

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**EFEITOS DA INGESTÃO AGUDA E CRÔNICA DE METFORMINA
EM ORGANISMOS SAUDÁVEIS EM EXERCÍCIO DE ALTA
INTENSIDADE: ABORDAGEM METABOLÔMICA, FISIOLÓGICA E
DE DESEMPENHO FÍSICO**

VICTOR JOSÉ BASTOS DA SILVA

**MACEIÓ
2021**

VICTOR JOSÉ BASTOS DA SILVA

**EFEITOS DA INGESTÃO AGUDA E CRÔNICA DE
METFORMINA EM ORGANISMOS SAUDÁVEIS EM
EXERCÍCIO DE ALTA INTENSIDADE: ABORDAGEM
METABOLÔMICA, FISIOLÓGICA E DE DESEMPENHO
FÍSICO**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: **Prof. Dr. Gustavo Gomes de Araujo**

Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde

Universidade Federal de Alagoas

MACEIÓ

2021

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S586e Silva, Victor José Bastos da.
Efeitos da ingestão aguda e crônica de metformina em organismos saudáveis em exercício de alta intensidade : abordagem metabólica, fisiológica e de desempenho físico / Victor José Bastos da Silva. – 2021.
71 f. : il., grafs., tabs. color.

Orientador: Gustavo Gomes de Araujo.

Tese (doutorado em ciências da saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Maceió, 2021.

Bibliografia: f. 60-61.

Anexos: f. 63-71.

1. Biguanidas. 2. Exercício físico. 3. Desempenho físico funcional. 4. Saúde.
I. Título.

CDU: 796.015

Folha de Aprovação

VICTOR JOSÉ BASTOS DA SILVA

EFEITOS DA INGESTÃO AGUDA E CRÔNICA DE METFORMINA EM ORGANISMOS SAUDÁVEIS EM EXERCÍCIO DE ALTA INTENSIDADE: ABORDAGEM METABOLÔMICA, FISIOLÓGICA E DE DESEMPENHO FÍSICO

Tese submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas e aprovada em 24 de setembro de 2021.

Banca Examinadora



Prof. Dr. Gustavo Gomes de Araujo (ORIENTADOR)



Prof. Dr. Filipe Antônio de Barros Sousa



Prof. Dr. Pedro Paulo Menezes Scariot





Prof.ª Dr.ª Sara Kely Learsi da Silva Santos Alves



Prof. Dr. Edson de Souza Bento

RESUMO

A metformina é uma droga amplamente utilizada para o tratamento do diabetes tipo 2 com vários mecanismos celulares. A ação da metformina inclui a redução da hiperinsulinemia e resistência periférica à insulina, controle do metabolismo lipídico, estimulação da captação e síntese de glicose. Desse modo, a presente tese foi dividida em dois momentos: (1) realizamos a ingestão aguda de metformina, 1h antes do teste anaeróbio Wingate de 30 s, considerado o padrão ouro para medir o desempenho em exercícios de curta duração e de alta intensidade no ciclismo e (2) a ingestão crônica da metformina associada ao treinamento intervalado de alta intensidade para verificar seus efeitos no desempenho físico e em variáveis fisiológicas e metabólicas. No estudo (1) não foram encontradas diferenças entre o placebo e a metformina para a potência pico ($1056,8 \pm 215,8$ W vs. $1095,2 \pm 199,3$ W, respectivamente; $p = 0,24$). A potência média ($630,9 \pm 87,8$ W vs. $613,1 \pm 94,8$ W, respectivamente; $p = 0,01$) e o trabalho total (18928 ± 2633 kJ vs. 18393 ± 2845 kJ, respectivamente; $p = 0,01$) na condição metformina foram maiores do que no placebo. A potência foi maior na metformina quando comparado ao placebo nos momentos 3 ($p = 0,01$), 4 ($p = 0,01$), 5 ($p = 0,04$), 6 ($p = 0,04$), 7 ($p = 0,02$), 8 ($p = 0,03$) e 9 ($p = 0,01$) segundos. No estudo (2), com relação ao número de saltos, não observamos diferenças entre os grupos metformina e controle. No que tange o aumento da massa corporal, quando analisamos as oito semanas completas, não houve diferença entre grupos, permanecendo apenas a diferença em relação ao tempo de treinamento ($p < 0,001$). O glicogênio hepático e do músculo sóleo não foram alterados pela ingestão de metformina. Já o conteúdo de glicogênio do músculo gastrocnêmio foi menor ao final da oitava semana no grupo metformina quando comparado ao grupo controle ($p = 0,01$). Sendo assim, a administração aguda de metformina aumentou a fase inicial de potência e a potência média de um teste de Wingate e o uso crônico da metformina além de não melhorar o número de saltos e a síntese de glicogênio hepático, influencia negativamente a síntese de glicogênio muscular quando comparado à situação controle em animais saudáveis.

Palavras-chave: biguanida, exercício físico, desempenho físico, saúde

ABSTRACT

Metformin is a widely used drug for the treatment of type 2 diabetes with multiple cellular mechanisms. The action of metformin includes the reduction of hyperinsulinemia and peripheral insulin resistance, control of lipid metabolism, stimulation of glucose uptake and synthesis. Thus, this thesis was divided into two moments: (1) we performed the acute ingestion of metformin, 1h before the 30-s Wingate anaerobic test, considered the gold standard to measure performance in short duration and high intensity exercises in the cycling and (2) chronic metformin intake associated with high-intensity interval training to verify its effects on physical performance and on physiological and metabolic variables. In study (1), no differences were found between placebo and metformin for peak power (1056.8 ± 215.8 W vs. 1095.2 ± 199.3 W, respectively; $p = 0.24$). The mean power (630.9 ± 87.8 W vs. 613.1 ± 94.8 W, respectively; $p = 0.01$) and the total work (18928 ± 2633 kJ vs. 18393 ± 2845 kJ, respectively; $p = 0.01$) in the metformin condition were greater than in the placebo. Potency was greater in metformin when compared to placebo at times 3 ($p = 0.01$), 4 ($p = 0.01$), 5 ($p = 0.04$), 6 ($p = 0.04$), 7 ($p = 0.02$), 8 ($p = 0.03$) and 9 ($p = 0.01$) seconds. In study (2), regarding the number of jumps, we did not observe differences between the metformin and control groups. Regarding the increase in body mass, when we analyzed the eight complete weeks, there was no difference between groups, with only the difference in relation to training time remaining ($p < 0.001$). Hepatic and soleus muscle glycogen were not altered by ingestion of metformin. The glycogen content of the gastrocnemius muscle was lower at the end of the eighth week in the metformin group when compared to the control group ($p = 0.01$). Thus, the acute administration of metformin increased the initial phase of potency and the average potency of a Wingate test and the chronic use of metformin, besides not improving the number of jumps and hepatic glycogen synthesis, negatively influences the glycogen synthesis muscle when compared to the control situation in healthy animals.

Keywords: biguanide, physical exercise, physical performance, health

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	07
2. ARTIGO CIENTÍFICO 1.....	11
3. ARTIGO CIENTÍFICO 2.....	30
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
5. REFERÊNCIA GERAL	59
6. ANEXOS.....	62

1 INTRODUÇÃO GERAL

A metformina é uma biguanida desenvolvida a partir da galegina, um derivado da guanidina encontrado na *galega officinalis*. Atualmente, a metformina é recomendada como agente de primeira linha no tratamento do diabetes tipo 2 em associação com modificações no estilo de vida (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018). É considerado um tratamento rentável e seguro, devido à falta de hipoglicemia como efeito colateral.

A metformina não é metabolizada em animais ou seres humanos, é eliminada intacta por excreção renal. A meia-vida de eliminação da metformina durante doses múltiplas em pacientes com boa função renal é de aproximadamente 5 horas (GRAHAM e colaboradores, 2011). Seu pico da concentração plasmática ocorre em aproximadamente 3 h (FORETZ et al., 2014). A dose ideal de metformina oral para muitos pacientes diabéticos é de aproximadamente 2g/dia (FORETZ et al., 2014). Após uma dose oral única, a metformina é rapidamente distribuída em muitos tecidos após absorção parcial pelo intestino delgado, mas a concentração luminal no trato gastrointestinal permanece alta.

O principal tecido alvo da metformina é o fígado e seu principal efeito é a diminuição da produção hepática de glicose, em grande parte devido à supressão da gliconeogênese, que leva a níveis mais baixos de glicose no sangue em jejum sem estimulação à insulina e ganho de peso (PRYOR e CABREIRO, 2015). Além disso, a metformina tem um efeito inibitório do complexo mitocondrial 1, cuja inibição aumenta a relação AMP/ATP (OWEN, DORAN e HALESTRAP, 2000). Esse estado energético celular alterado induz a ativação da AMPK.

Junto aos efeitos redutores da glicose, muitos efeitos não-glicêmicos da metformina foram relatados, incluindo a função endotelial e a proliferação celular (ANABTAWI e MILES, 2016). A inibição do complexo mitocondrial 1 nas células cancerígenas reduz a gênese de tumor (WHEATON et al., 2014). A ativação da AMPK pela metformina estimula a atividade do óxido nítrico sintetase endotelial, que exerce um efeito direto na proteção endotelial (DAVIS et al., 2006). E ainda, a metformina tem efeitos inibitórios na sinalização da mTOR, bem como suprime a proliferação celular de maneira dependente ou independente de AMPK (KALENDER et al., 2010).

Devido aos benefícios da metformina, sua ingestão também tem sido estudada em seres saudáveis. Recentemente, uma metanálise demonstrou que a metformina não afeta o VO_2 e o VO_{2pico} em voluntários saudáveis (DAS et al.,

2018). Isso provavelmente aconteça em razão da metformina inibir a transferência de elétrons no sistema de transporte de elétrons mitocondrial, contudo, esse mecanismo parece aumentar o metabolismo anaeróbico. Nesse sentido, estudos recentes verificaram que a ingestão aguda de metformina 60 minutos antes do teste experimental melhorou o desempenho em um exercício em ciclo ergômetro com uma intensidade de 110% do VO_2 máx em indivíduos saudáveis (LEARSI et al., 2015). E de Araujo et al. (2019), utilizando o método de potência crítica para natação em ratos saudáveis, encontraram melhoria no tempo até a exaustão e na capacidade de trabalho anaeróbia após a ingestão da metformina, mas não houve diferença da capacidade aeróbia, tornando atraente imaginar que a metformina pode ser uma boa associação ao exercício de alta intensidade. No entanto, ainda não se conhece qual o metabolismo energético anaeróbio sofre maior influência com a administração desse fármaco, sistema ATP-CP e/ou glicolítico.

Em relação à administração a longo prazo de metformina em organismos saudáveis, os estudos indicaram o aumento no tempo até exaustão, utilizando o método de potência crítica para natação em ratos saudáveis (DE ARAUJO et al., 2019). Todavia, o tempo da administração de metformina foi entre 8-10 dias (MALIN et al., 2010; DE ARAUJO et al., 2019) e nenhum estudo até o presente contemplou um tempo mais prolongado de metformina e sua associação com o exercício crônico.

O treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT), exercícios intermitentes que envolvem a alternância de atividades de curta duração e alta intensidade com atividades de baixa intensidade para recuperação ou descanso promovem adaptações semelhantes ou melhores que os exercícios de longa duração e baixa intensidade (KETEYIAN et al., 2014). Entretanto, estas adaptações são obtidas com duração muito inferior em intensidades máximas ou submáximas, com segundos ou poucos minutos de intervalo (GIBALA et al., 2006).

As respostas moleculares agudas a uma sessão de HIIT estão intimamente associadas à fosforilação da AMPK. O que potencializa a translocação de GLUT4 para a membrana, aumentando a captação de glicose a partir de sinalização independente de insulina. Então, a literatura demonstra que o HIIT promove adaptações na célula muscular que afetam diretamente a captação de glicose (EGAN et al., 2010).

As adaptações ao treinamento físico, que produzem a melhora do desempenho, iniciam-se após os primeiros sinais gerados pela contração muscular, como aumento da concentração de Ca^{2+} sarcoplasmático, aumento da concentração de AMP, redução dos estoques de creatina fosfato e glicogênio, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, dentre outros fatores. O efeito cumulativo de cada sessão é responsável pela transcrição do RNAm em proteínas (EGAN e ZIERATH, 2013). Nesse contexto, o HIIT é bastante promissor quando comparado ao treinamento contínuo no que diz respeito à melhoria de desempenho e adaptações moleculares. E podendo esses efeitos serem potencializadores dos efeitos já supracitados da metformina, sendo sua associação atraente para amplificar os efeitos isolados de cada estratégia.

Desse modo, a presente tese foi dividida em dois momentos: (1) realizamos a ingestão aguda de metformina, 1h antes do teste anaeróbio Wingate de 30 s, considerado o padrão ouro para medir o desempenho em exercícios de curta duração e de alta intensidade no ciclismo e (2) a ingestão crônica da metformina associada ao HIIT para verificar seus efeitos no desempenho físico e em variáveis fisiológicas e metabólicas.

2 ARTIGO CIENTÍFICO 1

BASTOS-SILVA, VJ; MARINHO, AH; SILVA, JBB; SOUSA, FABS; LEARSI, S; BALIKIAN, P; DE ARAUJO, GG. A administração aguda de metformina aumenta a potência média e a fase inicial da potência durante um teste de Wingate em indivíduos saudáveis do sexo masculino. Revista Científica a qual foi publicada: European Journal of Sport Science (Classificação B2, segundo os critérios do sistema *Qualis* da CAPES/Área de Medicina II). (Versão original em anexo).

Resumo

O presente estudo testou a hipótese de que a metformina aguda aumentaria a potência de pico medida durante um teste de Wingate. Quatorze homens (24 ± 6 anos; $75,8 \pm 10,2$ kg; 177 ± 7 cm) participaram de quatro sessões de teste, conduzidas em um modelo duplo-cego, contrabalançado e cruzado. A primeira e a segunda sessões consistiram em medidas antropométricas e um teste de Wingate por dia para avaliar a confiabilidade teste-reteste. Nas duas últimas sessões, os testes de Wingate foram realizados com metformina (cápsula de 500 mg, 1 hora antes) ou placebo (cápsula de celulose, 1 hora antes). Não foram encontradas diferenças entre o placebo e a metformina para a potência pico ($1056,8 \pm 215,8$ W vs. $1095,2 \pm 199,3$ W, respectivamente; $p = 0,24$). A potência média ($630,9 \pm 87,8$ W vs. $613,1 \pm 94,8$ W, respectivamente; $p = 0,01$) e o trabalho total (18928 ± 2633 kJ vs. 18393 ± 2845 kJ, respectivamente; $p = 0,01$) na condição metformina foram maiores do que no placebo. A potência foi maior na metformina quando comparado ao placebo nos momentos 3 ($p = 0,01$), 4 ($p = 0,01$), 5 ($p = 0,04$), 6 ($p = 0,04$), 7 ($p = 0,02$), 8 ($p = 0,03$) e 9 ($p = 0,01$) segundos. Não houve diferenças entre as condições para o pico de lactato ($p = 0,08$) e a percepção subjetiva de esforço ($p = 0,84$). A administração aguda de metformina aumentou a fase inicial de potência e a potência média de um teste de Wingate.

Introdução

A metformina é uma droga amplamente utilizada para o tratamento do diabetes tipo 2 com vários mecanismos celulares (Inzucchi et al., 2015; Zhou et al., 2001). A ação da metformina em condições patológicas (ou seja, diabetes, obesidade e síndrome metabólica) inclui a redução da resistência periférica à insulina e hiperinsulinemia, controle do metabolismo lipídico, estimulação da captação e síntese de glicose (Eriksson et al., 2007). Foi relatado *in vitro* que a metformina diminui a produção de energia mitocondrial (Cameron et al., 2018), causando um declínio nas razões ATP / ADP livre e ATP / AMP (Carling, 2004; Zhou et al., 2001). Assim, devido à diminuição da respiração mitocondrial, o organismo pode aumentar a ressíntese de ATP a partir da fosfocreatina (PCr) para atender a demanda metabólica (Vytla & Ochs, 2013). Portanto, a administração de metformina levaria a uma maior contribuição de fosfatos de alta energia para a manutenção do funcionamento celular, mas os estudos sobre os efeitos da

metformina em organismos saudáveis, principalmente no desempenho e no metabolismo anaeróbio, ainda são escassos.

Em indivíduos saudáveis, a administração de metformina em curto prazo (500 mg de metformina em um único dia) não afeta a homeostase energética do músculo esquelético em repouso ou durante o exercício (Kristensen et al., 2019). No entanto, a ingestão de metformina (2000 mg) diminuiu o pico do consumo de oxigênio (VO_{2pico}) durante o protocolo de intensidade incremental (Braun et al., 2008). Um dado crucial relatado por Braun et al. (2008) é que não houve diferença entre as condições na carga final de trabalho alcançada, o que nos leva a hipotetizar que o metabolismo anaeróbio foi decisivo para a manutenção da carga de trabalho. Esta resposta pode ser devido à inibição na formação de energia, suprimindo seletivamente o acoplamento eficiente dos domínios redox e de transferência de prótons do complexo I do sistema de transporte de elétrons (Cameron et al., 2018).

Nesse sentido, foi hipotetizado que a ingestão de metformina seria benéfica para o desempenho durante os esforços que contam com altas taxas de rotatividade de ATP, como exercícios de curta duração e de alta intensidade. Em um estudo avaliando ratos saudáveis, de Araujo et al., (2020) relataram que, após 10 dias de ingestão de metformina (250 mg), o tempo até a exaustão em natação de alta intensidade, assim como a capacidade anaeróbia, eram maiores do que o grupo placebo. Em humanos, a ingestão aguda de metformina (ou seja, 500 mg 1 hora antes do teste) melhorou o tempo até a exaustão em um cicloergômetro a 110% da captação máxima de oxigênio (VO_{2max}), juntamente com o aumento da contribuição anaeróbia alática, mas não da energia anaeróbia láctica (Learsi, Bastos-Silva, Lima-Silva, Bertuzzi, & de Araujo, 2015). Assim, com base nos resultados em humanos, parece que a ingestão de metformina uma hora antes do exercício de alta intensidade pode melhorar o desempenho em homens saudáveis e fisicamente ativos. De acordo com os estudos acima citados (de Araujo et al., 2020; Learsi et al., 2015), e na lógica do aumento do uso dos níveis de PCr, a ingestão de metformina poderia ser uma forma de potencializar o desempenho esportivo em modalidades com grande demanda de rotatividade rápida de ATP. No entanto, ainda não foi confirmado o real efeito da metformina no desempenho de exercícios de curta duração e alta intensidade em indivíduos saudáveis.

Dois construtos são comumente usados para medir o desempenho em exercícios de curta duração e de alta intensidade: i) potência anaeróbia, ou a taxa

mais rápida de turnover de ATP durante o exercício; e ii) capacidade anaeróbia, ou a quantidade de ATP produzida por vias metabólicas independentes de oxigênio (Boulay et al., 1985; Minahan, Chia, & Inbar, 2007). Um protocolo comumente usado para avaliar esses construtos, e considerado o padrão ouro para o ciclismo, é o teste anaeróbio Wingate de 30 segundos (Bertuzzi, Kiss, Damasceno, Oliveira, & Lima-Silva, 2015). Esse teste consiste em um esforço total de 30 segundos e muitas vezes é analisado com base em variáveis mecânicas, como potência pico atingida (PP), potência média de saída (MP) e trabalho total realizado (TW). Além disso, as evidências mostram a associação de PP e MP a medidas fisiológicas, como a quebra de PCr e depleção de glicogênio muscular, respectivamente (Cheatham et al., 1986; Bogdanis, Nevill, Boobis, Lakomy, & Nevill, 1995; Patton & Duggan, 1987; Vincent et al., 2004). Dessa forma, o PP é frequentemente usado para medir a potência anaeróbia e, apesar de ser contestado (Minahan et al., 2007), o MP mostrou uma associação com a capacidade anaeróbia (Bogdanis et al., 1995; Demarie, Chirico, Gianfelici & Vannozzi, 2019).

A potência anaeróbia é de grande importância em muitos tipos de esportes, portanto, os efeitos ergogênicos da suplementação sobre este construto são de interesse óbvio. De acordo com nosso melhor conhecimento, nenhum estudo avaliou a ingestão aguda de metformina no teste anaeróbio de Wingate em indivíduos saudáveis. Portanto, o presente estudo teve como objetivo investigar um efeito agudo da ingestão de metformina no desempenho do teste anaeróbio Wingate de 30 segundos em indivíduos saudáveis do sexo masculino. Nossa hipótese é que a metformina melhoraria o desempenho no teste anaeróbio Wingate 30 segundos com um aumento da PP devido à sua associação com os níveis de PCr.

Materiais e métodos

Design do estudo

O estudo foi conduzido em um modelo randomizado, cruzado, contrabalançado e duplo-cego. Foram realizadas quatro visitas com intervalo mínimo de 72 e máximo de 96 horas. Na primeira sessão, foram realizadas as medidas antropométricas (massa corporal, estatura e dobras cutâneas) e a primeira familiarização com o protocolo do teste anaeróbio de Wingate. O teste anaeróbio

de Wingate foi realizado novamente 72 horas após a primeira sessão de teste para determinar a confiabilidade teste-reteste das medições. As duas últimas sessões consistiram dos procedimentos experimentais em condições de metformina ou placebo. Um pesquisador realizou a randomização e o contrabalanceamento das condições (ou seja, metformina e placebo) por meio do site randomizer.org, com o objetivo de garantir a alocação imparcial dos sujeitos.

Um recordatório alimentar de 24 horas foi concluído por cada sujeito antes da primeira familiarização; foi então fotocopiado e devolvido aos participantes para que a mesma dieta fosse repetida nos ensaios subsequentes. Pedimos aos participantes que evitassem exercícios exaustivos, ingestão de álcool e cafeína por 24 horas antes da coleta de dados para evitar interferências nos resultados.

Participantes

Quatorze homens fisicamente ativos (mínimo de 150 minutos por semana de exercício moderado) e saudáveis participaram do presente estudo. A quantidade mínima de atividade física foi obtida por meio de uma simples entrevista com os participantes. Os participantes receberam informações sobre os riscos e benefícios experimentais do estudo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido antes de iniciar os experimentos. Todos os procedimentos do estudo foram conduzidos de acordo com a Declaração de Helsinque e foram aprovados pelo comitê de ética local (1420/12). O consentimento informado por escrito para participar do estudo foi obtido de todos os sujeitos após receberem informações detalhadas sobre os procedimentos.

Medidas antropométricas

A massa corporal foi mensurada em balança eletrônica e a estatura em estadiômetro. Para avaliar a espessura das dobras cutâneas, foi utilizado um Lange Skinfold Caliper (Cambridge, MD, EUA). A densidade corporal foi prevista pela equação generalizada de Jackson e Pollock (1985), seguida pela equação de Siri (1961) para estimar a gordura corporal.

Teste anaeróbio Wingate

O teste anaeróbio Wingate consiste em 30 segundos de um esforço total em um cicloergômetro (Bar-Or, 1987). Utilizou-se cicloergômetro com freio mecânico

(Biotec 2100®, CEFISE) e todos os dados foram calculados em código customizado em Matlab (Matlab 6.0®, MathWorks Inc, EUA). O torque foi obtido pela calibração do dinamômetro com pesos conhecidos, a fim de equalizar o torque realizado no sistema à carga aplicada no ergômetro. A equação de calibração para potência foi $W = (\text{Kgfm} * 6 * \text{rpm}) / 6,12$. Os sujeitos foram submetidos a um aquecimento de cinco minutos com uma carga aproximada de 150 watts (90 rpm e uma carga fixa de 2,5 Kp) e, ao final do 2º e 4º minutos, realizaram dois sprints *all-outs* de 6 segundos (Marinho et al., 2020). Após os procedimentos de aquecimento, os participantes foram instruídos a iniciar um ciclo lento e sem carga. Em -5 segundos, uma contagem regressiva começou. A largada em voo sem carga começou em -3 segundos. Em seguida, no ponto 0 segundos, a resistência equivalente a 7,5% da massa corporal foi adicionada, e os sujeitos realizaram um esforço total por 30 segundos (Marinho et al., 2020). PP foi obtido como o maior valor de potência mecânica em um intervalo de 1 segundo, MP a potência média ao longo do teste e TW foi obtido como o trabalho acumulado durante o teste, como quociente de potência e tempo.

A percepção subjetiva de esforço (PSE) foi coletada em repouso, antes e imediatamente após o teste por meio da escala BORG 6-20 (Borg, 1982). Amostras de sangue (25 µL) foram coletadas do lóbulo da orelha por tubo capilar antes e imediatamente, três e cinco minutos após o término do exercício, para determinar a concentração de repouso e o pico de lactato. As amostras de sangue foram imediatamente transferidas para microtubos contendo 25 µL de fluoreto a 1% e posteriormente centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm para separação do plasma. As concentrações plasmáticas de lactato foram medidas por método enzimático (Fabricado por GT Laboratory S.R.L. Code 475050 - Rosario - Argentina) em uma leitora de microplaca FlexStation® 3 Multi-Mode (Molecular Devices, Califórnia, EUA). O valor mais alto foi considerado a concentração de lactato plasmático de pico.

Administração de metformina

Os participantes ingeriram uma cápsula de 500 mg de metformina (99,6% puro) ou uma cápsula de placebo (cápsula de celulose com a mesma cor, tamanho e peso da cápsula de metformina) 60 minutos antes (Learsi et al., 2015) do teste anaeróbico de Wingate.

Efeitos colaterais gastrointestinais

Foi utilizado um questionário para verificar possíveis sintomas de desconforto gastrointestinal, composto por 19 itens referentes a azia, tontura e dor de cabeça (Jeukendrup et al., 2000). Os participantes atribuíram valores de 1 a 10, onde 1 é “nenhum problema” e 10 “o pior que já foi” para cada item avaliado. Os sintomas foram considerados graves quando o escore foi igual ou superior a 5 (Jeukendrup et al., 2000).

Análise estatística

Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão. A distribuição foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk (teste de normalidade) para determinar se atendeu às suposições paramétricas. Sob confirmação da distribuição de normalidade, examinamos a confiabilidade teste-reteste entre as sessões de familiarização por meio do teste t de Student para amostras pareadas, coeficiente de correlação intraclassa (ICC), erro técnico de medição (TEM) e coeficiente de variação (CV) (Hopkins, 2000).

O teste de hipótese para variáveis de teste anaeróbico Wingate (ou seja, PP, MP, TW) e PSE nas condições de metformina e placebo foram avaliados usando um teste t de Student para amostras emparelhadas. A potência a cada segundo e a concentração de lactato foram analisadas usando ANOVA de dois caminhos para medidas repetidas, seguido de testes post hoc de Bonferroni. Calculamos a magnitude das diferenças entre todos os tamanhos de efeito de Cohen das variáveis de metformina e placebo; os limiares para efeitos pequenos, moderados e grandes foram 0,20, 0,50 e 0,80, respectivamente (Cohen, 1988). Todas as análises foram realizadas com o *software* Statistical Package for the Social Sciences (SPSS; versão 25.0; IBM, Chicago, IL, EUA) e a significância foi aceita como $p \leq 0,05$.

Resultados

Características dos participantes

As características físicas dos participantes foram as seguintes: idade: 24 ± 6 anos; massa corporal: $75,9 \pm 10,2$ kg; altura: 177 ± 7 cm; índice de massa corporal: $24,6 \pm 3,2$ kg / m²; gordura corporal: $13,0\% \pm 5,5\%$.

Sintomas gastrointestinais

Nenhum participante relatou desconforto gastrointestinal significativo (todos <5 pontos para cada item do questionário) antes da ingestão. Da mesma forma, após o teste, nenhum participante mostrou desconforto gastrointestinal significativo nas condições de placebo e metformina.

Confiabilidade teste-reteste

Não houve diferenças significativas entre as medidas de teste e reteste para PP, MP e TW. Todas as variáveis mostraram um TEM baixo e um ICC moderado a alto (Tabela 1).

Tabela 1. Coeficiente de correlação intraclassa (ICC), Δ teste-reteste, erro típico de medição (TEM) e coeficiente de variação (CV) para variáveis de teste de Wingate

Variáveis	Teste	Reteste	Δ	ICC	TEM	CV (%)	p
PP (W)	1018.5 \pm 180.8	1038.9 \pm 179	20.4	0.89 (0.69 – 0.96)	0.31 (0.27 – 0.63)	6.3	0.39
MP (W)	608.1 \pm 94.5	615.4 \pm 97.8	7.3	0.96 (0.89 – 0.99)	0.21 (0.15 – 0.35)	3.2	0.37
TW (kj)	11288 \pm 1837	11656 \pm 1945	368	0.69 (0.28 – 0.89)	0.72 (0.52 – 1.15)	9.6	0.39

Nota. Valores listados como média \pm DP e intervalo de confiança (IC% 95). PP = potência de pico; MP = potência média; TW = trabalho total; W = watts; kj = Quilojoules.

Teste anaeróbio Wingate

MP e TW foram maiores na condição de metformina do que na condição de placebo (Tabela 2). Não foram encontradas diferenças estatísticas entre as condições de placebo e metformina para PP.

Além disso, houve um efeito principal de tempo ($F = 183,6$; $p < 0,01$), condição ($F = 8,9$; $p = 0,01$) e interação de condição e tempo para a potência gerada a cada segundo ($F = 2,29$; $p = 0,05$), com valores mais altos no momento 3 ($975,2 \pm 153,3$ W vs. $844,3 \pm 162,8$ W; $p = 0,01$), 4 ($848,2 \pm 132,1$ W vs. $790,7 \pm 146,9$ W; $p = 0,01$), 5 ($824,0 \pm 116,8$ W vs. $776,6 \pm 137,4$ W; $p = 0,04$), 6 ($800,9 \pm 103,6$ W vs. $760,7 \pm 121,6$ W; $p = 0,04$), 7 ($775,8 \pm 96,9$ vs. $742,0 \pm 110,0$ W; $p = 0,02$), 8 ($750,0 \pm 98,4$ W vs. $721,0 \pm 101,8$ W; $p = 0,03$) e 9 ($721,9 \pm 93,8$ W vs. $694,1 \pm$

101,1 W; $p = 0,01$) segundos na condição de metformina quando comparada à condição de placebo, respectivamente (Figura 1).

Tabela 2. Variáveis de teste de Wingate

Variáveis	Metformina	Placebo	P	Effect Size
PP (W)	1095.2 ± 199.3	1056.8 ± 215.8	0.24	0.33
MP (W)	630.9 ± 87.8*	613.1 ± 94.8	0.01	0.82
TW (kj)	18928 ± 2633	18393 ± 2845	0.01	0.82

Nota. Valores listados como média ± DP. PP = potência de pico; MP = potência média; TW = trabalho total; W = watts; kj = Quilojoules. * significativamente diferente da condição de placebo

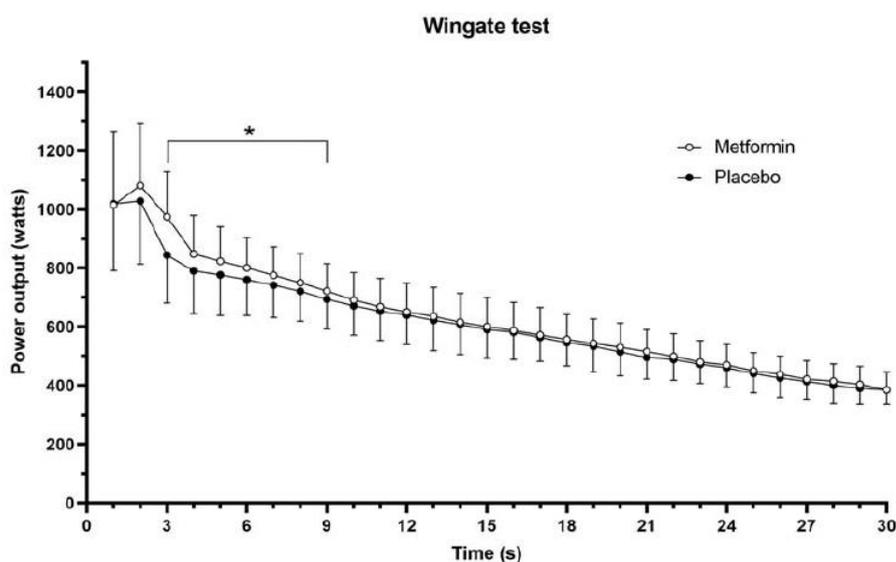


Figure 1. Mean and standard deviation every second in the Wingate test. Note. *Significantly different from placebo condition.

PSE e lactato plasmático

Não houve diferença significativa entre as condições para a variável PSE tanto em repouso quanto em exaustão. Da mesma forma, não houve diferença entre as condições ($F = 4,54$; $p = 0,06$) ou a interação condição-tempo ($F = 2,96$; $p = 0,11$), apenas no tempo [repouso vs pico de lactato ($F = 142,79$; $p < 0,01$)]; no entanto, um tamanho de efeito moderado foi observado no pico de lactato na condição de metformina. (Tabela 3).

Tabela 3. Variáveis fisiológicas e psicológicas

Variáveis	Metformina	Placebo	P	Effect Size
[Lac ⁻] resting (mmol/L)	1.47 ± 0.71	1.30 ± 0.43	0.41	0.25
[Lac ⁻] _{peak} (mmol/L)	9.08 ± 2.75	7.55 ± 2.10	0.08	0.49
[Lac ⁻] _{Δrest-peak} (mmol/L)	7.84 ± 2.96	6.49 ± 2.40	0.14	0.41
RPE resting	6.00 ± 0.00	6.07 ± 0.26	-	-
RPE end	16.92 ± 2.20	16.92 ± 1.65	0.84	0.01

Nota. Valores listados como média ± DP. PSE – Percepção subjetiva de esforço.

Discussão

Os principais resultados do estudo foi que a ingestão aguda de metformina melhora o MP, TW e a potência nos primeiros segundos durante um teste de Wingate. Porém, apesar do aumento da potência nos primeiros segundos com a administração de metformina, o PP permaneceu inalterado.

No estudo conduzido por Lears et al. (2015) a ingestão aguda de metformina (500 mg) aumentou o tempo até a exaustão em cicloergômetro a 110% do VO₂máx em relação à condição de placebo. Embora não haja diferença na capacidade anaeróbia medida pelo protocolo de déficit máximo de oxigênio acumulado (MAOD) após a ingestão de metformina, os autores observaram um aumento no componente rápido do consumo excessivo de oxigênio pós-exercício (EPOC_{fast}) que representa o PCr total gasto durante o exercício (Bertuzzi et al., 2016; Haseler, Hogan, & Richardson, 1999; Lears et al., 2015; Zagatto et al., 2019). O sistema de fosfato é o principal responsável pela ressíntese de ATP no exercício de esforço máximo nos primeiros 5-6 segundos, e sua contribuição deve continuar até que os estoques de PCr estejam principalmente esgotados, o que geralmente ocorre dentro de 10-15 s (Baker, McCormick, & Robergs, 2010).

Nosso estudo descobriu que a ingestão de metformina aumenta a potência de saída nos 3-9 segundos iniciais, o que provavelmente contribuiu para um aumento no MP. Tradicionalmente, o MP de Wingate tem sido utilizado para indicar a atividade do sistema anaeróbio láctico, o que não foi apontado por Lears et al. (2015) estudo com metformina. Não encontramos efeitos no PP, a variável do teste anaeróbio Wingate relacionada à via anaeróbia alática (Bertuzzi et al., 2015). No entanto, um resultado surpreendente foi encontrado no aumento da potência por meio do segundo 3-9 pareado entre as condições. Este resultado, combinado com

investigações anteriores, não poderíamos descartar que também houve um maior uso da via anaeróbia alática (Bogdanis et al., 1995; Gastin, 1994) com a administração de metformina, considerando o horizonte de tempo para o pico de atividade alática e fim da contribuição (Baker et al., 2010). É possível que, no estudo atual, um efeito combinado em ambos os metabolismos anaeróbicos tenha contribuído para aumentar a potência de 3 a 9 segundos de exercício. Esses resultados caracterizam o tempo de influência da metformina no desempenho, adicionando assim o achado de Learsy et al. (2015) considerando a falta de resolução temporal dos resultados do $EPOC_{fast}$.

Um aumento na PM foi acompanhado por uma tendência ($p = 0,08$) e tamanho do efeito moderado ($ES = 0,49$) nos valores de lactato de pico. Esse resultado pode estar associado à diminuição da produção de energia mitocondrial (Cameron et al., 2018). Além disso, parece que a metformina reduz a atividade da enzima piruvato carboxilase, responsável pela metabolização do piruvato em oxaloacetato durante o processo de gliconeogênese (Matyukhin, Patschan, Ritter, & Patschan, 2020). Desse modo, o comprometimento dessa função enzimática aumenta a conversão do piruvato em lactato em vez de oxaloacetato (Matyukhin et al., 2020). O comprometimento da conversão do oxaloacetato pode aumentar a renovação rápida do ATP pela via glicolítica, explicando o efeito da metformina na MP. Além disso, Pilmark et al. (2021) encontraram aumento nos níveis de lactato de jejum após três semanas de medicação, que também foi mantido após 12 semanas de treinamento mais metformina. A metformina aumenta a captação de glicose pelos enterócitos e, subsequentemente, aumenta a concentração de lactato nos enterócitos para aumentar a glicólise. Dito isso, o tamanho do efeito moderado do seu estudo pode ser explicado devido ao maior uso do metabolismo anaeróbio durante o exercício. Apesar desses resultados, em circunstâncias normais, os níveis terapêuticos de administração de metformina não têm efeito sobre o acúmulo de lactato no sangue. A acidose láctica associada à metformina parece refletir o uso prolongado de altas doses de metformina, o que não está relacionado ao nosso experimento (Rajasurya, Anjum, & Surani, 2019).

O aumento da MP também pode estar relacionado ao aumento da capacidade anaeróbia (Zupan et al., 2009). No modelo animal, a ingestão crônica de 250 mg de metformina por 10 dias aumentou a capacidade anaeróbia de ratos saudáveis (de Araujo et al., 2020). Uma possível explicação é que o uso (4 dias) de

metformina (500-100 mg) parece ter propriedades gluco-reguladoras, podendo aumentar o conteúdo de glicogênio muscular em indivíduos saudáveis (Scalzo et al., 2017). No entanto, nosso estudo utilizou a ingestão aguda de metformina, que parece insuficiente para aumentar os estoques de energia celular, e a capacidade anaeróbia (Kristensen et al., 2019). Acreditamos que esse aumento da PM se deva ao aumento do uso da via anaeróbia láctica, conforme já mencionado. Portanto, a administração crônica de metformina pode ter um efeito maior na produção de lactato e MP.

Em relação à PSE, não encontramos diferenças após o teste anaeróbio de Wingate entre as condições. Alguns estudos relataram maior PSE quando os participantes ingeriram metformina do que placebo (Kristensen et al., 2019; Malin et al., 2010). Essa resposta pode ser devido ao aumento da concentração de adrenalina pela metformina; no entanto, esse resultado é hipotético, pois foi mostrado por apenas um estudo (Kristensen et al., 2019).

A metformina é considerada um medicamento seguro; entretanto, entre seus efeitos colaterais mais relatados estão relacionados ao trato gastrointestinal, como diarreia e náuseas (Asif, Bennett e Marakkath, 2019). No presente estudo, em que a metformina foi administrada em dose única (500 mg) 1 hora antes do exercício, não houve diferença no efeito da ingestão sobre o desconforto gastrointestinal.

Este resultado confirma que há alguma influência da metformina no desempenho de exercícios de curta duração e alta intensidade. Mostramos que a metformina influencia a potência mecânica exercida entre 3 e 9 s do teste de Wingate, a ponto de aumentar o MP do teste. O desempenho em esforços totais com duração de até 10 segundos deve se beneficiar mais da ingestão de metformina, cujo efeito deve diminuir à medida que a duração do sprint aumenta. Estudos futuros devem usar outros métodos para identificar ainda mais a maneira mecanicista como a metformina aumenta a produção de energia anaeróbia em humanos saudáveis.

Vale lembrar que, embora o PP do teste de Wingate seja considerado o padrão ouro para medir a potência anaeróbia, não é o caso para MP e capacidade anaeróbia. Com base na literatura, o presente estudo foi conduzido buscando uma melhora na potência anaeróbia, mas encontrou um efeito na MP e uma tendência de aumento na concentração de lactato sanguíneo de pico. Vale ressaltar que a

ausência de diferença entre os picos de lactato pode ser devido à baixa frequência de coleta. O momento de pico é individual e pode ter sido alterado pelas condições.

Por fim, algumas limitações do presente estudo devem ser consideradas. Embora o teste de Wingate seja o método tradicional usado para estimar a potência e capacidade anaeróbia, sua confiabilidade e validade são criticadas (Bar-Or, 1987; Ozkaya, Colakoglu, Kuzucu, & Yildiztepe, 2012). Para diminuir essa limitação, realizamos um teste-reteste antes das sessões experimentais. Não houve diferenças entre as medidas de teste-reteste para PP, MP e TW, garantindo a confiabilidade do teste. Além disso, todas as variáveis apresentaram TEM baixo e ICC moderado a alto. A segunda limitação foi a determinação da demanda metabólica por meio de variáveis mecânicas (ou seja, PP e MP), que pode ser limitada do ponto de vista metodológico. Por fim, a concentração de glicose no sangue não foi analisada, o que pode influenciar a concentração de lactato no sangue pós-exercício e o efeito ergogênico da metformina. No entanto, a metformina é um medicamento anti-hiperglicêmico e, em indivíduos saudáveis, não causa hipoglicemia (Tokubuchi et al., 2017).

Nossos resultados indicam a viabilidade do uso de metformina para melhorar o desempenho em exercícios curtos e de alta intensidade. Essa estratégia pode ser vantajosa e atrativa em modalidades que tenham predomínio do sistema anaeróbio. No entanto, novos estudos precisam ser realizados utilizando diferentes modalidades esportivas.

Conclusão

A ingestão aguda de metformina aumentou o esforço inicial de força, MP e TW em um teste anaeróbio de Wingate em indivíduos saudáveis fisicamente ativos. Além disso, não houve diferença no pico de lactato e no PSE.

Referência

Asif, S., Bennett, J., & Marakkath, B. (2019). Metformin-associated Lactic Acidosis: An unexpected scenario. *Cureus*, 11 (4), e4397. Published 2019 Apr 5. Baker, J. S., McCormick, M. C., & Robergs, R. A. (2010). Interaction among skeletal muscle metabolic energy systems during intense exercise. *Journal of Nutrition and Metabolism*, 2010, 1–13. doi:10.1155/2010/905612

Bar-Or, O. (1987). The Wingate anaerobic test. An update on methodology, reliability and validity. *Sports Medicine*, 4(6), 381–394. doi:10.2165/00007256-198704060-00001

Bertuzzi, R., Kiss, M. A., Damasceno, M., Oliveira, R. S., & Lima-Silva, A. E. (2015). Association between anaerobic components of the maximal accumulated oxygen deficit and 30-second Wingate test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 48(3), 261–266. doi:10.1590/1414-431X20144043

Bertuzzi, R., Melegati, J., Bueno, S., Ghiarone, T., Pasqua, L. A., Gáspari, A. F.,...Peterson, J. (2016). GEDAE-LaB: A free software to calculate the energy system contributions during exercise. *PLoS One*, 11(1), e0145733. doi:10.1371/journal.pone.0145733. Published 2016 Jan 4.

Bogdanis, G. C., Nevill, M. E., Boobis, L. H., Lakomy, H. K., & Nevill, A. M. (1995). Recovery of power output and muscle metabolites following 30 s of maximal sprint cycling in man. *The Journal of Physiology*, 482((Pt 2)(Pt 2)), 467–480. doi:10.1113/jphysiol.1995.sp020533

Borg, G. A. (1982). Psychophysical bases of perceived exertion. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 14(5), 377–381.

Boulay, M. R., Lortie, G., Simoneau, J. A., Hamel, P., Leblanc, C., & Bouchard, C. (1985). Specificity of aerobic and anaerobic work capacities and powers. *International Journal of Sports Medicine*, 06(6), 325–328. doi:10.1055/s-2008-1025864

Braun, B., Eze, P., Stephens, B. R., Hagobian, T. A., Sharoff, C. G., Chipkin, S. R., & Goldstein, B. (2008). Impact of metformin on peak aerobic capacity. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 33(1), 61–67. doi:10.1139/H07-144

Cameron, A. R., Logie, L., Patel, K., Erhardt, S., Bacon, S., Middleton, P.,...Rena, G. (2018). Metformin selectively targets redox control of complex I energy transduction. *Redox Biology*, 14, 187–197. doi:10.1016/j.redox.2017.08.018

Carling, D. (2004). The AMP-activated protein kinase cascade—a unifying system for energy control. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(1), 18–24. doi:10.1016/j.tibs.2003.11.005

Cheetham, M. E., Boobis, L. H., Brooks, S., & Williams, C. (1986). Human muscle metabolism during sprint running. *Journal of Applied Physiology*, 61(1), 54–60. <https://doi.org/10.1152/jappl.1986.61.1.54>

Cohen, J. (1988). Set correlation and multivariate methods. In *Statistical power analysis for the behavioral sciences* (pp. 467–530). Hillsdale, NJ: Erlbaum.

de Araujo, G. G., Learsi, S., Bastos-Silva, V. J., Ataide, T., & Lima-Silva, A. E. (2020). Chronic metformin intake improves anaerobic but not aerobic capacity in healthy rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 98(1), 23–28. doi:10.1139/cjpp-2019-0459

Demarie, S., Chirico, E., Gianfelici, A., & Vannozzi, G. (2019). Anaerobic capacity assessment in elite swimmers through inertial sensors. *Physiological Measurement*, 40(6), 064003. doi:10.1088/1361-6579/ab205d. PMID: 31071707.

Eriksson, A., Attvall, S., Bonnier, M., Eriksson, J.W., Rosander, B., & Karlsson, F. A. (2007). Short-term effects of metformin in type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 9(4), 483–489. doi:10.1111/j.1463-1326.2006.00624.x. PMID: 17587390.

Gastin, P. B. (1994). Quantification of anaerobic capacity. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 4, 91–112. doi:10.1111/j.1600-0838.1994.tb00411.x

Haseler, L. J., Hogan, M. C., & Richardson, R. S. (1999). Skeletal muscle phosphocreatine recovery in exercise-trained humans is dependent on O₂ availability. *Journal of Applied Physiology*, 86(6), 2013–2018. doi:10.1152/jap.1999.86.6.2013

Hopkins, W. G. (2000). Measures of reliability in sports medicine and science. *Sports Medicine*, 30, 1–15.

Inzucchi, S. E., Bergenstal, R. M., Buse, J. B., Diamant, M., Ferrannini, E., Nauck, M.,...Matthews, D. R. (2015). Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: A patient-centered approach: Update to a position statement of the American Diabetes association and the European association for the study of Diabetes. *Diabetes Care*, 38(1), 140–149. doi:10.2337/dc14-2441

Jackson, A. S., & Pollock, M. L. (1985). Practical assessment of body composition. *The Physician and Sportsmedicine*, 13, 76–90.

Jeukendrup, A. E., Vet-Joop, K., Sturk, A., Stegen, J. H. J. C., Senden, J., Saris, W. H. M., & Wagenmakers, A. J. M. (2000). Relationship between gastro-intestinal complaints and endotoxaemia, cytokine release and the acute-phase reaction during and after a long-distance triathlon in highly trained men. *Clinical Science*, 98(1), 47–55.

Kristensen, J. M., Lillielund, C., Kjøbsted, R., Birk, J. B., Andersen, N. R., Nybo, L.,...Wojtaszewski, J. F. P. (2019). Metformin does not compromise energy status in human skeletal muscle at rest or during acute exercise: A randomised, crossover trial. *Physiological Reports*, 7(23), e14307. doi:10.14814/phy2.14307

Learsi, S. K., Bastos-Silva, V. J., Lima-Silva, A. E., Bertuzzi, R., & De Araujo, G. G. (2015). Metformin improves performance in high-intensity exercise, but not anaerobic capacity in healthy male subjects. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 42(10), 1025–1029. doi:10.1111/1440-1681.12474

Malin, S. K., Stephens, B. R., Sharoff, C. G., Hagobian, T. A., Chipkin, S. R., & Braun, B. (2010). Metformin's effect on exercise and postexercise substrate oxidation. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 20(1), 63–71. doi:10.1123/ijsnem.20.1.63

Marinho, A. H., Mendes, E. V., Vilela, R. A., Bastos-Silva, V. J., Araujo, G. G., & Balikian, P. (2020). Caffeine mouth rinse has no effects on anaerobic energy yield during a Wingate test. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 60(1), 69–74. doi:10.23736/S0022-4707.19.09928-6

Matyukhin, I., Patschan, S., Ritter, O., & Patschan, D. (2020). Etiology and Management of acute metabolic acidosis: Na update. *Kidney and Blood Pressure Research*, 45, 523–531.

Minahan, C., Chia, M., & Inbar, O. (2007). Does power indicate capacity? 30-s Wingate anaerobic test vs. Maximal accumulated O₂ deficit. *International Journal of Sports Medicine*, 28 (10), 836–843. doi:10.1055/s-2007-964976

Ozkaya, O., Colakoglu, M., Kuzucu, E. O., & Yildiztepe, E. (2012). Mechanically braked elliptical Wingate test: Modification considerations, load optimization, and reliability. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 26(5), 1313–1323. doi:10.1519/JSC.0b013e31822e81ab

Patton, J. F., & Duggan, A. (1987). An evaluation of tests of anaerobic power. *Aviation, Space and Environmental Medicine*, 58(3), 237–242.

Pilmark, N. S., Lyngbæk, M., Oberholzer, L., Elkjær, I., Petersen-Bønding, C., Kofoed, K.,...Karstoft, K. (2021). The interaction between metformin and physical activity on postprandial glucose and glucose kinetics: A randomised, clinical trial. *Diabetologia*, 64, 397–409.

Rajasurya, V., Anjum, H., & Surani, S. (2019). Metformin Use and metformin-associated Lactic Acidosis in intensive Care unit patients with diabetes. *Cureus*, 11(5), e4739. Published 2019 May 23. doi:10.7759/cureus.4739.

Scalzo, R. L., Paris, H. L., Binns, S. E., Davis, J. L., Beals, J. W., Melby, C. L.,...Bell, C. (2017). Ergogenic properties of metformin in simulated high altitude. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 44(7), 729–738. doi:10.1111/1440-1681.12761

Siri, W. E. (1961). Body composition from fluids spaces and density: Analyses of methods. In *Techniques for measuring Body Composition*. Washington, DC, USA: National Academy of Science and Natural Resource Council.

Tokubuchi, I., Tajiri, Y., Iwata, S., Hara, K., Wada, N., Hashinaga, T., ...Yamada, K. (2017). Beneficial effects of metformin on energy metabolism and visceral fat volume through a possible mechanism of fatty acid oxidation in human subjects and rats. *PLoS One*, 12(2), e0171293. doi:10.1371/journal.pone.0171293

Vincent, S., Berthon, P., Zouhal, H., et al. (2004). Plasma glucose, insulin and catecholamine responses to aWingate test in physically active women and men. *European Journal of Applied Physiology*, 91(1), 15–21. doi:10.1007/s00421-003-0957-5

Vytla, V. S., & Ochs, R. S. (2013). Metformin increases mitochondrial energy formation in L6 muscle cell cultures. *Journal of Biological Chemistry*, 288(28), 20369–20377. doi:10.1074/jbc.M113.482646

Zagatto, A. M., Redkva, P. E., de Poli, R. A. B., González, J. A. M., Brandani, J. Z., Penedo, T., & Bertuzzi, R. C. D. M. (2019). 3-min all-out effort on cycle ergometer is valid to estimate the anaerobic capacity by measurement of blood lactate and excess post-exercise oxygen consumption. *European Journal of Sport Science*, 19(5), 645–652. doi:10.1080/17461391.2018.1546338

Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J.,... Moller, D. E. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *Journal of Clinical Investigation*, 108(8), 1167–1174. doi:10.1172/JCI13505

Zupan, M. F., Arata, A. W., Dawson, L. H., Wile, A. L., Payn, T. L., & Hannon, M. E. (2009). Wingate anaerobic test peak power and anaerobic capacity classifications for men and women intercollegiate athletes. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 23(9), 2598–2604. doi:10.1519/JSC.0b013e3181b1b21b

3 ARTIGO CIENTÍFICO 2

BASTOS-SILVA, VJ; de ARAUJO, GG. Efeitos da ingestão crônica de metformina no desempenho físico, marcadores fisiológicos e metabólica de ratos saudáveis durante o treinamento intervalado de alta intensidade. Revista Científica para a qual será submetido: Diabetes, Obesity and Metabolism: A Journal of Pharmacology and Therapeutics (Classificação A1, segundo os critérios do sistema *Qualis* da CAPES/Área de Medicina II).

Efeitos da ingestão crônica de metformina no desempenho e em marcadores fisiológicos de ratos saudáveis durante o treinamento intervalado de alta intensidade

Victor José Bastos-Silva¹; Gustavo Gomes de Araujo^{1*}

Autor para correspondência:

* Gustavo Gomes de Araújo

E-mail: gusta_ef@yahoo.com.br

Número de telefone: (55 82) 3214 1873.

¹ Grupo de Pesquisa em Ciência Aplicada ao Esporte. Universidade Federal de Alagoas (IEFE / PPGNUT / PPGCS). Avenida Lourival Melo Mota, s / n, Cidade Universitária, Maceió, Brasil. Código postal: 57072-900;

Título Curto: Ingestão crônica de metformina em ratos saudáveis

RESUMO

Objetivo: Investigar os efeitos da ingestão crônica de metformina no desempenho e em marcadores fisiológicos de ratos saudáveis durante o treinamento intervalado de alta intensidade. **Materiais e Métodos:** Foram utilizados 50 ratos machos da linhagem Wistar, com aproximadamente 50 dias de vida. Inicialmente, após três semanas de adaptação ao meio líquido, 10 ratos foram sacrificados para determinação da linha de base dos biomarcadores. Os outros 40 ratos foram subdivididos em dois grupos experimentais: 1) metformina ou 2) controle. O programa de treinamento teve a duração de oito semanas, com frequência de treinamento de cinco dias/semana e intensidade equivalente a 50% da massa corporal nas primeiras quatro semanas e 70% da massa corporal nas últimas quatro semanas. Com fim de avaliar o desempenho dos animais (número de saltos até exaustão), a terceira sessão de treino de cada semana, a última série foi realizada até a exaustão dos ratos, sempre com carga equivalente a 50% da massa corporal. **Resultados:** Com relação ao número de saltos, não observamos diferenças entre os grupos metformina e controle. No que tange o aumento da massa corporal quando analisamos apenas as quatro primeiras semanas do estudo ($n = 40$) foi significativamente reduzido pela ingestão de metformina ($p < 0,001$). Porém, quando analisamos as oito semanas completas ($n = 20$), não houve diferença entre grupos, permanecendo apenas a diferença em relação ao tempo de treinamento ($p < 0,001$). O glicogênio hepático e do músculo sóleo não foram alterados pela ingestão de metformina. Já o conteúdo de glicogênio do músculo gastrocnêmio foi menor ao final da oitava semana no grupo metformina quando comparado ao grupo controle ($p = 0,01$). No grupo metformina, identificamos níveis mais baixos de piruvato e fenilalanina e níveis mais elevados de etanol, formato e betaína quando comparado com o placebo. **Conclusão:** Sendo assim, o uso crônico da metformina além de não melhorar o número de saltos e a síntese de glicogênio hepático, influencia negativamente a síntese de glicogênio muscular quando comparado à situação controle em animais saudáveis.

Palavras-chave: biguanida, exercício físico, desempenho físico, saúde

INTRODUÇÃO

A metformina, um agente anti hiperglicêmico oral, é o medicamento mais amplamente utilizado no tratamento da diabetes tipo 2 (DAVIES et al., 2018). Esse uso é baseado na eficácia, segurança, tolerabilidade e baixo custo (DAVIES et al., 2018). O uso da metformina é associado à ativação da AMPK, este efeito é atribuído à inibição do complexo 1 da cadeia respiratória mitocondrial pela droga, que causa uma carga de energia celular alterada caracterizada por um declínio nos níveis de ATP intracelular concomitantemente com um aumento nos níveis intracelulares de ADP e AMP (HARDIE, 2014). A ativação da AMPK é relacionada a translocação do GLUT4 (LEE e colaboradores, 2012). Sendo assim, a metformina tende a aumentar a captação periférica de glicose (KLIP et al., 1992; KRISTENSEN et al., 2013), tendo em vista que a captação de glicose requer translocação da proteína GLUT4 dos locais de armazenamento intracelular para a superfície celular.

Recentemente, Scalzo e colaboradores (2017), demonstraram que a ingestão da metformina também é capaz de promover a síntese de glicogênio no músculo esquelético de homens saudáveis. Além disso, a diminuição da respiração mitocondrial aumenta a capacidade da célula em formar fosfocreatina. Assim, a recuperação de fosfocreatina reflete um aumento constante nos níveis de fosfocreatina à medida que mais ATP é restaurado nas células (VYTILA e OCHS, 2013).

Baseado nos resultados supracitados, o uso da metformina levaria a um aumento da necessidade da utilização do sistema anaeróbio para manter o funcionamento celular. Por exemplo, Braun et al. (2008) realizaram um teste incremental máximo em esteira e verificaram uma redução significativa na potência aeróbia máxima (VO_2 máx) quando indivíduos saudáveis ingeriram (8-9 dias) uma dose clínica típica de metformina (500-1000 mg, duas vezes ao dia). Um dado crucial relatado por Braun et al. (2008) é que não houve diferença entre as condições na carga final de trabalho alcançada, o que nos leva a hipotetizar que o metabolismo anaeróbio foi decisivo para a manutenção da carga de trabalho. A principal explicação é que a metformina pode prejudicar exercícios que exijam uma maior contribuição aeróbia por diminuir a respiração mitocondrial (CARVALHO et al., 2008). Por outro lado, ela poderia potencializar exercícios que exijam maior contribuição anaeróbia.

Destarte, quando a metformina é utilizada em exercícios de alta intensidade, ela tem sido relacionada com a melhoria do desempenho físico. Learsi et al. (2015) verificaram que a ingestão de metformina (500 mg) 60 minutos antes do teste experimental melhorou o desempenho em um exercício em ciclo ergômetro em uma intensidade de 110% do $\text{VO}_2\text{máx}$ em indivíduos saudáveis. Os autores observaram que o tempo até a exaustão foi significativamente maior após a ingestão de metformina em relação ao placebo, atribuindo essa melhoria a um aumento da contribuição anaeróbia alática, tendo em vista que os autores encontraram valores maiores do componente rápido do consumo excessivo de oxigênio pós-exercício (EPOC rápido) e não verificaram diferença no pico de lactato (contribuição láctica).

Outrossim, de Araujo et al. (2019), utilizando o método de potência crítica para natação em ratos saudáveis, encontraram melhoria no tempo até a exaustão e na capacidade de trabalho anaeróbia após a ingestão da metformina (250 mg, durante 10 dias), mas não houve diferença da capacidade aeróbia. Esses dados corroboram com a ideia da metformina agir positivamente no metabolismo anaeróbio, porém ainda não está claro sua contribuição para os sistemas alático e/ou láctico. Mais recentemente, Bastos-Silva et al. (2021) demonstraram que a ingestão (500 mg) aguda (1h antes) de metformina aumentou o esforço inicial de força, a potência média e o total de trabalho em um teste anaeróbio de Wingate em indivíduos saudáveis.

Até o presente momento, a ação ergogênica da metformina tem sido avaliada em exercícios agudos, com uma administração da droga por no máximo 10 dias e inexistência do mecanismo de ação principalmente sobre o metabolismo anaeróbio glicolítico. Logo, investigar o uso a longo prazo da metformina e sua associação ao exercício crônico de alta intensidade poderia potencializar os efeitos sobre o sistema energético anaeróbio, tornando-se uma estratégia inovadora para o treinamento de alta intensidade.

Um método de treino amplamente empregado nos dias de hoje, que pode ter predominância anaeróbia, é o treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT), podendo ser definido como sessões repetidas de exercícios de curta a moderada duração realizada com uma intensidade maior que o limiar anaeróbio (LAURSEN e JENKINS, 2002). Sendo o intuito do HIIT estressar repetitivamente os sistemas fisiológicos (LAURSEN e JENKINS, 2002). As respostas moleculares agudas a uma sessão de HIIT estão intimamente associadas à fosforilação da AMPK. A AMPK,

primariamente ativada pelo aumento da razão AMP/ATP, promove maior translocação de GLUT 4 para a membrana celular, estimulando a via glicolítica e a entrada de glicose para o citoplasma respectivamente (CARLING, 2004), além de contribuir para o aumento da expressão do gene associado ao GLUT 4 (CANTÓ et al., 2009). O HIIT também induz a uma melhoria no desempenho em exercício anaeróbio e na capacidade glicolítica estimada em todo o músculo (SCRIBBANS et al., 2014). Adicionalmente, já foi demonstrado que o HIIT aumenta os níveis da proteína fator-1 α induzível por hipóxia, acompanhado por um aumento simultâneo na expressão do gene de enzimas glicolíticas e de glicogênese (ABE et al., 2015).

Dessa forma, nosso objetivo foi identificar os efeitos da ingestão crônica de metformina combinado ao HIIT sobre o conteúdo proteico de GLUT4, glicogênio muscular e hepático, desempenho físico e marcadores fisiológicos de ratos saudáveis da linhagem wistar. Nossa hipótese é que a administração crônica de metformina associada ao HIIT irá melhorar o desempenho físico devido a uma maior utilização da via anaeróbia láctica por meio do aumento do conteúdo proteico de GLUT4 e síntese de glicogênio muscular.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra

Foram utilizados 50 ratos machos da linhagem *Rattus norvegicus albinus* (Wistar) com 50 dias de vida. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas (5 ratos/gaiola, 350 cm²/animal, 18 cm de altura), em uma sala com ciclo claro-escuro de 12-12 horas (18:00-06:00 luzes acendem), temperatura de 22 \pm 2°C, com dieta normal (ração comercial Nuvilab) e com alimento e água *ad libitum*. Todos os procedimentos deste estudo seguiram os princípios éticos da experimentação animal (Publicação do NIH No. 86-23, revisada em 1985) e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (74/2017).

Inicialmente, todos os animais realizaram uma adaptação ao meio aquático durante três semanas. Posteriormente, os animais foram separados de forma randômica em dois grupos: metformina (n=20) e controle (n=20). Ao final (72 horas após) da adaptação (n = 10), primeiras quatro semanas (metformina: n = 10 e controle: n = 10) e quatro últimas semanas (metformina: n = 10 e controle: n = 10), os animais foram eutanasiados.

Adaptação ao meio aquático

A finalidade da adaptação ao meio aquático foi reduzir o estresse hídrico sem promover adaptações fisiológicas ao treinamento físico. O protocolo utilizado foi adaptado de de Araujo et al. (2016) e consistiu em uma exposição de cinco dias/semana durante três semanas em cilíndricos de 30 cm de diâmetro x 60 cm de profundidade e temperatura da água mantida em $31 \pm 1^\circ\text{C}$. Na primeira semana, os ratos, individualmente, foram colocados na água com profundidade de 20 cm durante 5 min, na segunda semana a profundidade foi aumentada para 30 cm e os ratos realizaram uma série de 10 saltos com carga de 30% da massa corporal no dorso, e, por fim, na terceira semana, a profundidade de 30 cm foi mantida e os ratos nadaram por 5 min, sem carga, evitando, assim, efeito de treinamento.

Protocolo de treinamento

O protocolo de HIIT escolhido foi adaptado do estudo de de Araujo et al. (2016), tendo em vista que os autores demonstraram sua eficiência em melhorar o desempenho anaeróbio.

Teve duração de oito semanas, com sessões de exercício de cinco dias/semana. A carga de treinamento nas quatro primeiras semanas foi equivalente a 50% da massa corporal e nas quatro últimas semanas foi equivalente a 70% da massa corporal, calculado a cada semana individualmente. A sessão de treinamento foi composta por 4 séries de 10 saltos em água (profundidade 30cm) com 30s de recuperação passiva.

Administração da metformina

O grupo metformina recebeu uma dose duas vezes maior que a utilizada em de Araujo et al. (2019) (500 mg diluído em 1mL de água destilada) administrada por gavagem, uma hora antes do exercício físico. Os animais do grupo controle receberam uma solução de 1mL de água destilada administrada por gavagem, também uma hora antes do exercício físico.

Protocolo de Desempenho

O desempenho dos animais foi avaliado pelo número máximo de saltos até exaustão. A avaliação do desempenho foi realizada apenas na terceira sessão de

treino de cada semana para evitar levar os animais à exaustão mais de uma vez por semana. Os saltos até a exaustão foram realizados na última série do dia e a exaustão foi determinada quando os ratos saltaram por três vezes consecutivas sem atingir a superfície. Independente da semana, a carga da sessão até exaustão foi mantida a 50% da massa corporal.

Antes da gavagem e após a exaustão, amostras de sangue (25 μ L) foram coletadas da cauda dos animais na quarta e oitava semana para a determinação da concentração de lactato (Kit Labtest®, Brazil).

Controle da ingestão alimentar e hídrica

A quantidade de ração e água ingerida por gaiola foram mensuradas toda segunda, quarta e sexta antes do protocolo de treinamento ou eutanásia e agrupados por consumo semanal de cada grupo: 1) metformina ou 2) controle.

Análise dos Tecidos

Os tecidos (sóleo, gastrocnêmio e fígado) foram coletados após 72h do final da adaptação à água (linha de base) e da última sessão nas semanas 4 e 8 do período experimental.

Os animais foram eutanasiados com cloridrato a 20% (0,3 mL/100g⁻¹ peso de animal) para excisão de tecido. A concentração de glicogênio das amostras de tecido foi imediatamente analisada de acordo com os métodos de Dubois et al. (1956). Amostras musculares (200-250mg) e fígado (500mg) foram imediatamente digeridas em 0,5 mL de KOH 1N (30%) por 20min e 1,0 mL, respectivamente. O método de ensaio colorimétrico foi realizado utilizando fenol (80%) e ácido sulfúrico. Após 15 min de fervura, a absorbância foi determinada a 490 nm.

Coloração de imunoperoxidase para GLUT-4

As preparações histológicas foram desparafinizadas por meio de duas lavagens de xilol e, imediatamente, foi realizada hidratação com lavagens sucessivas de etanol em concentrações decrescentes de 100%, 95%, 70%, seguidas de uma lavagem com água destilada e duas com PBS. Em seguida, a imunohistoquímica foi realizada usando o kit EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP / DAB Detection IHC (Abcam, Cambridge, Reino Unido) e o anticorpo primário anti-GLUT-4 (Abcam), ambos de acordo com as instruções do fabricante. As

lâminas foram contrastadas com Hematoxilina de Mayer e diferenciadas em água corrente por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram desidratadas em lavagens com concentrações crescentes de etanol 70%, 95% e 100%, clareadas com xilol e montadas sob lamínula em Entellan (Sigma-Aldrich, Alemanha).

Documentação fotográfica e quantificação

A microscopia foi realizada com Nikon DS-Ri1 (Tóquio, Japão) e as imagens analisadas com o software DP2-BSW (Nikon). A quantificação dos ensaios de imunohistoquímica foi realizada por meio de 3 imagens (aumento 200 x) de campos aleatórios de cada amostra individual. As imagens foram submetidas ao plug-in de análise de quantificação IHC Profiler do software de domínio público Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), exatamente como descrito anteriormente.

Análise Metabolômica

As amostras de sangue foram coletadas durante as eutanásias por punção cardíaca, posteriormente as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm (Hettich Zentrifugen, ROTANTA 460R) por 10 min; assim, o sobrenadante foi transferido e armazenado em um freezer -80° para posterior análise. As comparações foram feitas entre o grupo linha de base e o grupo eutanasiado no final do segundo mês de treinamento, tanto placebo quanto metformina.

Os experimentos de RMN foram conduzidos em um espectrômetro BRUKER 600 MHz (AVANCE III) equipado com uma sonda de 5 mm a 300 K (PABBO). Todos os espectros de ¹H-NMR foram registrados utilizando a sequência de pulso *cpmgpr1d* com supressão da ressonância de água por pré-saturação. Para todas as amostras foram coletados os seguintes parâmetros, 128 transientes em 64 K pontos de dados em um ângulo de pulso de 90 °, relaxamento de 4,00 s, tempo de mistura de 0,09 s e tempo de aquisição de 2,72 s. Todos os espectros foram pré-processados no software TopSpin® 3.2, além de serem ajustados correção de fase e desvios químicos (δ) tendo como referência o sinal TSP (0,00 ppm) e exibidos no formato ppm. A matriz de dados foi preparada no software MatLab® (MathWorks, versão 13), onde os dados foram sobrepostos, alinhados, cortados e normalizados. Em seguida, todos os dados foram transferidos para o Excel®, formando uma matriz de dados com cerca de 24.000 variáveis. A identificação dos picos do

metabólito ocorreu por meio do Chenomx® e foi confirmada com o Human Metabolome Database (www.hmdb.ca).

Análise estatística

Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão (DP). A normalidade dos dados foi verificada utilizando o teste de Shapiro-Wilk. A análise de variância (ANOVA) de dois caminhos foi utilizada para examinar as alterações ao longo do tempo no desempenho, na massa corporal e para as análises de glicogênio e lactato. Quando um efeito de interação significativo foi encontrado, um teste post-hoc de Bonferroni foi usado para identificar a diferença. O nível de significância foi estabelecido a priori $\alpha \leq 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando um pacote de software estatístico Statistica (versão 7.0, Tulsa, OK).

RESULTADOS

A ingestão de metformina causou uma redução de aproximadamente 19,62% na ingestão de alimentos no primeiro mês (Tabela 1 A e Tabela 1 B), entretanto, não houve diferença percentual na ingestão alimentar no segundo mês (Tabela 2 A e Tabela 2 B) quando comparado ao controle. Já no consumo de água, a ingestão de metformina causou um aumento de aproximadamente 11% no primeiro mês (Tabela 1 A e Tabela 1 B) e de aproximadamente 17,90% no segundo mês (Tabela 2 A e Tabela 2 B) quando comparado ao controle.

Tabela 01. Ingestão de ração e água durante o primeiro mês nos grupos metformina (A) e controle (B).

A

	Semana 01	Semana 02	Semana 03	Semana 04
	Metformina	Metformina	Metformina	Metformina
Ração (g)	539,92 \pm 25,23	558,42 \pm 37,31	543,25 \pm 44,24	557,02 \pm 70,11
Água (mL)	1010,00 \pm 61,50	1172,50 \pm 142,37	1093,50 \pm 183,58	1126,75 \pm 114,33

B

	Semana 01	Semana 02	Semana 03	Semana 04
	Controle	Controle	Controle	Controle
Ração (g)	700,72 ± 53,54	709,20 ± 25,31	656,32 ± 21,83	665,75 ± 19,48
Água (mL)	1023,25 ± 70,56	1055,00 ± 121,90	940,25 ± 68,28	900,00 ± 57,79

Nota: n = 4 gaiolas por condição

Tabela 02. Ingestão de ração e água durante o segundo mês nos grupos metformina (A) e controle (B).

A

	Semana 05	Semana 06	Semana 07	Semana 08
	Metformina	Metformina	Metformina	Metformina
Ração (g)	737,75 ± 2,33	736,30 ± 40,44	680,80 ± 92,63	649,80 ± 133,78
Água (mL)	1285,50 ± 116,67	1229,00 ± 120,20	1150,00 ± 272,94	1094,50 ± 217,08

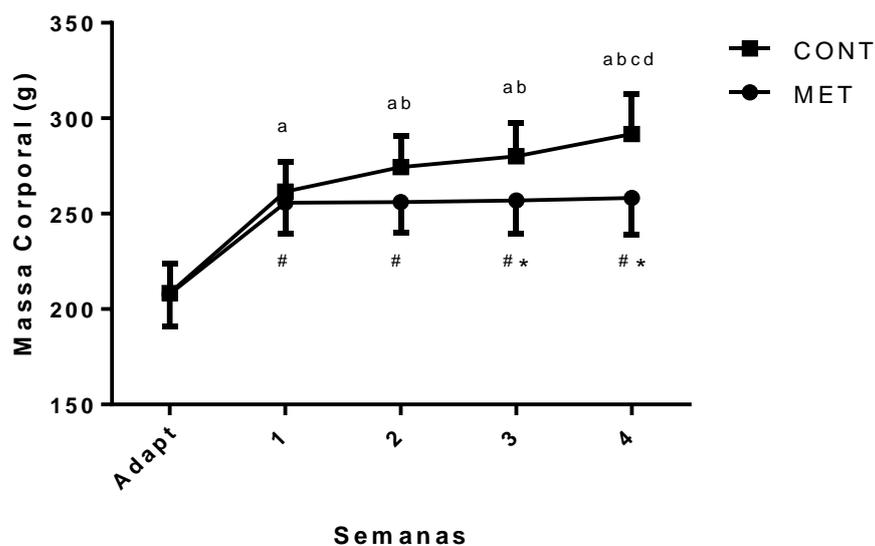
B

	Semana 05	Semana 06	Semana 07	Semana 08
	Controle	Controle	Controle	Controle
Ração (g)	712,75 ± 13,64	696,00 ± 1,13	692,35 ± 10,53	699,25 ± 16,89
Água (mL)	988,00 ± 98,99	1034,50 ± 60,10	892,50 ± 0,71	993,50 ± 111,01

Nota: n = 2 gaiolas por condição

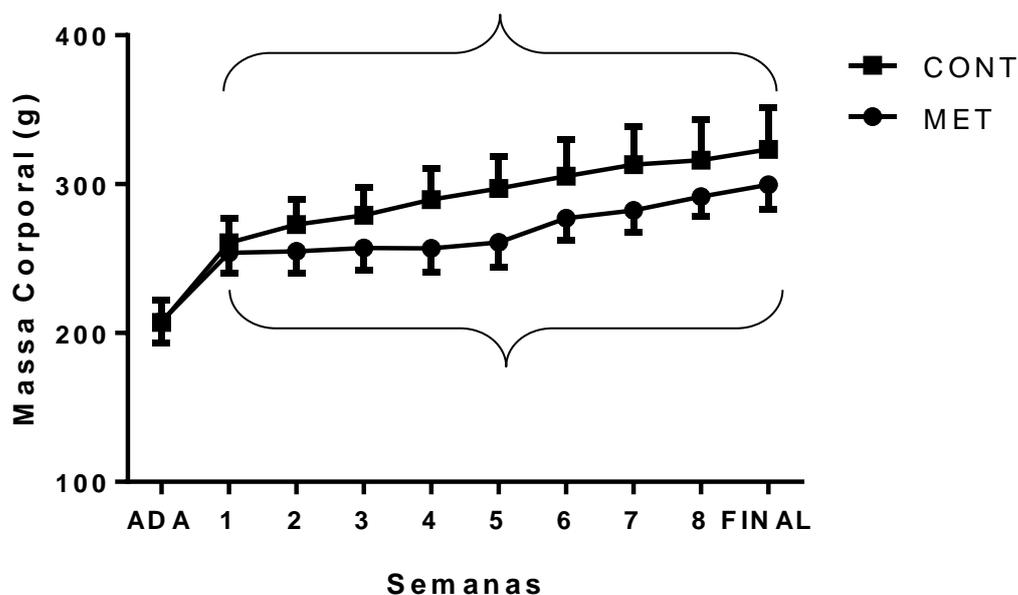
O aumento do peso corporal quando analisamos apenas as 4 primeiras semanas do estudo (n = 40) foi significativamente reduzido pela ingestão de metformina (F = 29,5; p < 0,001; Figura 1). Todavia, quando analisamos as 8 semanas completas (n = 20), a diferença entre grupos desaparece, permanecendo apenas a diferença do tempo de treinamento (F = 10,9; p < 0,001; Figura 2).

Figura 01. Massa corporal no primeiro mês.



Nota: n = 40. Adapt = adaptação. MET = metformina. CONT = controle. * = diferença significativa entre as condições na respectiva semana. # = diferença significativa para a semana adaptação na condição MET. a = diferença significativa para a semana adaptação na condição CONT. b = diferença significativa para a semana 1 na condição CONT. c = diferença significativa para a semana 2 na condição CONT. d = diferença significativa para a semana 3 na condição CONT.

Figura 02. Massa corporal no segundo mês.

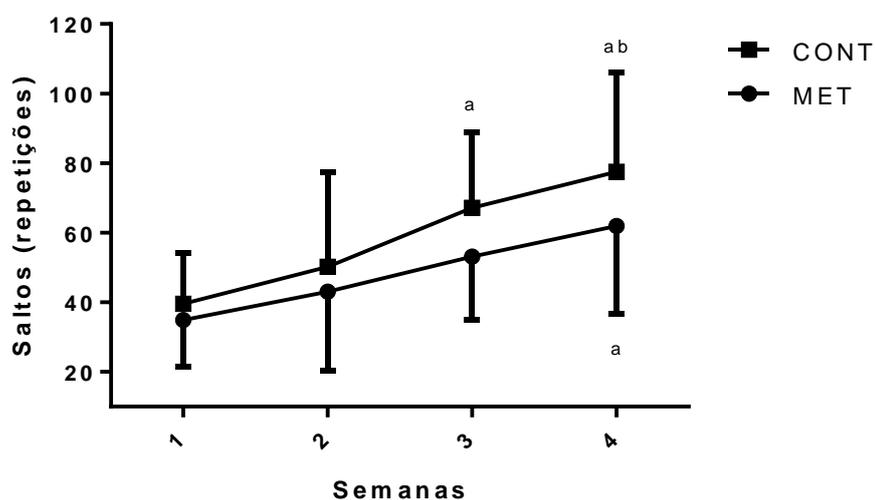


Nota: n = 20. ADA = adaptação. MET = metformina. CONT = controle. Houve diferença do tempo em ambos os grupos nas respectivas semanas.

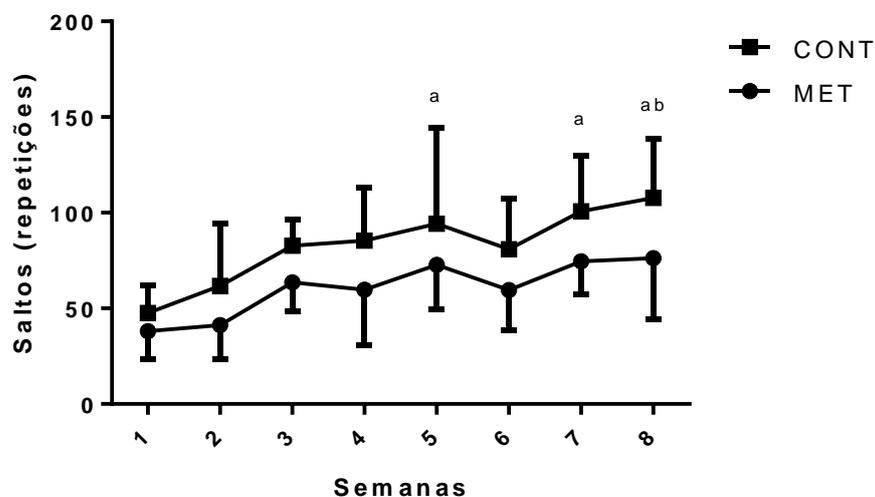
Com relação ao desempenho, não observamos diferenças entre os grupos metformina e controle (Figura 2 A e B). Contudo, a ingestão de metformina parece influenciar negativamente os efeitos do treino, fato evidenciado pela diferença de tempo de treinamento já encontrada na terceira semana em comparação com a primeira no grupo controle e no grupo metformina apenas na quarta semana quando analisamos apenas as quatro primeiras semanas ($F = 5,60$; $p = 0,02$; Figura 2A). Quando analisamos todas as oito semanas, existe efeito do treinamento apenas no grupo controle ($F = 11,06$; $p < 0,001$; Figura 2B)

Figura 03. Desempenho no primeiro (A) e segundo (B) mês.

A



B



Nota: (A) $n = 40$ e (B) $n = 20$. a = diferença significativa para a semana 1. b = diferença significativa para a semana 2.

O conteúdo de glicogênio hepático não foi alterado pela ingestão de metformina, bem como o glicogênio do músculo sóleo. Em contrapartida, o conteúdo de glicogênio do músculo gastrocnêmio foi menor na condição metformina quando comparado ao grupo controle ($F = 4,60$; $p = 0,01$; Tabela 3).

Tabela 03. Conteúdo de glicogênio muscular e hepático.

	Baseline	Mês 01	Mês 02
Fígado Metformina (mg/100mg)	1,865 ± 1,030	2,244 ± 0,995	2,733 ± 0,136
Fígado Controle (mg/100mg)	1,865 ± 1,030	2,259 ± 1,011	2,761 ± 0,172
Gastrocnêmio Metformina (mg/100mg)	0,449 ± 0,262	0,315 ± 0,170	0,561 ± 0,346
Gastrocnêmio Controle (mg/100mg)	0,449 ± 0,262	0,272 ± 0,180	1,018 ± 0,175 ^{ab*}
Sóleo Metformina (mg/100mg)	0,421 ± 0,143	0,268 ± 0,159	0,577 ± 0,222 ^a
Sóleo Controle (mg/100mg)	0,421 ± 0,143	0,328 ± 0,239	0,546 ± 0,103

Nota: Baseline – n = 10, Mês 01 – n = 20, Mês 02 – n = 20. a = diferença para o primeiro mês. b = diferença para o baseline. * = diferença entre grupos no mesmo mês.

Não houve diferenças na concentração de lactato em repouso e após exaustão, bem como no delta tanto no primeiro quanto no segundo mês (Tabela 4).

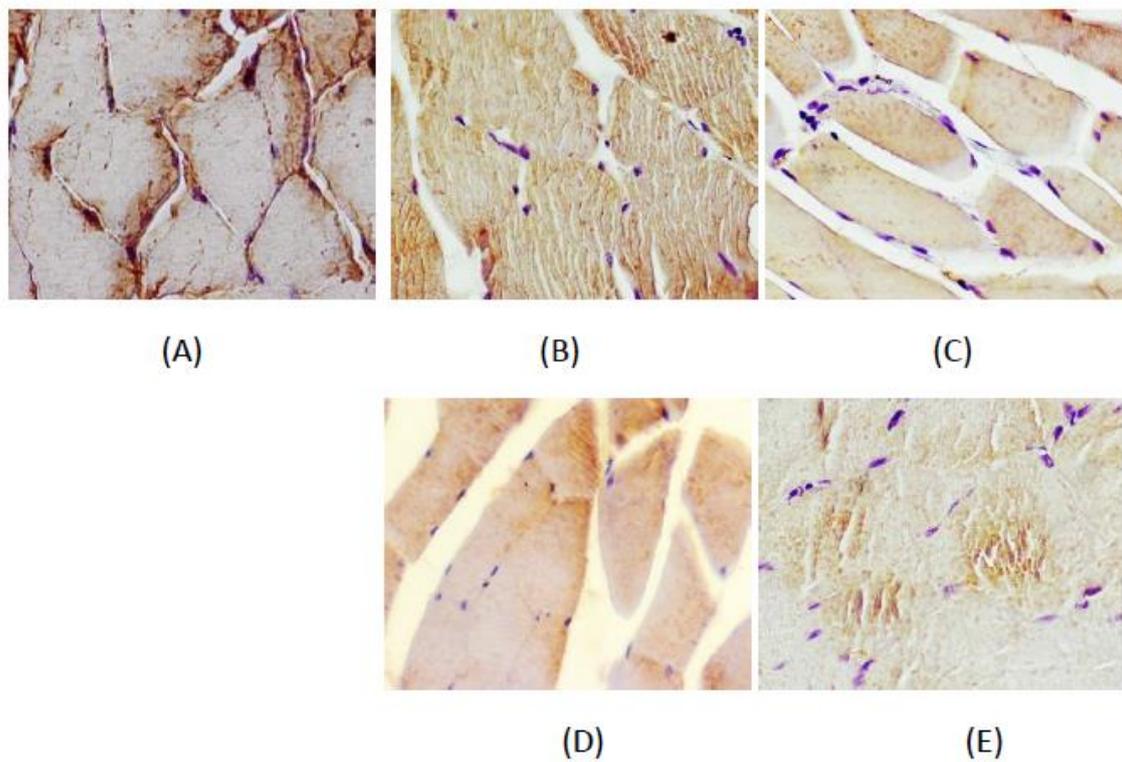
Tabela 04. Concentração de lactato.

	Primeiro Mês		Segundo Mês	
	Controle	Metformina	Controle	Metformina
Repouso (mM)	1,51 ± 0,85	3,44 ± 1,09	3,64 ± 1,37	5,94 ± 2,01
Exaustão (mM)	13,72 ± 5,83	20,88 ± 6,92	15,99 ± 4,66	18,85 ± 7,05
Delta (mM)	12,20 ± 6,13	17,44 ± 7,17	12,34 ± 4,84	12,91 ± 5,54

Nota: Delta = Repouso – Exaustão.

A única diferença encontrada na quantidade de GLUT4 foi no músculo gastrocnêmio, a qual foi menor no grupo metformina no primeiro mês em comparação aos demais grupos (Figura 4).

Figura 04. Imagens mostrando histologia de seções do músculo gastrocnêmio coradas com hematoxilina.



Nota. Barra de escala: 200 μm . (A) linha de base (B) metformina primeiro mês (C) metformina segundo mês (D) placebo primeiro mês (E) placebo segundo mês.

Os resultados da metabolômica são apresentados na figura 5 e 6.

Figura 5. Gráfico de pontuação PLS-DA para amostras de plasma.

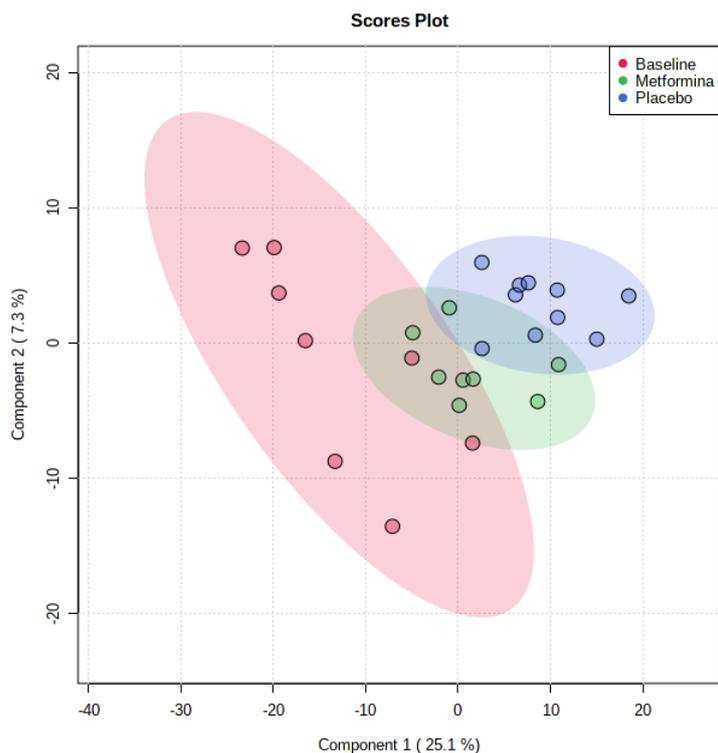
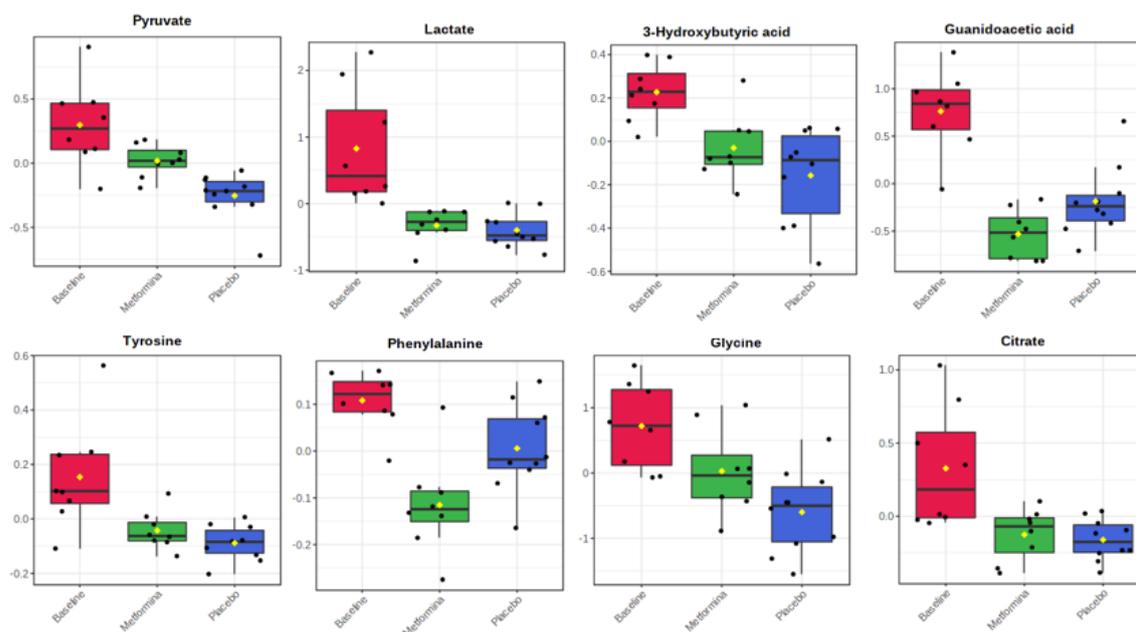


Figura 6. Apresentação gráfica do impacto da metformina e do treinamento em metabólitos significativos identificados no plasma. Os dados são apresentados como boxplots com mediana, intervalo interquartil e média. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA OneWay e, posteriormente, o post-hoc de Tukey ($p < 0,05$).



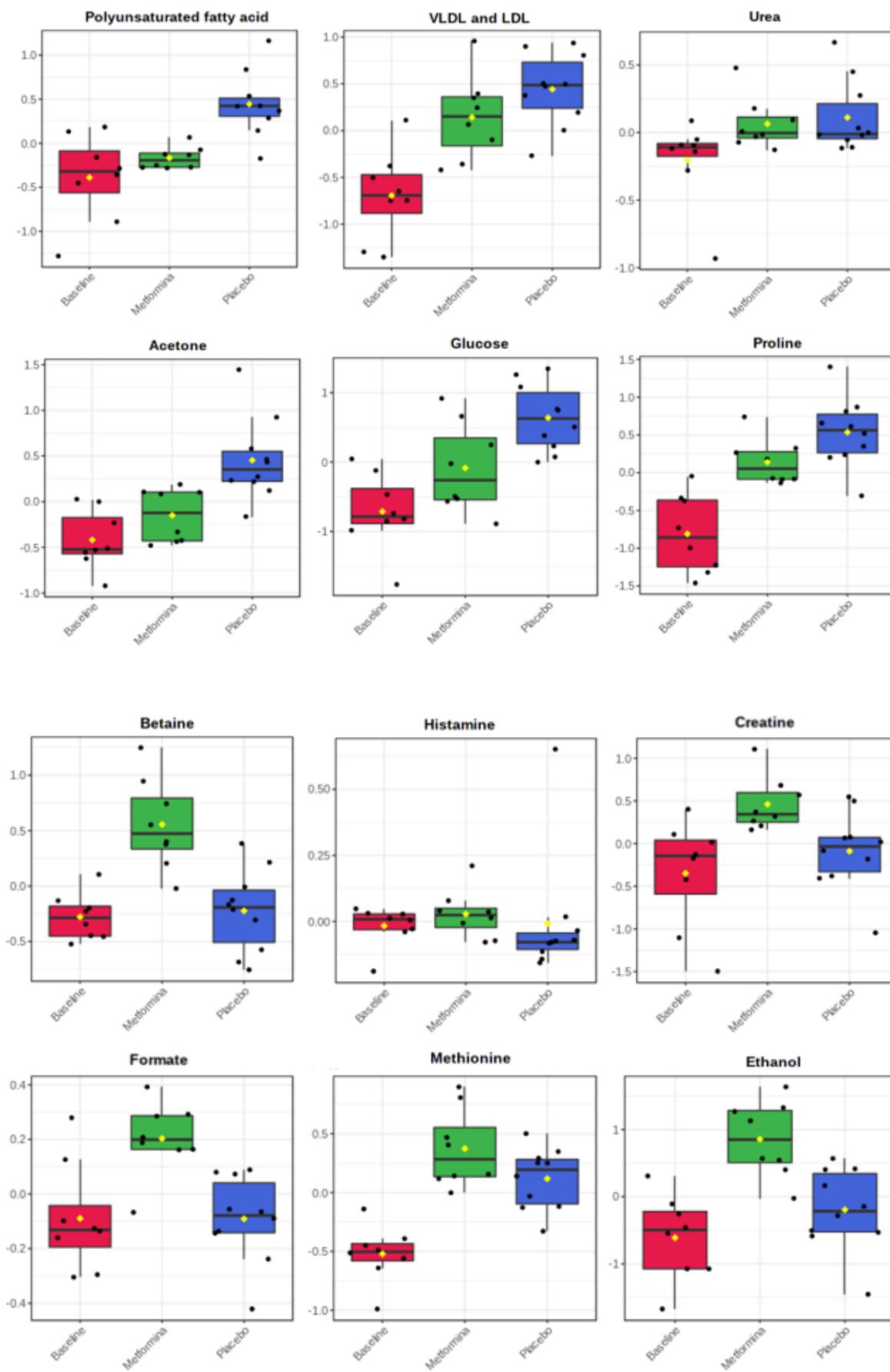
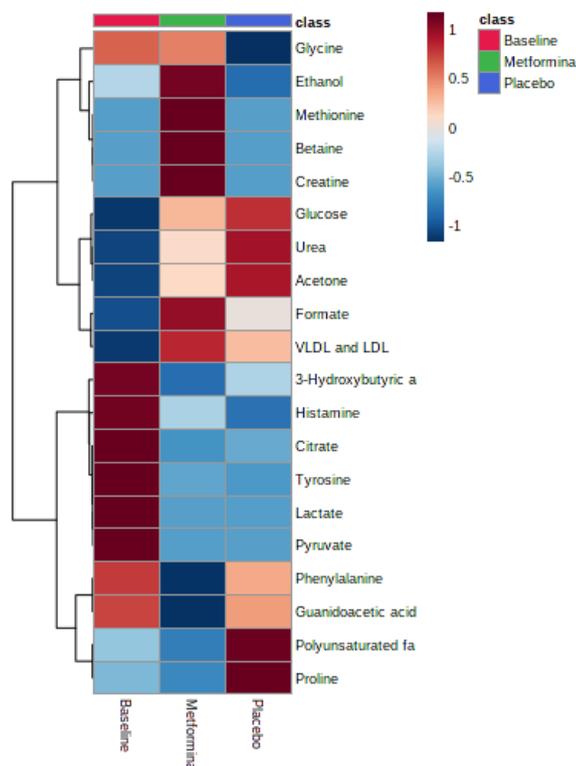


Figura 7. Mapa de calor dos principais metabólitos alterados pelo tratamento com metformina.



DISCUSSÃO

Esse estudo foi o primeiro a investigar os efeitos da administração crônica de metformina associada ao HIIT em ratos saudáveis. Diferente da nossa hipótese, o uso crônico da metformina não aumentou a concentração de glicogênio muscular, GLUT4 e não melhorou o desempenho físico.

Como já demonstrados em indivíduos diabéticos (BORST e SNELLEN, 2001), em nosso trabalho o uso crônico da metformina retardou o aumento da massa corporal. Em meta-análise realizada por Sadeghi et al. (2000) envolvendo jovens obesos ou com sobrepeso sem outras comorbidades que tomaram doses de metformina variando de 1.500 a 3.000 mg houve uma redução do peso corporal e da gordura corporal. Um dos fatores que podem ter influenciado foi a menor ingestão alimentar do grupo metformina, como também já demonstrado (BORST e SNELLEN, 2001). O consumo de metformina pode reduzir o apetite, agindo no sistema nervoso central. A metformina ainda atenua a atividade da proteína quinase AMP hipotalâmica ativada, o que, subsequentemente, reduz o neuropeptídeo Y (orexigênico) e aumenta a expressão da pró-opiomelanocortina (anorexigênico). A

terapia com metformina também melhora a sensibilidade à leptina e à insulina e, por meio disso, pode afetar a ingestão alimentar (SADEGHI et al., 2000).

Esse retardo no aumento da massa corporal, ou seja, o grupo metformina teve uma massa corporal menor no primeiro mês quando comparado com o grupo placebo, provavelmente ocasionou prejuízos no desenvolvimento celular dos animais. Nesse sentido, diferindo de nossa hipótese, identificamos uma menor concentração de GLUT4 no grupo metformina no primeiro mês quando comparado aos demais grupos. O uso de metformina tende a não alterar a expressão de GLUT4 ou GLUT1 (Thomas et al., 1998), concomitantemente sua concentração. Com o aumento da massa corporal do grupo metformina no segundo mês, percebemos também uma equiparação no conteúdo de GLUT4 nesse grupo.

Conseqüentemente, a menor massa corporal e concentração de GLUT4 encontradas no primeiro mês do grupo metformina conduziram, ao fim dos dois meses de treinamento, o grupo metformina a apresentar um estoque de glicogênio muscular menor quando comparado ao grupo controle. Além disso, o aumento induzido pela metformina nos níveis de AMP intracelular por meio do estado de energia hepática comprometido também pode ter um papel importante no controle do fluxo da gliconeogênese por meio de uma inibição alostérica da frutose 1,6-bisfosfatase, que é uma enzima chave em gliconeogênese (FORETZ et al., 2010). Aparentemente assim inibindo a síntese de glicogênio (OUYANG, PARAKHIA e OCHS, 2011).

Estudos metabólicos demonstraram que, além de promover o consumo de glicose e a produção de lactato, a metformina acaba diminuindo os intermediários glicolíticos específicos, bem como os níveis de quase todos os intermediários no ciclo do ácido tricarboxílico (JANZER et al., 2014). Assim, as biguanidas podem diminuir a entrada no ciclo do ácido tricarboxílico, inibindo os precursores gerados pelo metabolismo do carbono ou do nitrogênio (piruvato e glutamato, respectivamente) e, portanto, reduzir a produção de ATP e metabólitos anabólicos necessários para o crescimento celular que são derivados do ciclo do ácido tricarboxílico (JANZER et al., 2014).

A metformina é capaz de reduzir significativamente as concentrações dos intermediários fumarato, malato, citrato e alfa cetoglutarato, por exemplo (ZAKIKHANI et al., 2012). Semelhante em nosso estudo, identificamos níveis mais baixos de piruvato no grupo metformina. Na ausência de um ciclo do ácido

tricarboxílico funcional, redutores metabólicos equivalentes são parcialmente oxidados, predominantemente D-lactato, succinato, formato, etanol e acetato. Enquanto a excreção de acetato gera energia na forma de ATP, a excreção desses outros intermediários metabólicos sacrifica energia para consumir equivalentes redutores. Em nosso estudo, o uso da metformina aumentou a quantidade de etanol e formato.

Outro metabólito encontrado, a betaína, é conhecido por diminuir os níveis de homocisteína no sangue como antioxidante. Dado que o tratamento com metformina eleva os níveis de homocisteína (CHO et al., 2015), mesmo sob condições de tratamento de curto prazo, inferimos níveis elevados de betaína. A fenilalanina, que é associada a eventos cardiovasculares futuros, foi menor no grupo metformina comparado ao placebo. Semelhante, Preiss et al. (2016) investigaram o uso de metformina (1700 mg por dia, 850 mg por dia) ou placebo (n = 87) por 18 meses em 173 indivíduos sem diabetes tipo 2, mas com doença cardíaca coronária estabelecida e com circunferências da cintura elevadas. Comparado com o placebo, a fenilalanina caiu 2,0 $\mu\text{mol} / \text{l}$ (4%).

Em relação a concentração de lactato, não houve diferença do grupo metformina em relação ao grupo controle, mas o grupo metformina apresentou valores brutos de lactato maiores tanto em repouso quanto pós exercício, sendo a acidose láctica associada à metformina caracterizada como o nível de lactato no sangue arterial em repouso superior a 5 mM (LALAU, 2010), em nosso estudo a média do lactato de repouso no grupo metformina na oitava semana foi de 5,94 mM e no grupo controle de 3,64 mM, o que pode ter influenciado negativamente o desempenho dos ratos desse grupo. Esse aumento dos níveis de lactato é associado também a inibição da remoção de lactato no fígado e nos músculos no nível do complexo da cadeia respiratória mitocondrial, onde o lactato é metabolizado (ASIF, BENNETT e MARAKKATH, 2019). Alguns estudos também relatam que o uso de metformina pode acarretar efeitos colaterais gastrointestinais como flatulência, desconforto abdominal e indigestão de leves a moderados durante a intervenção (JOHNSON et al., 2008), o que cronicamente pode induzir a danos mais sérios.

Por fim, o uso crônico da metformina não melhorou o desempenho físico e retardou a melhoria proveniente do tempo de treinamento físico. Learsi et al. (2015), de Araujo et al. (2019) e Bastos-Silva et al. (2021) foram os primeiros a demonstrar

que a metformina poderia exercer um efeito ergogênico. Esses estudos mostraram que tanto o uso agudo como prolongado da metformina favoreceu o metabolismo anaeróbio, melhorando, assim, o desempenho, algo que nosso estudo não demonstrou. Um dos fatores pode ter sido a intensidade utilizada, a qual mesmo sendo considerada alta para ratos, teve uma média alta de saltos resultando em provavelmente uma alta contribuição do metabolismo aeróbio. Em indivíduos não saudáveis, a literatura atual demonstra que as estratégias isoladas de exercício aeróbio e metformina são melhores quando comparadas a combinação de ambos (SHAROFF et al., 2010; MALIN et al., 2012; RYNDERS et al., 2012; MYETTE-CÔTÉ et al., 2015). O crédito para essa preconização foi postulado em cima da ideia de que a metformina seria uma inibidora do complexo I, prejudicando assim a respiração mitocondrial e concomitantemente os benefícios do exercício.

Outro fator que pode ter influenciado a não melhoria do desempenho físico pode ter sido a alta dosagem utilizada por um longo período (500 mg, por 8 semanas), aproximadamente 6,6 vezes maior que a dose terapêutica recomendada (FORETZ et al., 2014) para animais diabéticos. Mas vale ressaltar que essa dose terapêutica é recomendada para animais diabéticos. Em animais saudáveis, de Araujo et al. (2019) demonstraram que altas doses (250 mg) são capazes de melhorar o desempenho físico, não havendo ainda uma preconização da faixa de dose ideal para desempenho. Frise-se que os dados da metabolômica não demonstram efeitos negativos do uso de 500 mg, por 8 semanas.

Nossos resultados mostraram ainda que o HIIT induziu aumentos no desempenho físico no grupo controle, apesar das interferências negativas do confinamento durante o período experimental, mostrando-se ser um protocolo eficiente de treinamento. Estudos mostram que quando colocamos animais em gaiolas pequenas, submetemos os animais a um status sedentário obrigatório e as adaptações ao exercício são bem diferentes dos animais no ambiente natural (SCARIOT et al., 2015, SCARIOT et al., 2016). Além disso, o desempenho físico foi acompanhado de supercompensação de glicogênio no gastrocnêmio também no grupo controle.

Por outro lado, nossos resultados mostraram que o músculo sóleo teve uma síntese limitada de glicogênio durante o HIIT. Esses resultados foram semelhantes ao encontrado no estudo de de Araujo et al. (2016). Os autores relataram que para esse modelo de exercício a característica do músculo gastrocnêmio (fibras de

contração rápida) é mais sensível à síntese de glicogênio devido à maior atividade da glicogênio sintase após o exercício e à capacidade de reposição de glicogênio durante o estresse físico em relação às fibras oxidativas.

Em resumo, nosso estudo foi o primeiro a demonstrar que o uso crônico de altas doses de metformina não é capaz de melhorar o desempenho físico, além de aumentar os níveis de lactato circulante em repouso, prejudicar a supercompensação do glicogênio muscular promovida pelo treinamento físico e as concentrações de GLUT4 em animais saudáveis.

AGRADECIMENTOS

Ao financiamento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa de Alagoas (FAPEAL) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq).

REFERÊNCIAS

Abe T, Kitaoka Y, Kikuchi DM, Takeda K, Numata O, Takemasa T. High-intensity interval training-induced metabolic adaptation coupled with an increase in Hif-1 α and glycolytic protein expression. *J Appl Physiol* (1985). 2015 Dec 1;119(11):1297-302.

Alfaras I, Mitchell SJ, Mora H, Lugo DR, Warren A, Navas-Enamorado I, Hoffmann V, Hine C, Mitchell JR, Le Couteur DG, Cogger VC, Bernier M, de Cabo R. Health benefits of late-onset metformin treatment every other week in mice. *NPJ Aging Mech Dis*. 2017 Nov 20;3:16.

Asif S, Bennett J, Marakkath B. Metformin-associated Lactic Acidosis: An Unexpected Scenario. *Cureus*. 2019 Apr 5;11(4):e4397.

Bastos-Silva VJ, Marinho AH, Bezerra da Silva JB, de Barros Sousa FA, Learsi S, Balikian P, Gomes de Araujo G. Acute metformin administration increases mean power and the early Power phase during a Wingate test in healthy male subjects. *Eur J Sport Sci*. 2021 Jun 13:1-8.

Borst SE, Snellen HG. Metformin, but not exercise training, increases insulin responsiveness in skeletal muscle of Sprague-Dawley rats. *Life Sci.* 2001 Aug 17;69(13):1497-507.

Braun B, Eze P, Stephens BR, Hagobian TA, Sharoff CG, Chipkin SR, Goldstein B. Impact of metformin on peak aerobic capacity. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2008 Feb;33(1):61-7.

Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P, Auwerx J. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature.* 2009 Apr 23;458(7241):1056-60.

Carling D. The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci.* 2004 Jan;29(1):18-24.

Carvalho C, Correia S, Santos MS, Seiça R, Oliveira CR, Moreira PI. Metformin promotes isolated rat liver mitochondria impairment. *Mol Cell Biochem.* 2008 Jan;308(1-2):75-83.

Cho K, Chung JY, Cho SK, et al. Antihyperglycemic mechanism of metformin occurs via the AMPK/LXR α /POMC pathway. *Sci Rep.* 2015;5:8145. Published 2015 Jan 30. doi:10.1038/srep0814

Davies MJ, D'Alessio DA, Fradkin J, Kernan WN, Mathieu C, Mingrone G, Rossing P, Tsapas A, Wexler DJ, Buse JB. Management of Hyperglycemia in Type 2 Diabetes, 2018. A Consensus Report by the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care.* 2018 Dec;41(12):2669-2701. doi: 10.2337/dci18-0033.

de Araujo GG, Learsi S, Bastos-Silva VJ, Ataide T, Lima-Silva AE. Chronic metformin intake improves anaerobic but not aerobic capacity in healthy rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* 2019.

de Araujo GG, Papoti M, Dos Reis IG, de Mello MA, Gobatto CA. Short and Long Term Effects of High-Intensity Interval Training on Hormones, Metabolites, Antioxidant System, Glycogen Concentration, and Aerobic Performance Adaptations in Rats. *Front Physiol.* 2016 Oct 28;7:505.

Dubois, B., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., and Rebers, P.A. (1956). Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem.* 1956, 350–356.

Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, Viollet B. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab.* 2014 Dec 2;20(6):953-66.

Foretz M, Hébrard S, Leclerc J, Zarrinpashneh E, Soty M, Mithieux G, Sakamoto K, Andreelli F, Viollet B. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest.* 2010 Jul;120(7):2355-69. doi: 10.1172/JCI40671

Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong JK, Furlong TJ, Greenfield JR, Greenup LC, Kirkpatrick CM, Ray JE, Timmins P, Williams KM. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet.* 2011 Feb;50(2):81-98.

Hardie DG. AMPK--sensing energy while talking to other signaling pathways. *Cell Metab.* 2014 Dec 2;20(6):939-52. doi: 10.1016/j.cmet.2014.09.013.

Janzer A, German NJ, Gonzalez-Herrera KN, Asara JM, Haigis MC, Struhl K. Metformin and phenformin deplete tricarboxylic acid cycle and glycolytic intermediates during cell transformation and NTPs in cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Jul 22;111(29):10574-9. doi: 10.1073/pnas.1409844111. Epub 2014 Jul 7. PMID: 25002509; PMCID: PMC4115496.

Johnson ST, Robert C, Bell GJ, Bell RC, Lewanczuk RZ, Boulé NG. Acute effect of metformin on exercise capacity in active males. *Diabetes Obes Metab.* 2008 Sep;10(9):747-54. Epub 2007 Oct 26.

Klip A, Gumà A, Ramlal T, Bilan PJ, Lam L, Leiter LA. Stimulation of hexose transport by metformin in L6 muscle cells in culture. *Endocrinology*. 1992 May;130(5):2535-44.

Kristensen JM, Treebak JT, Schjerling P, Goodyear L, Wojtaszewski JF. Two weeks of metformin treatment induces AMPK-dependent enhancement of insulin-stimulated glucose uptake in mouse soleus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014 15;306(10):E1099-109.

Lalau JD. Lactic acidosis induced by metformin: incidence, management and prevention. *Drug Saf*. 2010 Sep 1;33(9):727-40.

Laursen PB, Jenkins DG. The scientific basis for high-intensity interval training: optimising training programmes and maximising performance in highly trained endurance athletes. *Sports Med*. 2002;32(1):53-73.

Learsi SK, Bastos-Silva VJ, Lima-Silva AE, Bertuzzi R, De Araujo GG. Metformin improves performance in high-intensity exercise, but not anaerobic capacity in healthy male subjects. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2015 Oct;42(10):1025-9.

Lee JO, Lee SK, Kim JH, Kim N, You GY, Moon JW, Kim SJ, Park SH, Kim HS. Metformin regulates glucose transporter 4 (GLUT4) translocation through AMP-activated protein kinase (AMPK)-mediated Cbl/CAP signaling in 3T3-L1 preadipocyte cells. *J Biol Chem*. 2012 Dec 28;287(53):44121-9.

Malin SK, Gerber R, Chipkin SR, Braun B. Independent and combined effects of exercise training and metformin on insulin sensitivity in individuals with prediabetes. *Diabetes Care*. 2012 Jan;35(1):131-6.

Malin SK, Stephens BR, Sharoff CG, Hagobian TA, Chipkin SR, Braun B. Metformin's effect on exercise and postexercise substrate oxidation. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*. 2010 Feb;20(1):63-71.

Martin-Montalvo A, Mercken EM, Mitchell SJ, Palacios HH, Mote PL, Scheibye-Knudsen M, Gomes AP, Ward TM, Minor RK, Blouin MJ, Schwab M, Pollak M, Zhang Y, Yu Y, Becker KG, Bohr VA, Ingram DK, Sinclair DA, Wolf NS, Spindler SR, Bernier M, de Cabo R. Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat Commun.* 2013;4:2192.

Myette-Côté É, Terada T, Boulé NG. The Effect of Exercise with or Without Metformin on Glucose Profiles in Type 2 Diabetes: A Pilot Study. *Can J Diabetes.* 2016 Apr;40(2):173-7.

Ouyang J, Parakhia RA, Ochs RS. Metformin activates AMP kinase through inhibition of AMP deaminase. *J Biol Chem.* 2011 Jan 7;286(1):1-11.

Rynders C, Weltman A, Delgiorno C, Balagopal P, Damaso L, Killen K, Mauras N. Lifestyle intervention improves fitness independent of metformin in obese adolescents. *Med Sci Sports Exerc.* 2012 May;44(5):786-92.

Sadeghi A, Mousavi SM, Mokhtari T, Parohan M, Milajerdi A. Metformin Therapy Reduces Obesity Indices in Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta Analysis of Randomized Clinical Trials. *Child Obes.* 2020 Apr;16(3):174-191. doi: 10.1089/chi.2019.0040.

Scalzo RL, Paris HL, Binns SE, Davis JL, Beals JW, Melby CL, Luckasen GJ, Hickey MS, Miller BF, Hamilton KL, Bell C. Ergogenic properties of metformin in simulated high altitude. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2017 Jul;44(7):729-738.

Scariot PP, de Barros Manchado-Gobatto F, Torsoni AS, Torsoni MA, dos Reis IG, Beck WR, Gobatto CA. Wide housing space and chronic exercise enhance physical fitness and adipose tissue morphology in rats. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2015 May;40(5):489-92.

Scariot PP, Manchado-Gobatto Fde B, Torsoni AS, Dos Reis IG, Beck WR, Gobatto CA. Continuous Aerobic Training in Individualized Intensity Avoids Spontaneous

Physical Activity Decline and Improves MCT1 Expression in Oxidative Muscle of Swimming Rats. *Front Physiol.* 2016 Apr 18;7:132.

Scribbans TD, Edgett BA, Vorobej K, Mitchell AS, Joanisse SD, Matusiak JB, Parise G, Quadrilatero J, Gurd BJ. Fibre-specific responses to endurance and low volume high intensity interval training: striking similarities in acute and chronic adaptation. *PLoS One.* 2014 Jun 5;9(6):e98119.

Sharoff CG, Hagobian TA, Malin SK, Chipkin SR, Yu H, Hirshman MF, Goodyear LJ, Braun B. Combining short-term metformin treatment and one bout of exercise does not increase insulin action in insulin-resistant individuals. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010 Apr;298(4):E815-23.

Thomas CR, Turner SL, Jefferson WH, Bailey CJ. Prevention of dexamethasone-induced insulin resistance by metformin. *Biochem Pharmacol.* 1998 Nov 1;56(9):1145-50. doi: 10.1016/s0006-2952(98)00151-8.

Vytla VS, Ochs RS. Metformin increases mitochondrial energy formation in L6 muscle cell cultures. *J Biol Chem.* 2013 Jul 12;288(28):20369-77.

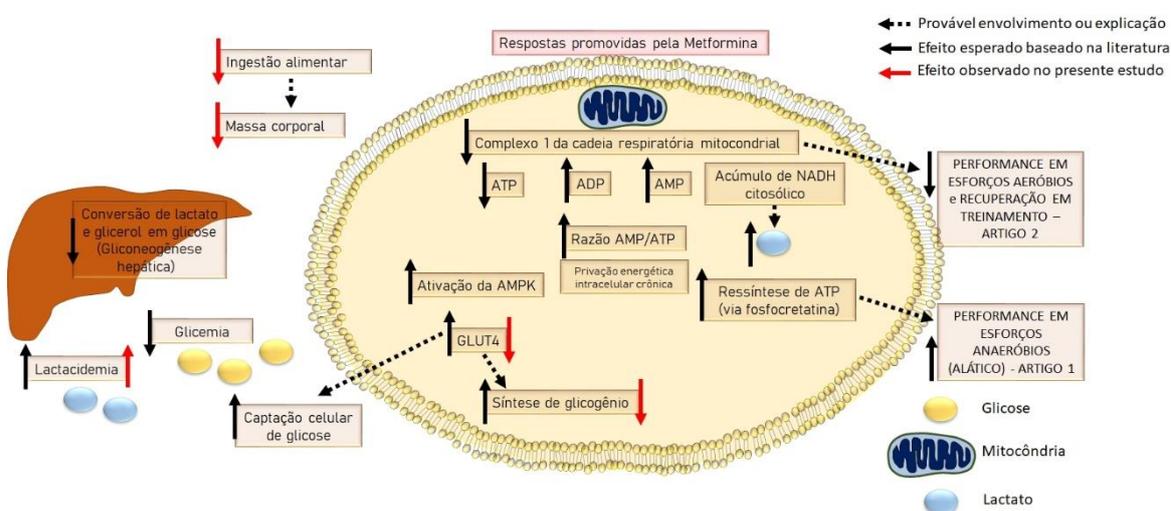
Zakikhani M, Bazile M, Hashemi S, Javeshghani S, Avizonis D, St Pierre J, Pollak MN. Alterations in cellular energy metabolism associated with the antiproliferative effects of the ATM inhibitor KU-55933 and with metformin. *PLoS One.* 2012;7(11):e49513. doi: 10.1371/journal.pone.0049513

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos dois estudos realizados, pudemos constatar que a ingestão aguda de metformina é capaz de aumentar o esforço inicial de força, potência média e trabalho total em um teste anaeróbio de Wingate.

Entretanto, o uso crônico de altas doses de metformina não é capaz de melhorar o desempenho físico, além de aumentar os níveis de lactato circulante em repouso, prejudicar a supercompensação do glicogênio muscular promovida pelo treinamento físico e as concentrações de GLUT4.

Os mecanismos elucidados pela presente tese são descritos na imagem a seguir:



American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care*. 2018 Jan;41(Suppl 1):S13-S27.

Anabtawi A, Miles JM. METFORMIN: NONGLYCEMIC EFFECTS AND POTENTIAL NOVEL INDICATIONS. *Endocr Pract*. 2016 Aug;22(8):999-1007.

de Araujo GG, Learsi S, Bastos-Silva VJ, Ataide T, Lima-Silva AE. Chronic metformin intake improves anaerobic but not aerobic capacity in healthy rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2019.

Davis BJ, Xie Z, Viollet B, Zou MH. Activation of the AMP-activated kinase by antidiabetes drug metformin stimulates nitric oxide synthesis in vivo by promoting the association of heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase. *Diabetes*. 2006 Feb;55(2):496-505.

Das S, Behera SK, Srinivasan A, Xavier AS, Selvarajan S, Kamalanathan S, Sahoo JP, Nair NS. Effect of metformin on exercise capacity: A meta-analysis. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018 Oct;144:270-278.

Egan B, Carson BP, Garcia-Roves PM, Chibalin AV, Sarsfield FM, Barron N, McCaffrey N, Moyna NM, Zierath JR, O'Gorman DJ. Exercise intensity-dependent regulation of peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 mRNA abundance is associated with differential activation of upstream signalling kinases in human skeletal muscle. *J Physiol*. 2010 May 15;588(Pt 10):1779-90.

Egan B, Zierath JR. Exercise metabolism and the molecular regulation of skeletal muscle adaptation. *Cell Metab*. 2013 Feb 5;17(2):162-84.

Foretz M, Guigas B, Bertrand L, Pollak M, Viollet B. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab*. 2014 Dec 2;20(6):953-66.

Gibala MJ, Little JP, van Essen M, Wilkin GP, Burgomaster KA, Safdar A, Raha S, Tarnopolsky MA. Short-term sprint interval versus traditional endurance

training: similar initial adaptations in human skeletal muscle and exercise performance. *J Physiol*. 2006 Sep 15;575(Pt 3):901-11.

Graham GG, Punt J, Arora M, Day RO, Doogue MP, Duong JK, Furlong TJ, Greenfield JR, Greenup LC, Kirkpatrick CM, Ray JE, Timmins P, Williams KM. Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clin Pharmacokinet*. 2011 Feb;50(2):81-98.

Kalender A, Selvaraj A, Kim SY, Gulati P, Brûlé S, Viollet B, Kemp BE, Bardeesy N, Dennis P, Schlager JJ, Marette A, Kozma SC, Thomas G. Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell Metab*. 2010 May 5;11(5):390-401.

Keteyian SJ, Hibner BA, Bronsteen K, et al. Greater improvement in cardiorespiratory fitness using higher-intensity interval training in the standard cardiac rehabilitation setting. *J Cardiopulm Rehabil Prev* 2014;34(2):98–105.

Learsi SK, Bastos-Silva VJ, Lima-Silva AE, Bertuzzi R, De Araujo GG. Metformin improves performance in high-intensity exercise, but not anaerobic capacity in healthy male subjects. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2015 Oct;42(10):1025-9.

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 Jun 15;348 Pt 3:607-14

Pryor R, Cabreiro F. Repurposing metformin: an old drug with new tricks in its binding pockets. *Biochem J*. 2015 Nov 1;471(3):307-22.

Wheaton WW, Weinberg SE, Hamanaka RB, Soberanes S, Sullivan LB, Anso E, Glasauer A, Dufour E, Mutlu GM, Budigner GS, Chandel NS. Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *Elife*. 2014 May 13;3:e02242.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "*Efeitos da ingestão crônica de metformina isolada ou combinada a creatina e/ou maltodextrina durante o treinamento anaeróbico no desempenho e biomarcadores de estresse em ratos*", registrada com o nº 74 /2017, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Gustavo Gomes de Araújo**, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), em reunião de 18 de maio de 2018.

Vigência da autorização	02.07.2018 a 30.11.2018
Espécie/linhagem/raça	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	105
Peso/idade	250-300g / 80 dias
Sexo	Machos
Origem/Local de manutenção	Biotério Central da Ufal / Biotério do Laboratório de Nutrição da Faculdade de Nutrição da Ufal - FANUT
Colaboradores	Victor José Bastos da Silva

Maceió, 23 de maio de 2018.

Elvan Nascimento dos Santos Filho

Coordenador da CEUA
SIAPE 1756479



Acute metformin administration increases mean power and the early Power phase during a Wingate test in healthy male subjects

Victor José Bastos-Silva^{a,b}, Alisson Henrique Marinho^a, José Bruno Bezerra da Silva^b, Filipe Antônio de Barros Sousa^a, Sara Learsi^a, Pedro Balikian^a and Gustavo Gomes de Araujo ^a

^aLaboratory of Applied Sports Science, Institute of Physical Education and Sports, PPGCS/PPGNUT, Federal University of Alagoas, Maceió, Brazil; ^bMaufrício de Nassau University Center, Maceió, Brazil

ABSTRACT

The present study tested the hypothesis that acute metformin would increase peak power measured during a Wingate test. Fourteen men (24 ± 6 years; 75.8 ± 10.2 kg; 177 ± 7 cm) participated in four test sessions, conducted in a crossover, counterbalanced, double-blind model. The first and second sessions consisted of anthropometric measurements and one Wingate test per day to assess test-retest reliability. In the last two sessions, the Wingate tests were performed on metformin (500 mg capsule, 1 hour before) or placebo (cellulose capsule, 1 hour before) condition. No differences were found between the placebo and metformin for peak power (1056.8 ± 215.8 W vs. 1095.2 ± 199.3 W, respectively; $p=0.24$). Mean power (630.9 ± 87.8 W vs. 613.1 ± 94.8 W, respectively; $p=0.01$) and total work (18928 ± 2633 kJ vs. 18393 ± 2845 kJ, respectively; $p=0.01$) in the metformin condition were higher than the placebo. The power was greater in metformin when compared to the placebo in moments 3 ($p=0.01$), 4 ($p=0.01$), 5 ($p=0.04$), 6 ($p=0.04$), 7 ($p=0.02$), 8 ($p=0.03$) and 9 ($p=0.01$) seconds. There were no differences between conditions for the peak lactate ($p=0.08$) and the rating of perceived exertion ($p=0.84$). Acute metformin administration increased the early power phase and the mean power of a Wingate test.

KEYWORDS

Biguanides; AMPK activity; lactate; anaerobic metabolism; energy metabolism; high-intensity exercise

Introduction

Metformin is a widely used drug for treating type 2 diabetes with several cellular mechanisms (Inzucchi et al., 2015; Zhou et al., 2001). The metformin action in pathological conditions (i.e. diabetes, obesity, and metabolic syndrome) includes reducing of peripheral resistance to insulin and hyperinsulinemia, lipid metabolism control, stimulation of glucose uptake and synthesis (Eriksson et al., 2007). It has been reported *in vitro* that metformin decreases mitochondrial energy production (Cameron et al., 2018), causing a decline in the free ATP/ADP and ATP/AMP ratios (Carling, 2004; Zhou et al., 2001). Thereby, due to decreasing mitochondrial respiration, the organism may increase the ATP resynthesis from the phosphocreatine (PCr) to attend to the metabolic demand (Vytla & Ochs, 2013). Therefore, metformin administration would lead to a larger contribution of high energy phosphates to maintain cellular functioning, but studies on the effects of metformin in healthy organisms, mainly on performance and anaerobic metabolism, are still scarce.

In healthy subjects, short-term metformin administration (500 mg of metformin in a single day) does not affect energy homeostasis at rest or during exercise in skeletal muscle (Kristensen et al., 2019). However, metformin intakes (2000 mg) decreased the peak oxygen uptake ($\text{VO}_{2\text{peak}}$) during incremental intensity protocol (Braun et al., 2008). A crucial data reported by Braun et al. (2008) is that there was no difference between the conditions in the final workload achieved, which leads us to hypothesize that anaerobic metabolism was decisive for workload maintenance. This response may be due to inhibition in energy transduction, by selectively suppressing the efficient coupling of the redox and proton transfer domains of complex I of the electron transport system (Cameron et al., 2018).

In this sense, it was hypothesized that metformin's ingestion would be beneficial to performance during efforts relying on high ATP turnover rates, such as short-duration and high-intensity exercise. In a study evaluating healthy rats, de Araujo et al., (2020) reported that, after ten days of metformin ingestion

CONTACT Gustavo Gomes de Araujo  gusta_ef@yahoo.com.br  Laboratory of Applied Sports Science, Institute of Physical Education and Sports, PPGCS/PPGNUT, Federal University of Alagoas, Maceió, Alagoas, Brazil

All authors mentioned above take responsibility for all aspects of the reliability and freedom from bias of the data presented and their discussed interpretation.

© 2021 European College of Sport Science

(250 mg), the time to exhaustion in swimming high-intensity bouts, as well as anaerobic capacity, were higher than the placebo group. In humans, acute metformin ingestion (i.e. 500 mg 1 hour before the test) improved time to exhaustion on a cycle ergometer at 110% of maximal oxygen uptake ($\dot{V}O_{2\max}$), together with increased anaerobic alactic contribution, but not anaerobic lactic energy (Learsi, Bastos-Silva, Lima-Silva, Bertuzzi, & de Araujo, 2015). Thus, based on the results in humans, it seems that metformin intake 1 hour before high-intensity exercise may improve performance in healthy and physically active men. According to the studies above cited (de Araujo et al., 2020; Learsi et al., 2015), and the logic of improving the use of PCr levels, metformin ingestion could be a way to enhance sports performance in modalities with great demands on fast ATP turnover. However, it is yet to be confirmed the real metformin effect in short-duration and high-intensity exercise performance in healthy subjects.

Two constructs are commonly used to measure performance in short-duration and high-intensity exercise: i) anaerobic power, or the fastest rate of ATP turnover during exercise; and ii) anaerobic capacity, or the amount of ATP yield by metabolic pathways independent of oxygen (Boulay et al., 1985; Minahan, Chia, & Inbar, 2007). A commonly used protocol to evaluate those constructs, and considered the gold standard for cycling, is the 30-second Wingate anaerobic test (Bertuzzi, Kiss, Damasceno, Oliveira, & Lima-Silva, 2015). This test consists of a 30 seconds all-out effort and is often analyzed based on mechanical variables, such as attained peak power (PP), mean power output (MP) and total work performed (TW). Furthermore, evidence shows the association of PP and MP to physiological measures, such as the breakdown of phosphocreatine and muscle glycogen depletion, respectively (Cheatham et al., 1986; Bogdanis, Nevill, Boobis, Lakomy, & Nevill, 1995; Patton & Duggan, 1987; Vincent et al., 2004). This way, PP is often used to measure anaerobic power, and, despite being disputed (Minahan et al., 2007), MP had shown an association with anaerobic capacity (Bogdanis et al., 1995; Demarie, Chirico, Gianfelici & Vannozi, 2019).

Anaerobic power is of great importance in many types of sport, so the ergogenic effects of supplementation on this construct are of obvious interest. According to the best of our knowledge, no study yet assessed acute metformin ingestion on the Wingate anaerobic test in healthy subjects. Therefore, the present study aimed to investigate an acute metformin intake effect on the 30s Wingate anaerobic test performance in healthy male subjects. We hypothesize that

metformin would improve performance on the 30s Wingate anaerobic test with increased PP due to its association with PCr levels.

Materials and methods

Study design

The study was conducted in a randomized, crossover, counterbalanced, double-blind model. Four visits were performed with a minimum of 72 and a maximum of 96 hours intervals. During the first session, anthropometric measurements (body mass, height, and skin folds) and the first familiarisation of the Wingate anaerobic test protocol were carried out. The Wingate anaerobic test was completed again 72 hours after the first testing session to determine the test-retest reliability of measurements. The last two sessions comprised of the experimental procedures under either metformin or placebo conditions. One researcher performed randomization and counterbalancing of conditions (i.e. metformin and placebo) through site randomizer.org, aiming to guarantee the subjects' unbiased allocation.

A 24-hour dietary recall was completed by each subject before the first familiarization; it was then photocopied and handed back to the participants for the same diet to be repeated for subsequent trials. We asked participants to refrain from exhaustive exercise, alcohol, and caffeine ingestion for 24 hours before data collection to avoid interferences in results.

Participants

Fourteen physically active (minimum of 150 min week⁻¹ of moderate exercise) healthy men participated in the present study. The minimum amount of physical activity was achieved through a simple interview with the participants. Participants were provided with information about the study's experimental risks and benefits and signed an informed consent form before starting the experiments. All study procedures were conducted following the Declaration of Helsinki and were approved by the local ethics committee (1420/12). Written informed consent to participate in the study was obtained from all subjects after receiving detailed information about the measurement procedures.

Anthropometric measurements

Body mass was measured using an electronic scale, and height with a stadiometer. To assess skinfold thickness

was used as a Lange Skinfold Caliper (Cambridge, MD, USA). Body density was predicted by Jackson and Pollock (1985) generalized equation, followed by Siri's equation (1961) to estimate body fat.

Wingate anaerobic test

The Wingate anaerobic test consists of 30 seconds of an all-out effort on a cycle ergometer (Bar-Or, 1987). We used a mechanically braked cycle ergometer (Biotec 2100^o, CEFISE) and all data were calculated using a custom code on Matlab (Matlab 6.0^o, MathWorks Inc, EUA). Torque was obtained by calibration of the dynamometer using known weights, in order to equalize the torque performed in the system to the load applied to the ergometer. The calibration equation for power was $W = (Kgfm^6 * rpm) / 6.12$. Subjects submitted a five-minute warm-up with an approximate load of 150 watts (90 rpm and a fixed load of 2.5 Kp), and at the end of the 2nd and 4th minutes, performed two all-outs sprints of 6 seconds (Marinho et al., 2020). After warm-up procedures, participants were instructed to start a slow, unloaded cycle. At -5 seconds, a count-down started. A flying unloaded start began at -3 seconds. Then, at point 0 seconds, the resistance equivalent to 7.5% of body mass was added, and the subjects performed an all-out effort for 30 seconds (Marinho et al., 2020). PP was obtained as the highest value of mechanical power in a 1 seconds interval, MP the average power throughout the test, and TW was obtained as the accumulated work during the test, as a quotient of power and time.

Rating of Perceived Exertion (RPE) was collected at rest, before, and immediately after the test through the BORG 6–20 scale (Borg, 1982). Blood samples (25 μ L) were collected from the ear lobe using a capillary tube before and immediately, three and five minutes after the end of the exercise, to determine the resting concentration and peak lactate. Blood samples were immediately transferred to microtubes containing 25 μ L of fluoride at 1% and subsequently centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm for plasma separation. Plasma lactate concentrations were measured using an enzymatic method (Manufactured by GT Laboratory S.R.L. Code 475050 – Rosario - Argentina) on a FlexStation^o 3 Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, California, USA). The highest value was assumed to be the peak plasma lactate concentration.

Metformin administration

Participants ingested either a 500 mg metformin (99.6% pure) capsule or a placebo capsule (cellulose capsule

with the same colour, size, and weight as the metformin capsule) 60 minutes before (Learsi et al., 2015) the Wingate anaerobic test.

Gastrointestinal side effects

A questionnaire was used to check for possible gastrointestinal discomfort symptoms, consisting of 19 items regarding heartburn, dizziness, and headache (Jeukendrup et al., 2000). The participants attributed values ranging from 1 to 10, where 1 is "no problem at all" and 10 "the worst it has ever been" for each item assessed. The symptoms were considered severe when the score was equal to or greater than 5 (Jeukendrup et al., 2000).

Statistical analysis

Data were presented as mean \pm standard deviation. The distribution was assessed through the Shapiro-Wilk's (normality test) test to determine whether it did meet parametric assumptions. Under confirmation of normality distribution, we examined the test-retest reliability between the familiarization sessions through Student's t-test for paired samples, intraclass correlation coefficient (ICC), technical error of measurement (TEM) and coefficient of variation (CV) (Hopkins, 2000).

Hypothesis testing for Wingate anaerobic test variables (i.e. PP, MP, TW) and RPE in the metformin and placebo conditions were evaluated using a Student's t-test for paired samples. The power every second and lactate concentration was analyzed using two-way repeated-measures ANOVA, followed by Bonferroni *post hoc* tests. We calculate the magnitude of differences between all metformin and placebo variables Cohen's *d* effect sizes; the thresholds for small, moderate, and large effects were 0.20, 0.50, and 0.80, respectively (Cohen, 1988). All analyses were performed using Statistical Package for the Social Sciences software (SPSS; version 25.0; IBM, Chicago, IL, USA) and significance was accepted as $p \leq 0.05$.

Results

Participant characteristics

The physical characteristics of the participants were as follows: age: 24 ± 6 years; body mass: 75.9 ± 10.2 kg; height: 177 ± 7 cm; body mass index: 24.6 ± 3.2 kg/m²; body fat: $13.0\% \pm 5.5\%$.

Table 1. The intraclass correlation coefficient (ICC), typical error of measurement (TEM) and coefficient of variation (CV) for Wingate test variables.

Variables	Test	Retest	ICC	TEM	CV (%)	<i>p</i>
PP (W)	1018.5 ± 180.8	1038.9 ± 179	0.89 (0.69-0.96)	0.31 (0.27-0.63)	6.3	0.39
MP (W)	608.1 ± 94.5	615.4 ± 97.8	0.96 (0.89-0.99)	0.21 (0.15-0.35)	3.2	0.37
TW (J)	18257 ± 2833	18476 ± 2934	0.96 (0.88-0.99)	0.22 (0.16-0.36)	3.2	0.37

Note. Values listed as mean ± SD and confidence interval (CI 95%). PP = peak power; MP = mean power; TW = total work; W = watts; J = joules.

Gastrointestinal symptoms

No participants reported significant gastrointestinal discomfort (all <5 points for each questionnaire item) before ingestion. Similarly, after the test no participants showed significant gastrointestinal discomfort in the placebo and metformin conditions.

Test-Retest reliability

There were no significant differences between test and retest measurements for PP, MP and TW. All variables showed a low TEM and a moderate to high ICC (Table 1).

Wingate anaerobic test

MP and TW was higher in the metformin condition than the placebo condition (Table 2). No statistical differences were found between the placebo and metformin conditions for PP.

In addition, there was a main effect of time ($F = 183.6$; $p < 0.01$), condition ($F = 8.9$; $p = 0.01$) and time-condition interaction for power output generated every second ($F = 2.29$; $p = 0.05$), with higher values at the time 3 (975.2 ± 153.3 W vs. 844.3 ± 162.8 W; $p = 0.01$), 4 (848.2 ± 132.1 W vs. 790.7 ± 146.9 W; $p = 0.01$), 5 (824.0 ± 116.8 W vs. 776.6 ± 137.4 W; $p = 0.04$), 6 (800.9 ± 103.6 W vs. 760.7 ± 121.6 W; $p = 0.04$), 7 (775.8 ± 96.9 vs. 742.0 ± 110.0 W; $p = 0.02$), 8 (750.0 ± 98.4 W vs. 721.0 ± 101.8 W; $p = 0.03$) and 9 (721.9 ± 93.8 W vs. 694.1 ± 101.1 W; $p = 0.01$) seconds in metformin condition when compared to the placebo condition, respectively (Figure 1).

RPE and Plasma lactate

There was no significant difference between the conditions for the RPE variable in both rest and exhaustion. Likewise, there was no difference between the conditions ($F = 4.54$; $p = 0.06$) or the condition-time interaction ($F = 2.96$; $p = 0.11$), only in time [rest vs peak lactate ($F = 142.79$; $p < 0.01$)]; however, a moderate effect size was observed at the peak lactate in the metformin condition. (Table 3).

Table 2. Wingate test variables

Variables	Metformin	Placebo	<i>P</i>	Effect Size
PP (W)	1095.2 ± 199.3	1056.8 ± 215.8	0.24	0.33
MP (W)	630.9 ± 87.8*	613.1 ± 94.8	0.01	0.82
TW (J)	18928 ± 2633	18393 ± 2845	0.01	0.82

Note. Values listed as mean ± SD. PP = peak power; MP = mean power; TW = total work; W = watts; J = joules. *significant different from placebo condition

Discussion

The study's main results were that acute metformin ingestion improves MP, TW and the power output in the first seconds during a Wingate test. However, despite the increased power in the first seconds with metformin administration, the PP remained unchanged.

In the study conducted by Learsi et al. (2015) the acute metformin (500 mg) intake increased time to exhaustion on a cycle ergometer at 110% of $\dot{V}O_{2\max}$ concerning the placebo condition. Although no difference in anaerobic capacity measured by the maximal accumulated oxygen deficit (MAOD) protocol after metformin ingestion, the authors observed an increase in the fast component of excess post-exercise oxygen consumption (EPOCfast) that represents the total PCr expended during exercise (Bertuzzi et al., 2016; Haseler, Hogan, & Richardson, 1999; Learsi et al., 2015; Zagatto et al., 2019). The phosphate system is the main responsible for the resynthesis of ATP in maximum effort exercise in the first 5–6 seconds, and its contribution should continue until the stocks of PCr are mainly depleted, which usually occurs within 10–15 s (Baker, McCormick, & Robergs, 2010).

Our study found that metformin's ingestion increases the output power in the initial 3–9 seconds, which probably contributed to an increase in MP. Traditionally, MP from Wingate has been used to indicate the lactic anaerobic system activity, which was not appointed by the Learsi et al. (2015) study using metformin. We did not find effects in PP, the variable of Wingate anaerobic test related to the alactic anaerobic pathway (Bertuzzi et al., 2015). However, a surprising result was found in the increase of power through the second 3–9 paired between conditions. This result, combined with previous investigations, could not discard that there was also a greater use of the alactic anaerobic pathway (Bogdanis

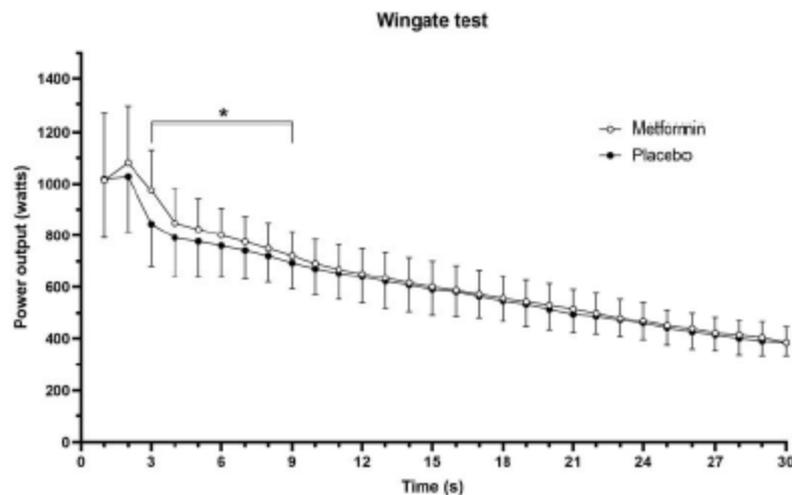


Figure 1. Mean and standard deviation every second in the Wingate test. Note. *Significantly different from placebo condition.

et al., 1995; Gastin, 1994) with the administration of metformin, considering the time-frame for alactic peak activity and end of contribution (Baker et al., 2010). It is possible that, in the current study, a combined effect on both anaerobic metabolisms contributed to enhancing power from 3 to 9 seconds of exercise. These results characterize metformin's influence timespan on performance, thus adding the find of Learsi et al. (2015) considering the lack of temporal resolution from EPOC_{last} results.

An increase in MP was accompanied by a tendency ($p = 0.08$) and moderate effect size ($ES = 0.49$) in the peak lactate values. This result may be associated with decreased mitochondrial energy production (Cameron et al., 2018). Furthermore, it seems that metformin reduces the activity of the pyruvate carboxylase enzyme, responsible for pyruvate metabolism in oxaloacetate during gluconeogenesis process (Matyukhin, Patschan, Ritter, & Patschan, 2020). Thereby, the impairment of such enzyme function increases pyruvate conversion in lactate rather than oxaloacetate (Matyukhin et al., 2020). The impairment of oxaloacetate conversion could increase fast ATP turnover by the glycolytic pathway,

explaining the effect of metformin on MP. Besides, Pilmark et al. (2021) found an increase in fasting lactate levels after three weeks of medication, which was also maintained after 12 weeks of training plus metformin. Metformin increases the glucose uptake by enterocytes and subsequently increases lactate concentration in enterocytes to increased glycolysis. That said, your study's moderate effect size may be explained due to the greater use of anaerobic metabolism during exercise. Despite these results, under normal circumstances, therapeutic levels of metformin administration have no effect on the accumulation of lactate in the blood. Metformin-associated lactic acidosis seems to reflect the prolonged use of high doses of metformin, which is not related to our experiment (Rajasurya, Anjum, & Surani, 2019).

The increase in MP may also be related to increased anaerobic capacity (Zupan et al., 2009). In the animal model, 250 mg metformin chronic ingestion for ten days increased the anaerobic capacity of healthy rats (de Araujo et al., 2020). One possible explanation is that the use (4 days) of metformin (500-100 mg) seems to have gluco-regulatory properties, being able to increase the content of muscle glycogen in healthy subjects (Scalzo et al., 2017). However, our study utilised acute metformin intake, which seems insufficient to increase cell energy stores, and anaerobic capacity (Kristensen et al., 2019). We believe that this increase in MP is due to the increased use of the anaerobic lactic route, as mentioned above. Therefore, chronic administration of metformin may have a higher effect on lactate production and MP.

Table 3. Physiological and psychological variables.

Variables	Metformin	Placebo	P	Effect Size
[Lac] ⁻ resting (mmol/L)	1.5 ± 0.7	1.3 ± 0.4	0.41	0.25
[Lac] ⁻ peak (mmol/L)	9.1 ± 2.7	7.5 ± 2.1	0.08	0.49
[Lac] ⁻ Area-under-curve (mmol/L)	7.8 ± 3.0	6.5 ± 2.4	0.14	0.41
RPE resting	6.0 ± 0.0	6.1 ± 0.3	-	-
RPE end	16.9 ± 2.2	16.9 ± 1.6	0.84	0.01

Note. Values listed as mean ± SD. RPE = Rating of perceived exertion.

Regarding RPE, we did not find differences after Wingate anaerobic test between conditions. Some studies had reported higher RPE when the participants ingested metformin than placebo (Kristensen et al., 2019; Malin et al., 2010). Such a response may be due to metformin increasing the adrenaline concentration; however, this result is hypothetical since it was shown by only one study (Kristensen et al., 2019).

Metformin is considered a safe drug; however, among its most reported side effects are related to the gastrointestinal tract, such as diarrhea and nausea (Asif, Bennett, & Marakkath, 2019). In the present study, in which metformin was administered in a single dose (500 mg) 1 hour before exercise, there was no difference in the effect of ingestion on gastrointestinal discomfort.

This result confirms that there is some influence of metformin on short-duration and high-intensity exercise performance. We have shown metformin to influence mechanical power exerted between 3 and 9 s of the Wingate test, to such extent as to increase the test's MP. Performance in all-out efforts lasting up to 10 seconds should benefit more from metformin ingestion, whose effect is expected to decrease as sprint duration increases. Future studies should use other methods to identify further the mechanistic way metformin increases anaerobic energy production in healthy humans.

It is worth remembering that even though the Wingate test's PP is considered the gold standard for measuring anaerobic power, it is not the case for MP and anaerobic capacity. Based on the literature, the current study was conducted looking for an improvement on anaerobic power but found an effect on MP and a tendency to rise in peak blood lactate concentration. It is worth mentioning that the lack of difference between the lactate peaks can be due to the low frequency of collection. The peak moment is individual and may have been changed by the conditions.

Finally, some limitations of the present study must be considered. Although the Wingate test is the traditional method used to estimate anaerobic power and capacity, its reliability and validity are criticised (Bar-Or, 1987; Ozkaya, Colakoglu, Kuzucu, & Yildiztepe, 2012). To diminish this limitation, we carried out a test-retest before the experimental sessions. There were no differences between the test-retest measures for PP, MP and TW, guaranteeing test reliability. Besides, all variables showed low TEM and moderate to high ICC. The second limitation was the determination of metabolic demand through mechanics variables (i.e. PP and MP), which may be limited from a methodological standpoint. Lastly, blood glucose concentration was not

analyzed, which may influence post-exercise blood lactate concentration and the metformin ergogenic effect. However, metformin is an antihyperglycemic drug and in healthy subjects, it does not cause hypoglycemia (Tokubuchi et al., 2017).

Our results indicate the feasibility of using metformin to improve performance in short, high-intensity exercises. This strategy can be advantageous and attractive in modalities that have a predominance of the anaerobic system. However, further studies need to be conducted using different sports.

Conclusion

Acute metformin intake increased early power exertion, MP and TW in a Wingate anaerobic test in healthy subjects physically active. Also, there was no difference in the lactate peak and the RPE.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

This work was supported in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

ORCID

Gustavo Gomes de Araujo  <http://orcid.org/0000-0003-4609-069X>

References

- Asif, S., Bennett, J., & Marakkath, B. (2019). Metformin-associated Lactic Acidosis: An unexpected scenario. *Cureus*, *11*(4), e4397. Published 2019 Apr 5.
- Baker, J. S., McCormick, M. C., & Robergs, R. A. (2010). Interaction among skeletal muscle metabolic energy systems during intense exercise. *Journal of Nutrition and Metabolism*, *2010*, 1–13. doi:10.1155/2010/905612
- Bar-Or, O. (1987). The Wingate anaerobic test. An update on methodology, reliability and validity. *Sports Medicine*, *4*(6), 381–394. doi:10.2165/00007256-198704060-00001
- Bertuzzi, R., Kiss, M. A., Damasceno, M., Oliveira, R. S., & Lima-Silva, A. E. (2015). Association between anaerobic components of the maximal accumulated oxygen deficit and 30-second Wingate test. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *48*(3), 261–266. doi:10.1590/1414-431X20144043
- Bertuzzi, R., Melegati, J., Bueno, S., Ghirone, T., Pasqua, L. A., Gáspari, A. F., ... Peterson, J. (2016). GEDAE-LaB: A free software to calculate the energy system contributions during exercise. *PLoS One*, *11*(1), e0145733. doi:10.1371/journal.pone.0145733. Published 2016 Jan 4.

- Bogdanis, G. C., Nevill, M. E., Boobis, L. H., Lakomy, H. K., & Nevill, A. M. (1995). Recovery of power output and muscle metabolites following 30 s of maximal sprint cycling in man. *The Journal of Physiology*, 482(Pt 2)(Pt 2), 467–480. doi:10.1113/jphysiol.1995.sp020533
- Borg, G. A. (1982). Psychophysical bases of perceived exertion. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 14(5), 377–381.
- Boulay, M. R., Lortie, G., Simoneau, J. A., Hamel, P., Leblanc, C., & Bouchard, C. (1985). Specificity of aerobic and anaerobic work capacities and powers. *International Journal of Sports Medicine*, 6(6), 325–328. doi:10.1055/s-2008-1025864
- Braun, B., Eze, P., Stephens, B. R., Hagobian, T. A., Sharoff, C. G., Chipkin, S. R., & Goldstein, B. (2008). Impact of metformin on peak aerobic capacity. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 33(1), 61–67. doi:10.1139/H07-144
- Cameron, A. R., Logie, L., Patel, K., Erhardt, S., Bacon, S., Middleton, P., ... Rena, G. (2018). Metformin selectively targets redox control of complex I energy transduction. *Redox Biology*, 14, 187–197. doi:10.1016/j.redox.2017.08.018
- Carling, D. (2004). The AMP-activated protein kinase cascade—a unifying system for energy control. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(1), 18–24. doi:10.1016/j.tibs.2003.11.005
- Cheetham, M. E., Boobis, L. H., Brooks, S., & Williams, C. (1986). Human muscle metabolism during sprint running. *Journal of Applied Physiology*, 61(1), 54–60. https://doi.org/10.1152/jappl.1986.61.1.54
- Cohen, J. (1988). Set correlation and multivariate methods. In *Statistical power analysis for the behavioral sciences* (pp. 467–530). Hillsdale, NJ: Erlbaum.
- de Araujo, G. G., Learsí, S., Bastos-Silva, V. J., Ataide, T., & Lima-Silva, A. E. (2020). Chronic metformin intake improves anaerobic but not aerobic capacity in healthy rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 98(1), 23–28. doi:10.1139/cjpp-2019-0459
- Demarie, S., Chirico, E., Gianfelici, A., & Vannozzi, G. (2019). Anaerobic capacity assessment in elite swimmers through inertial sensors. *Physiological Measurement*, 40(6), 064003. doi:10.1088/1361-6579/ab205d. PMID: 31071707
- Eriksson, A., Attvall, S., Bornier, M., Eriksson, J. W., Rosander, B., & Karlsson, F. A. (2007). Short-term effects of metformin in type 2 diabetes. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 9(4), 483–489. doi:10.1111/j.1463-1326.2006.00624.x. PMID: 17587390
- Gastin, P. B. (1994). Quantification of anaerobic capacity. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 4, 91–112. doi:10.1111/j.1600-0838.1994.tb00411.x
- Haseler, L. J., Hogan, M. C., & Richardson, R. S. (1999). Skeletal muscle phosphocreatine recovery in exercise-trained humans is dependent on O₂ availability. *Journal of Applied Physiology*, 86(6), 2013–2018. doi:10.1152/jappl.1999.86.6.2013
- Hopkins, W. G. (2000). Measures of reliability in sports medicine and science. *Sports Medicine*, 30, 1–15.
- Inzucchi, S. E., Bergenstal, R. M., Buse, J. B., Diamant, M., Ferrannini, E., Nauck, M., ... Matthews, D. R. (2015). Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: A patient-centered approach: Update to a position statement of the American Diabetes Association and the European association for the study of Diabetes. *Diabetes Care*, 38(1), 140–149. doi:10.2337/dci14-2441
- Jackson, A. S., & Pollock, M. L. (1985). Practical assessment of body composition. *The Physician and Sportsmedicine*, 13, 76–90.
- Jeukendrup, A. E., Vet-Joop, K., Sturk, A., Stegen, J. H. J. C., Senden, J., Saris, W. H. M., & Wagenmakers, A. J. M. (2000). Relationship between gastro-intestinal complaints and endotoxaemia, cytokine release and the acute-phase reaction during and after a long-distance triathlon in highly trained men. *Clinical Science*, 98(1), 47–55.
- Kristensen, J. M., Lillelund, C., Kjøbsted, R., Birk, J. B., Andersen, N. R., Nybo, L., ... Wojtaszewski, J. F. P. (2019). Metformin does not compromise energy status in human skeletal muscle at rest or during acute exercise: A randomised, crossover trial. *Physiological Reports*, 7(23), e14307. doi:10.14814/phy2.14307
- Learsí, S. K., Bastos-Silva, V. J., Lima-Silva, A. E., Bertuzzi, R., & de Araujo, G. G. (2015). Metformin improves performance in high-intensity exercise, but not anaerobic capacity in healthy male subjects. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 42(10), 1025–1029. doi:10.1111/1440-1681.12474
- Malin, S. K., Stephens, B. R., Sharoff, C. G., Hagobian, T. A., Chipkin, S. R., & Braun, B. (2010). Metformin's effect on exercise and postexercise substrate oxidation. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 20(1), 63–71. doi:10.1123/ijsem.20.1.63
- Marinho, A. H., Mendes, E. V., Vilela, R. A., Bastos-Silva, V. J., Araujo, G. G., & Balikian, P. (2020). Caffeine mouth rinse has no effects on anaerobic energy yield during a Wingate test. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 60(1), 69–74. doi:10.23736/50022-4707.19.09928-6
- Matyukhin, I., Patschan, S., Ritter, O., & Patschan, D. (2020). Etiology and Management of acute metabolic acidosis: An update. *Kidney and Blood Pressure Research*, 45, 523–531.
- Minahan, C., Chia, M., & Inbar, O. (2007). Does power indicate capacity? 30-s Wingate anaerobic test vs. Maximal accumulated O₂ deficit. *International Journal of Sports Medicine*, 28(10), 836–843. doi:10.1055/s-2007-964976
- Ozkaya, O., Colakoglu, M., Kuzucu, E. O., & Yildiztepe, E. (2012). Mechanically braked elliptical Wingate test: Modification considerations, load optimization, and reliability. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 26(5), 1313–1323. doi:10.1519/JSC.0b013e31822e81ab
- Patton, J. F., & Duggan, A. (1987). An evaluation of tests of anaerobic power. *Aviation, Space and Environmental Medicine*, 58(3), 237–242.
- Pilmak, N. S., Lyngbaek, M., Oberholzer, L., Elkjaer, I., Petersen-Bønding, C., Kofoed, K., ... Karstoft, K. (2021). The interaction between metformin and physical activity on postprandial glucose and glucose kinetics: A randomised, clinical trial. *Diabetologia*, 64, 397–409.
- Rajasurya, V., Anjum, H., & Surani, S. (2019). Metformin Use and metformin-associated Lactic Acidosis in intensive Care unit patients with diabetes. *Cureus*, 11(5), e4739. Published 2019 May 23. doi:10.7759/cureus.4739
- Scalzo, R. L., Paris, H. L., Binns, S. E., Davis, J. L., Beals, J. W., Melby, C. L., ... Bell, C. (2017). Ergogenic properties of metformin in simulated high altitude. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 44(7), 729–738. doi:10.1111/1440-1681.12761
- Siri, W. E. (1961). Body composition from fluids spaces and density: Analyses of methods. In *Techniques for measuring Body Composition*. Washington, DC, USA: National Academy of Science and Natural Resource Council.

- Tokubuchi, I., Tajiri, Y., Iwata, S., Hara, K., Wada, N., Hashinaga, T., ... Yamada, K. (2017). Beneficial effects of metformin on energy metabolism and visceral fat volume through a possible mechanism of fatty acid oxidation in human subjects and rats. *PLoS One*, 12(2), e0171293. doi:10.1371/journal.pone.0171293
- Vincent, S., Berthon, P., Zouhal, H., et al. (2004). Plasma glucose, insulin and catecholamine responses to a Wingate test in physically active women and men. *European Journal of Applied Physiology*, 91(1), 15–21. doi:10.1007/s00421-003-0957-5
- Vytla, V. S., & Ochs, R. S. (2013). Metformin increases mitochondrial energy formation in L6 muscle cell cultures. *Journal of Biological Chemistry*, 288(28), 20369–20377. doi:10.1074/jbc.M113.482646
- Zagatto, A. M., Redkva, P. E., de Poli, R. A. B., González, J. A. M., Brandani, J. Z., Penedo, T., & Bertuzzi, R. C. D. M. (2019). 3-min all-out effort on cycle ergometer is valid to estimate the anaerobic capacity by measurement of blood lactate and excess post-exercise oxygen consumption. *European Journal of Sport Science*, 19(5), 645–652. doi:10.1080/17461391.2018.1546338
- Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., ... Moller, D. E. (2001). Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *Journal of Clinical Investigation*, 108(8), 1167–1174. doi:10.1172/JCI13505
- Zupan, M. F., Arata, A. W., Dawson, L. H., Wile, A. L., Payn, T. L., & Hannon, M. E. (2009). Wingate anaerobic test peak power and anaerobic capacity classifications for men and women intercollegiate athletes. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 23(9), 2598–2604. doi:10.1519/JSC.0b013e3181b1b21b