevant materials necessary to understand, assess, and replicate the reported study findings in totality can be found. Make this data freely available on publication. PNAS requires a data availability statement for all published articles. [Learn more about data availability statements at PNAS](#). [Learn more about Gates Foundation data availability requirements](#).

HHMI

Authors whose publication results from research conducted in HHMI laboratories may continue to pay [their PNAS APC from their HHMI budget through December 31, 2022](#).

The Wellcome Trust

Authors may comply with the [Wellcome open access policy](#) by including the following statement in their submission, which will be included in the published article:

"This research was funded in whole or in part by the Wellcome Trust. For the purpose of Open Access, the author has applied a CC BY public copyright license to any Author Accepted Manuscript (AAM) version arising from this submission."

Wellcome Trust authors should also select a CC BY license for their PNAS article, which ensures that their article will be made freely available upon publication. Note that Wellcome does not permit authors to use their funds to pay the APC associated with publishing open access in PNAS.

Sign up for the
PNAS Highlights newsletter

Get in-depth science stories sent to your inbox twice a month.



name@example.com

[SUBSCRIBE >](#)**BROWSE**[CURRENT ISSUE](#)[PNAS NEXUS](#)[SPECIAL FEATURES](#)[COLLOQUIA](#)[LIST OF ISSUES](#)[COLLECTED PAPERS](#)[PNAS IN THE NEWS](#)[FRONT MATTER](#)[JOURNAL CLUB](#)[PODCASTS](#)**INFORMATION**[ABOUT](#)[DIVERSITY AND INCLUSION](#)[EDITORIAL BOARD](#)[AUTHORS](#)[REVIEWERS](#)[SUBSCRIBERS](#)[LIBRARIANS](#)[PRESS](#)[COZZARELLI PRIZE](#)[PNAS UPDATES](#)

Copyright © 2023 National Academy of Science. All rights reserved. | Online ISSN 1091-6490
 PNAS is a partner of CHORUS, CLOCKSS, COPE, CrossRef, ORCID, and Research4Life.

[Contact](#) | [Site Map](#) | [Terms & Privacy Policy](#)
 | [Accessibility](#)

