

Metformina e AMPK: Um Antigo Fármaco e Uma Nova Enzima no Contexto da Síndrome Metabólica

perspectivas

AUGUSTO CÉZAR SANTOMAURO JÚNIOR

MICHELLE REMIÃO UGOLINI

ANA TERESA SANTOMAURO

RICARDO PERES DO SOUTO

Disciplina de Bioquímica da Faculdade de Medicina do ABC, Santo André, SP, Brasil (ACJSJ, MRU, RPS); Disciplina de Endocrinologia e Metabologia da Faculdade de Medicina do ABC, Santo André, SP, Brasil (ATS).

RESUMO

A metformina é uma das drogas antidiabéticas orais mais prescritas mundialmente, entretanto seu mecanismo de ação permanece desconhecido. Os estudos do Diabetes Prevention Program Research Group demonstraram que tanto a administração de metformina como a mudança no estilo de vida (dieta e exercício físico) podem reduzir a incidência de diabetes melito tipo 2 (DM2). Uma possível conexão bioquímica entre essas duas terapias pode ser a proteína quinase ativada por AMP (AMPK). Essa enzima foi inicialmente descrita como um sensor energético celular, sendo ativada pelo exercício físico. Por outro lado, várias evidências experimentais indicam que a AMPK seja um alvo importante da ação da metformina. Este artigo discute as várias formas da regulação da AMPK, sugerindo um possível mecanismo para sua ativação pela metformina que envolve a formação de espécies reativas de nitrogênio. A ativação da AMPK determina ampla variedade de efeitos fisiológicos, incluindo o aumento da captação de glicose pelos músculos esqueléticos e aumento do catabolismo de lipídios, podendo ser interessante não apenas na prevenção e tratamento do DM2, mas também no contexto da síndrome metabólica. A descoberta da ativação da AMPK pela metformina faz dessa enzima importante alvo farmacológico. (**Arq Bras Endocrinol Metab 2008;52/1:120-125**)

Descritores: Metformina; Metabolismo energético; Terapia por exercício; Síndrome metabólica X; Diabetes Melito

ABSTRACT

Metformin and AMPK: An Old Drug and a New Enzyme in the Context of Metabolic Syndrome.

Metformin is one of the most commonly prescribed oral antidiabetic agents worldwide. However, its mechanism of action remains unknown. The Diabetes Prevention Program Research Group studies have shown that metformin administration and lifestyle-intervention (diet and exercise) reduce the incidence of Diabetes Mellitus type 2 (DM2). A possible biochemical connection between both therapies may be the AMP-activated protein kinase (AMPK). This enzyme was originally described as a sensor of cellular energy status, being activated in exercise. On the other hand, several experimental evidences indicate that AMPK may be an important target of metformin action. This paper discusses various ways for AMPK regulation, suggesting a possible mechanism for its activation by metformin that involves the production of reactive nitrogen species. AMPK activation determines a wide variety of physiological effects, including enhanced glucose uptake by skeletal muscle and enhanced lipid catabolism. Thus, it may be a key player not only in the prevention and treatment of DM2, but also in the development of new treatments for obesity and the metabolic syndrome. The finding of AMPK activation by metformin draws attention to this enzyme as an important pharmacological target. (**Arq Bras Endocrinol Metab 2008;52/1:120-125**)

Keywords: Metformin; Energy metabolism; Exercise therapy; Metabolic syndrome X; Diabetes mellitus

Recebido em 04/04/2007

Aceito em 30/10/2007

INTRODUÇÃO

A METFORMINA É UMA DAS DROGAS antidiabéticas orais mais comumente prescritas no mundo e deve manter essa posição apesar de inúmeros antidiabéticos orais que vêm sendo introduzidos no tratamento do diabetes melito tipo 2 (DM2) (1,2).

A metformina (dimetilbiguanida) é um derivado da guanidina, o composto ativo hipoglicemiante da *Galega officinalis* (3). Essa erva medicinal, também conhecida como Lilac francês, foi usada por séculos na Europa como tratamento do diabetes desde a época medieval (3). O uso das guanidinas e de seus derivados (fenformina, buformina e metformina) como agentes terapêuticos para DM data do início do século passado (1,3). Apesar da longa história e de décadas de sucesso no uso clínico da metformina como tratamento para DM2, seu mecanismo de ação permanece um enigma. Nem mesmo todo avanço da bioquímica e da biotecnologia conseguiu determinar exatamente seu alvo de atuação.

Em estudo do Diabetes Prevention Program Research Group (4), foi demonstrado que tanto a administração de metformina como a mudança no estilo de vida (dieta e exercício físico) reduziram a incidência do DM2 em 31% e 58%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle. O estudo também mostrou que tanto a metformina quanto a rigorosa mudança no estilo de vida foram capazes de reduzir significativamente a glicemia de jejum e a porcentagem de hemoglobina glicada (4). Esse resultado pode não ser apenas casual, pois recentemente mostrou-se que a proteína quinase ativada por AMP (AMPK), uma enzima celular que é estimulada pelo exercício físico, também é possivelmente o alvo de ação da metformina (5-8).

A prescrição de dieta e exercícios físicos para indivíduos portadores de DM2 está intimamente relacionada com a ativação da AMPK, a qual parece ser responsável por muitos efeitos benéficos no tratamento e na prevenção da doença (9). Essa enzima é um sensibilizador do balanço energético celular, sendo ativada pelo aumento da razão AMP/ATP (10). A AMPK é um provável alvo da metformina e existem indicações de que ela seja responsável por efeitos benéficos no tratamento e na prevenção do DM2 e da síndrome metabólica (7,11,12). Entretanto os mecanismos exatos pelos quais a metformina ativaria a AMPK ainda permanecem obscuros. O objetivo desta revisão é abordar as funções da AMPK no organismo e discutir os possíveis mecanismos moleculares pelos quais a metformina seria capaz de ativar a

AMPK, justificando a similaridade dos efeitos benéficos da terapia com essa droga e do aumento de atividade física sobre o portador de DM2.

METFORMINA

A experiência profissional com o uso da metformina mostra que esse medicamento é muito eficaz em reduzir a glicemia plasmática e a hemoglobina glicada nos pacientes com DM2. Essa efetividade clínica pode ser comprovada pelos resultados do estudo do UKPDS (13), que mostrou que a monoterapia com metformina em indivíduos obesos com DM2 por 29 semanas diminuiu tanto a porcentagem média da hemoglobina glicada quanto também a glicemia de jejum, quando comparados com o grupo controle. A redução da glicemia deve-se principalmente a suas ações hepáticas e musculares que apresentam efeito sensibilizador da insulina (1). No hepatócito, provoca inibição da gliconeogênese e da glicogenólise, e estimulação da glicogênese enquanto, nos tecidos periféricos insulino-dependentes, principalmente na musculatura esquelética, aumenta a captação de glicose provocando rápida redução da glicemia plasmática (1). Diferentemente dos secretagogos, a metformina não aumenta os níveis plasmáticos de insulina e não é hipoglicemiante, mesmo em doses consideráveis (1).

Esta biguanida também parece alterar o metabolismo lipídico, diminuindo os triglicérides plasmáticos e os ácidos graxos livres em virtude de uma inibição da lipólise (14). Muitos estudos mostraram também redução na taxa de colesterol e LDL e discreto aumento na taxa de HDL (15). Entretanto, alguns estudos indicam que não ocorrem alterações significativas nos níveis lipídicos após a administração deste fármaco (14,16). A metformina melhora as funções endoteliais (17), provoca discreta redução da pressão arterial (tanto sistólica quanto diastólica) (18) e reduz o peso de indivíduos com diabetes ou resistência periférica à insulina (16), possivelmente em virtude de propriedades anorexígenas. Por todas as ações descritas, a metformina apresenta potencial para reduzir o risco cardiovascular no DM2, devendo ser mais bem avaliada no contexto da síndrome metabólica.

Um possível mecanismo pelo qual a metformina exerce sua ação farmacológica é por meio da ativação da enzima AMPK.

PROTEÍNA QUINASE ATIVADA POR AMP – AMPK

A AMPK é uma enzima que induz uma cascata de eventos intracelulares em resposta a mudança da carga energética celular (10,19). O papel da AMPK no metabolismo celular é a manutenção da homeostasia energética (19). Todas as células vivas devem continuamente manter alta relação entre ATP e ADP para sobreviver. Isso é obtido por intermédio do catabolismo que aumenta a energia celular convertendo ADP e fosfato em ATP, enquanto o anabolismo diminui o componente energético celular, por converter ATP em ADP e fosfato. Convém ressaltar o fato de que a relação ATP–ADP nas células geralmente permanece quase constante, indicando que o mecanismo que regula esse processo é muito eficiente. A AMPK é um componente-chave desse equilíbrio fisiológico (10,19,20).

Essa enzima foi descrita pela primeira vez em 1973, como uma proteína induzida por AMP que inativa as enzimas 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase (HMG-CoA redutase) e a acetil CoA carboxilase (ACC) (10). Demorou-se mais de 14 anos para correlacionar a atividade dessa enzima com o balanço energético dentro da célula (10). AMPK é ativada pela fosforilação do resíduo de treonina 172, localizado no sítio de ativação do domínio catalítico da subunidade α (10,19,21). Esse mecanismo de ativação depende da ação de uma ou mais quinases regulatórias, denominadas AMPK quinase (AMPKK) (19,21). Diversas tentativas para determinar a identidade dessa enzima já foram feitas, e a principal candidata é a LKB1 (19). Essa proteína fosforila e ativa a AMPK *in vitro* e na sua ausência ou inibição a ativação da AMPK é abolida (19).

Além disso, como já está implicado no próprio nome, AMPK também é ativada por AMP. A ligação desse nucleotídeo à AMPK tem duas conseqüências: aumenta a velocidade catalítica da enzima e torna a AMPK um pior substrato para desfosforilação (21). Isso torna a cascata de ativação da AMPK ultra-sensível, ou seja, pequenas mudanças nos níveis de AMP induzem aumento dramático na atividade da AMPK (21).

O sistema da AMPK é, portanto, ativado por qualquer estresse que cause aumento na relação intra-celular AMP–ATP, tanto aqueles que interferem com a produção de ATP quanto também aqueles que aumentam o consumo de ATP (10). Esses estímulos ativadores são os mais diversos e podem ser fisiológicos como exercício físico e contração muscular ou patológicos como

deprivação de glicose, hipóxia, estresse oxidativo, choque osmótico, choque térmico, envenenamento metabólico, isquemia, diminuição do pH, inibição da glicólise e desacopladores da fosforilação oxidativa (10). Vale ressaltar o papel do exercício físico na ativação da AMPK, pois já foi comprovado que a atividade da enzima é aumentada por atividade física e contração muscular tanto em músculos de ratos quanto no músculo de humanos, sendo essa estimulação dose e intensidade-dependente (22). AMPK é regulada, da mesma forma que visto anteriormente, por alterações que modifiquem a relação creatina–fosfocreatina (10). Também é ativada por hormônios (via receptores acoplados a proteína G), por leptina e adiponectina (via mecanismos ainda desconhecidos) e por drogas antidiabéticas orais, como as tiazolidinedionas (glitazonas) e a metformina (10,19). Por outro lado, AMPK é inibida alostericamente por concentrações fisiológicas de fosfocreatina, da mesma forma que seus efeitos são também antagonizados por altas concentrações de ATP. Isso está de acordo com seu papel fisiológico de medidor do combustível celular (10). Além disso, as subunidades β da AMPK possuem domínio de ligação com o glicogênio (GBD); no músculo, altas concentrações de glicogênio reprimem a atividade da AMPK, provavelmente por interagir com esse GBD, entretanto não existem evidências diretas para confirmar essa hipótese (21).

Uma vez ativada, AMPK exerce efeitos sobre o metabolismo da glicose e dos lipídios, sobre expressão gênica e sobre síntese proteica (11). Essa enzima atua em diversos órgãos, incluindo fígado, músculo esquelético, coração, tecido adiposo e pâncreas (11). Sabendo que ela é ativada principalmente pela redução no conteúdo energético celular (ou seja, aumento na relação AMP–ATP), seu maior efeito é desligar vias metabólicas que consomem ATP (por exemplo, as vias anabólicas de síntese de ácidos graxos e de colesterol), ao mesmo tempo que estimula vias metabólicas que produzam ATP (por exemplo, as vias catabólicas de oxidação de glicose e de ácidos graxos) (10,19). Esses efeitos são de curto prazo e têm como objetivo manter a homeostasia energética dentro da célula (21). Para realizar esses efeitos, a AMPK fosforila diretamente enzimas regulatórias envolvidas nessas vias e também atua indiretamente sobre a expressão gênica (10,11).

No fígado, a AMPK tem um papel essencial sobre diversas cascatas celulares. Observa-se forte associação entre a ativação da enzima por fosforilação e a inativação da ACC também por fosforilação (6,11). Com a inativação da ACC não há concentrações de malonil

CoA suficientes para inibir a carnitina acil transferase e, portanto, há predominância da β -oxidação sobre a síntese de ácidos graxos, permitindo que a produção de energia prevaleça sobre o gasto (11). Mas a AMPK não atua apenas inibindo a síntese de ácidos graxos, ela também inativa a glicerol-fosfato-acil transferase (GPAT) e a HMGCoA redutase, enzimas-chaves na síntese de triglicérides e de colesterol, respectivamente (11). Mais ainda, AMPK também atua em longo prazo diminuindo a expressão de genes lipogênicos (por exemplo, FAS, S14, L-PK e SREBP-1) e neoglicogênicos (por exemplo, PEPCK e glicose-6-fosfatase) (11). Em suma, a AMPK atua no fígado diminuindo a síntese de lipídios e estimulando a queima de gordura, além de bloquear a produção hepática de glicose (11,12). Na musculatura esquelética, AMPK atua principalmente estimulando a captação de glicose. Sabe-se que mais de 70% da retirada de glicose do plasma é feita pelos músculos esqueléticos, logo esse fenômeno é essencial para a homeostasia da glicose (1,5,22). A AMPK pode contribuir por intermédio de dois mecanismos para a captação de glicose pelo músculo: aumentando a translocação do transportador de glicose GLUT4 e aumentando a sensibilidade à insulina (8,20). Outras importantes atividades atribuídas à AMPK são a regulação da síntese de insulina e sua consequente secreção pelas células betas das ilhotas pancreáticas, além de aprimorar a sensibilidade à insulina nos tecidos hepático e muscular (10). Finalmente, a AMPK também atua nas funções hipotalâmicas, modulando os eventos relacionados com a fome e a saciedade (23).

Os efeitos da ativação da AMPK no metabolismo em geral são benéficos para pacientes com DM2, sendo um potencial-alvo para futuros agentes terapêuticos no tratamento da síndrome metabólica.

ATIVAÇÃO DA AMPK PELA METFORMINA

Zhou e cols. mostraram que a metformina é capaz de ativar a AMPK em hepatócitos e músculos esqueléticos de ratos *in vitro* e *in vivo* (11). Zang e cols. também mostraram que essa enzima é ativada pela metformina em cultura de hepatócitos humanos insulino-resistentes HepG2 (12). Zou e cols. comprovaram essa ativação da AMPK no endotélio de aorta *in vivo* (8). Musi e cols. aprimoraram as pesquisas e observaram que essa ativação também ocorria em humanos, mais especificamente no músculo esquelético de pacientes com DM tipo 2 (5). De acordo com esses estudos, pode-se supor que a

metformina seja capaz de ativar a AMPK em diversos tecidos do corpo humano.

Sabe-se que a ativação da AMPK é dose-dependente, sendo que a metformina é capaz de ativar indiretamente ambas isoformas $\alpha 1$ e $\alpha 2$ eficientemente em culturas celulares (19). Vários estudos mostraram que a fosforilação do resíduo de treonina 172, provavelmente pela ação da LKB1, é essencial para ativação da AMPK, confirmando que esse é o sítio estimulatório mais importante da enzima (10,19,22,23). Entretanto, essa fosforilação da AMPK pela LKB1 não foi observada em preparados celulares *in vitro* (8). Provavelmente a metformina atua deflagrando uma cascata enzimática intracelular cujos elementos finais são a LKB1 e a AMPK, mas os mecanismos intermediários ainda não foram elucidados (8).

Zang e cols. mostraram que a ativação da AMPK é necessária para que a metformina exerça seus efeitos de redução do perfil lipídico (12). Isso ocorre por meio da fosforilação e da consequente inativação da ACC e da HMGCoA redutase em hepatócitos, contribuindo para a redução do conteúdo de ácidos graxos e do colesterol, além de diminuir a síntese de lipoproteínas (12). Como consequência desse efeito, há aumento da oxidação de ácidos graxos no hepatócito, diminuindo a esteatose hepática e aprimorando a sensibilidade do fígado à insulina (12).

O aumento da captação de glicose pelo músculo esquelético é um dos efeitos comuns tanto da metformina quanto do exercício físico (11,22). O provável mecanismo pelo qual isso ocorre deve envolver a AMPK. Já foi demonstrado que a metformina ativa AMPK, isoformas $\alpha 1$ e $\alpha 2$ agudamente no músculo isolado de ratos (11,22), da mesma forma que a atividade física e a contração muscular também levam ao aumento da atividade da AMPK (22). Observou-se que o exercício aumenta a transcrição do gene do GLUT4 e de proteínas da musculatura esquelética (22). Existem evidências consideráveis de que esse mecanismo também envolve a ativação da AMPK. É importante lembrar que a atividade da AMPK depende de duas taxas metabólicas – AMP–ATP e creatina–fosfocreatina – as quais se encontram aumentadas durante o exercício físico (21,24). A ativação da AMPK, seja por exercício seja por metformina, está relacionada com aumento da captação de glicose pelo músculo esquelético, via translocação de GLUT4, independentemente de insulina. Isso ocorre principalmente no exercício físico agudo, porém ainda não se sabe se a AMPK tem o papel principal nes-

se mecanismo de captação de glicose (20,22). Além disso, evidências mostram que a AMPK também aumenta a captação de glicose mediada por insulina no período pós-exercício, potencializando a sinalização desse hormônio (24).

Em busca das relações moleculares entre a AMPK e a metformina, inicialmente considerou-se a capacidade dessa droga de inibir o complexo I da cadeia mitocondrial (25) provocando dessa forma alteração na carga energética intracelular, a qual ativaria a AMPK. Entretanto, essa hipótese mostrou-se controversa e não pôde ser completamente confirmada por todos os estudos experimentais. Musi e cols. (5) mostraram que o tratamento de indivíduos com DM2 com metformina por dez semanas foi acompanhado de pequena redução da concentração de ATP e fosfocreatina no músculo (5). Fryer e cols. (7) mostraram que a metformina ativa a AMPK *in vitro* sem provocar mudanças detectáveis na relação AMP-ATP. Na tentativa de acomodar todas essas informações, Zou e cols. (8) propuseram um novo mecanismo pelo qual a metformina seria capaz de ativar a AMPK de maneira dose-dependente em paralelo com aumento de espécies reativas de nitrogênio (RNS) produzidas na mitocôndria. Esse estudo indicou que o ONOO⁻, um potente agente oxidante formado pela reação do óxido nítrico (NO) com o ânion superóxido (O₂⁻), é capaz de ativar a AMPK *in vivo* e *in vitro* (8). A inibição do complexo I da cadeia respiratória pela metformina favorece a produção de ânions superóxidos e conseqüentemente de ONOO⁻, responsável por ativar indiretamente a AMPK (8). Vale ressaltar que o ONOO⁻ não ativa diretamente a AMPK, mas induz a formação de intermediários capazes de ativar a LKB1, enzima responsável pela fosforilação e conseqüente ativação da AMPK (8).

DISCUSSÃO

A metformina e o exercício físico parecem ter efeitos semelhantes sobre a ativação da AMPK, principalmente na musculatura esquelética. No entanto, o estudo epidemiológico comparativo entre as ações da metformina e do exercício físico (4,9) não analisou o efeito do último separadamente. Os efeitos da metformina foram comparados aos efeitos da intervenção no estilo de vida, ou seja, a restrição alimentar associada às atividades físicas regulares, na prevenção do desenvolvimento de diabetes em indivíduos com intolerância à glicose (4). A intervenção no estilo de vida e a metformina mostra-

ram-se eficazes na prevenção do diabetes, sendo a intervenção no estilo de vida mais efetiva que a administração isolada de metformina (4). Não foi pesquisada, contudo, qual a relevância separadamente da dieta e do exercício físico na prevenção dessa doença. Talvez um estudo separado pudesse demonstrar maior semelhança entre os efeitos da metformina e do exercício físico. Nesse caso, a hipótese da AMPK ser o mediador intracelular de ambos os mecanismos seria significativamente favorecida.

No contexto da síndrome metabólica, observa-se que a metformina também apresenta efeito regularizador sobre o perfil lipídico (12,14,15) e função endotelial (17,18). Esse efeito, apesar de estatisticamente significativo, é menos intenso que a normalização da glicemia (26, 27) e pode passar despercebido na prática clínica. No entanto, deve ser considerado que o mecanismo de ação da metformina é distinto de outras drogas usadas no tratamento da síndrome metabólica, podendo haver potencialização de seu efeito em terapias combinadas.

Existem fortes evidências bioquímicas de que a ativação da AMPK seja o mecanismo principal pelo qual a metformina produz seus efeitos metabólicos benéficos. No contexto não-farmacológico, a ativação da AMPK ocorre em resposta ao exercício, uma atividade conhecida por ter impacto positivo para pacientes com DM2 (4,22). Desta forma, existe uma procura por agentes seletivos e mais potentes ativadores da AMPK (28), pois poderão tornar-se drogas importantes no tratamento das doenças que compõem a síndrome metabólica, como DM2, obesidade, dislipidemias, hipertensão e doença cardiovascular. Neste sentido, torna-se fundamental o conhecimento dos mediadores envolvidos na ativação dessa enzima.

REFERÊNCIAS

1. Bailey CJ, Turner RC. Metformin. *N Engl J Med*. 1996;334:574-9.
2. Wysowski DK, Armstrong G, Governale L. Rapid increase in the use of oral antidiabetic drugs in the United States, 1990-2001. *Diabetes Care*. 2003;26:1852-5.
3. Bailey CJ, Day C. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes Care*. 1989;12:553-64.
4. Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, et al. Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med*. 2002;346:393-403.
5. Musi N, Hirshman MF, Nygren J, Svanfeldt M, Bavenholm P, Rooyackers O, et al. Metformin increases AMP-activated pro-

- tein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51:2074-81.
6. Hawley SA, Gadalla AE, Olsen GS, Hardie DG. The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism. *Diabetes*. 2002;51:2420-5.
 7. Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D. The anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J Biol Chem*. 2002;277:25226-32.
 8. Zou MH, Kirkpatrick SS, Davis BJ, Nelson JS, Wiles WG 4th, Schlattner U, et al. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo – role of mitochondrial reactive nitrogen species. *J Biol Chem*. 2004;279:43940-51.
 9. Kitabchi AE, Temprosa M, Knowler WC, Kahn SE, Fowler SE, Haffner SM, et al. The Diabetes Prevention Program Research Group. Role of insulin secretion and sensitivity in the evolution of type 2 diabetes in the diabetes prevention program: effects of lifestyle intervention and metformin. *Diabetes*. 2005;54:2404-14.
 10. Hardie DG. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of energy status. *Endocrinology*. 2003;144:5179-83.
 11. 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;108:1167-74.
 12. Zang M, Zuccolo A, Hou X, Nagata D, Walsh K, Herscovitz H, et al. AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells. *J Biol Chem*. 2004;279:47898-905.
 13. 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;352:854-65.
 14. Marchetti P, Benzi L, Cerri M, Cecchetti P, Giannarelli R, Giancchini M, et al. Effect of plasma metformin concentrations on serum lipid levels in type II diabetic patients. *Acta Diabetol Lat*. 1988;25:55-62.
 15. Rains SG, Wilson GA, Richmond W, Elkeles RS. The reduction of low density lipoprotein cholesterol by metformin is maintained with long-term therapy. *J R Soc Med*. 1989;82:93-4.
 16. Haupt E, Knick B, Koschinsky T. Oral antidiabetic combination therapy with sulphonylureas and metformin. *Diabetes Metab*. 1991;17:224-31.
 17. de Aguiar LG, Bahia LR, Villela N, Laflor C, Sicuro F, Wiernsperger N, et al. Metformin improves endothelial vascular reactivity in first-degree relatives of type 2 diabetic patients with metabolic syndrome and normal glucose tolerance. *Diabetes Care*. 2006;29:1083-9.
 18. Verma S, Yao L, Dumont AS, McNeill JH. Metformin treatment corrects vascular insulin resistance in hypertension. *J Hypertens*. 2000;18:1445-50.
 19. Carling D. The AMP-activated protein kinase cascade – a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci*. 2004;29:18-23.
 20. Schimack G, DeFronzo RA, Musi N. AMP-activated protein kinase: role in metabolism and therapeutic implications. *Diabetes Obes Metab* 2006;8:591-602.
 21. Winder WW, Hardie DG. AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 1999;277:E1-10.
 22. Musi N, Goodyear LJ. AMP-activated protein kinase and muscle glucose uptake. *Acta Physiol Scand*. 2003;178:337-45.
 23. Ruderman NB, Saha AK, Kraegen EW. Minireview: malonyl CoA, AMP-activated protein kinase, and adiposity. *Endocrinology*. 2003;144:5166-71.
 24. Zheng D, MacLean PS, Pohnert SC, Knight JB, Olson AL, Winder WW, et al. Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase. *J Appl Physiol*. 2001;91:1073-83.
 25. Owen MR, Doran E, Halestrap AP. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J*. 2000;348:607-14.
 26. Robinson AC, Burke J, Robinson S, Johnston DG, Elkeles RS. The effects of metformin on glycemic control and serum lipids in insulin-treated NIDDM patients with suboptimal metabolic control. *Diabetes Care*. 1998;21:701-5.
 27. Orchard TJ, Temprosa M, Goldberg R, Haffner S, Ratner R, Marcovina S, et al. Diabetes Prevention Program Research Group. The effect of metformin and intensive lifestyle intervention on the metabolic syndrome: the Diabetes Prevention Program randomized trial. *Ann Intern Med*. 2005;142:611-9.
 28. 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;3:403-16.

Endereço para correspondência:

Ricardo Peres do Souto
Departamento de Morfologia e Fisiologia – Faculdade de Medicina do ABC
Avenida Lauro Gomes, 2.000
09060-870 Santo André, SP
E-mail: ricardo.souto@fmabc.br