## Luana Amorim Biondo

# O impacto do tratamento de doxorrubicina nas funções do tecido adiposo branco

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

> São Paulo 2016

### Luana Amorim Biondo

# O impacto do tratamento de doxorrubicina nas funções do tecido adiposo branco

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. José Cesar Rosa Neto

Versão original

São Paulo 2016 DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Biondo, Luana Amorim.

O impacto do tratamento doxorrubicina nas funções do tecido adiposo branco / Luana Amorim Biondo. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Prof. Dr. José Cesar Rosa Neto.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Imunometabolismo.

Versão do título para o inglês: The impact of doxorubicin treatment on the functions of white adipose tissue.

1. Tecido adiposo 2. Quimiterapia 3. Adiposidade 4. Metabolismo I. Rosa Neto, Prof. Dr. José Cesar II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB014/2016

### UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Luana Amorim Biondo.
Título da Dissertaça	<ul> <li>ão: O impacto do tratamento de doxorrubicina nas funções do tecido adiposo branco.</li> </ul>
Orientador(a):	Prof. Dr. José Cesar Rosa Neto.
A Comissão Julga em sessão pút (	adora dos trabalhos de Defesa da <b>Dissertação de Mestrado,</b> olica realizada a///, considerou ) <b>Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)</b>
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

### **CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 05 nas fls. 15 do livro 03 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) Jose Cesar Rosa Neto, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "Efeito da doxorrubicina sobre distúrbios metabólicos no tecido adiposo e o possível papel adjuvante da metformina" do qual participam o(s) aluno(s) Edson Alves de Lima Junior, Luana Amorim Biondo, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em 10.03.2014, com validade de 4 anos.

São Paulo, 12 de março de 2014.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA Coordenador-CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANÁ PAULA LEPIQUE Secretária- CEUA - ICB/USP

#### AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter possibilitado a realização deste trabalho e todos os momentos de aprendizado vividos nesses últimos 2 anos.

Agradeço aos meus pais Mario e Eunice e minha irmã Chaiane por tudo o que fizeram e fazem para que esse sonho, compartilhado por nós três, pudesse ser realizado. Agradeço sempre a Deus por ter me dado essa família especial que me apoia, ensina, dá carinho e muito mais. Sei que vocês são meus companheiros e serão assim para uma vida toda. Vocês são a base da minha vida, portanto essa realização é <u>por vocês</u>.

Agradeço o apoio e carinho da minha família Amorim, tias, tios, primas e primos, por tudo que ensinaram e fizeram por mim. Espero que eu seja um exemplo de orgulho, perseverança e dedicação para vocês, seus filhos e seus netos.

Agradeço ao Anderson por ser meu companheiro fazendo com que cada dia desses últimos 2 anos transcorressem com momentos de alegria, carinho, amor, leveza e outras essências da vida.

Também agradeço aos meus amigos do laboratório de Imunometabolismo, Adriane, Alexandre, Camila, Edson, Helena, Loreana e Lucas por todo aprendizado adquirido com eles, pelos cafés e risadas diárias.

Agradeço as parcerias e colaborações para a realização deste trabalho: Prof.º Fábio Santos Lira, Prof.ª Lila Missae Oyama, Prof.ª Maria Isabel Alonso Vale e suas alunas e a Michele.

Além de um imenso agradecimento ao Prof.º José Cesar Rosa Neto por ter me dado a oportunidade de fazer mestrado, pelos últimos anos de orientação e amizade, e pela contribuição ao meu desenvolvimento acadêmico, assim, permitindo trilhar os caminhos na minha profissão que tanto amo, a Nutrição.

Muito obrigada!

#### RESUMO

Biondo LA. O impacto do tratamento de doxorrubicina nas funções do tecido adiposo branco. [dissertação (Mestrado em Biologia Celular)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

A doxorrubicina (DOX) é um medicamento quimioterápico que gera efeitos tóxicos nas células tumorais e em órgãos saudáveis, como o músculo esquelético e cardíaco, porém faltam estudos que evidenciem os danos metabólicos causados pelo tratamento com DOX em alguns tecidos, inclusive no tecido adiposo (T.A.). A perda de tecido adiposo modifica a secreção de adipocinas promovendo diversos efeitos metabólicos severos e sintomas que resultam na redução de qualidade de vida. O objetivo inicial desse trabalho é investigar os efeitos metabólicos do tratamento com DOX no T.A. branco e secundariamente propor terapia adjuvante que possa atenuar os efeitos deletérios. Procedimento experimental 1: para atender os objetivos iniciais, ratos Wistar foram tratados com cloridrato de DOX (15 mg/kg) i.p. e solução salina em dose única e eutanasiados após 72 horas da aplicação. Os órgãos de interesse foram extraídos sendo realizados: isolamento de adipócitos do T.A. retroperitoneal, experimentos para avaliar lipogênese, lipólise, além de RT-PCR, western blotiing e captação de glicose. Teste T student. \*p<0,05. Cultura de células: 3T3L1 foram mantidas em DMEM até o 11º dia e depois foram incubadas por 24 horas, 96 horas e 12 dias com DOX para análises de captação de glicose, MTT, coloração de Oil red, RT-PCR, western blotting, lipólise e adipogênese. Anova de uma e duas vias \*p<0,05. Procedimento experimental 2: para atender os objetivos secundários, animais C57/BL6 receberam doses fracionadas de cloridrato de DOX i.p. (2,5 mg/kg) a cada 72 horas, durante 2 semanas associado ao uso de metformina (300 mg/kg, via oral diária) (grupo DOXO+MET) ou não (grupo DOXO) e ainda dois grupos controles sem administração de drogas, sendo administrado solução salina i.p. e gavagens com PBS (grupo CTRL) no gual um grupo teve alimentação pareada (grupo PF) ao consumo do grupo DOXO. Após a eutanásia, os órgãos de interesse foram extraídos sendo realizados: isolamento de adipócitos do T.A. subcutâneo, captação de glicose, avaliações histológicas, RT-PCR e western blotiing. Anova de uma via \*p<0,05. Nos adipócitos primários do T.A. retroperitoneal houve redução da captação de glicose, da expressão proteica de AMPK-p e GLUT-4, lipogênese e lipólise diminuídas acompanhados da redução do conteúdo proteico de HSL-p e ATGL. Nas células 3T3L1, a DOX promoveu redução da captação de glicose, prejudicou a adipogênese, reduziu a expressão dos genes relacionados à adipogênese e lipogênese e também reduziu a lipólise. Visto esses resultados, propusemos o uso de doses fracionadas de DOX e metformina (300 mg/Kg) oral diários para avaliar possibilidades de proteção dos efeitos adversos quando associado com metformina (MET). Nesse segundo protocolo, a DOX reduziu a massa adiposa retroperitoneal e epididimal, bem como no T.A. subcutâneo diminuiu a captação de glicose, área, perímetro e diâmetro dos adipócitos do tecido adiposo subcutâneo, além de diminuir a adiponectinemia e leptinemia. Tais efeitos não foram revertidos pelo tratamento com MET. Coletivamente, os resultados demonstram que a DOX gera um alto impacto sobre a homeostasia do tecido adiposo branco, nas funções endócrinas e metabólicas, de maneira que o tratamento com a MET não reverteu esses efeitos deletérios.

**Palavras chaves:** Doxorrubicina. Tecido adiposo. Metformina. Lipogênese. Lipólise. Adipogênese.

#### ABSTRACT

Biondo LA. The impact of doxorubicin treatment on the functions of white adipose tissue. [Master thesis (Tissue Celular Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

Doxorubicin (DOX) is a chemotherapy drug that generates toxic effects on tumor cells and healthy organs such as skeletal and cardiac muscle, but there are few studies that demonstrate the metabolic damage caused by treatment with DOX in some tissues, including adipose tissue (AT). The loss of AT alters the adipokine secretion promoting many severe metabolic effects and symptoms that result in reduced quality of life. The initial aim of this study is to investigate the metabolic effects of treatment with DOX at AT and secondarily, we propose adjuvant therapy that can mitigate the deleterious effects. Experimental Procedure 1: To answer the initial objectives, Wistar rats were treated with DOX hydrochloride (15 mg/kg) ip saline, a single dose, and euthanized after 72 hours of application. The organs of interest were extracted being performed: Isolation of adipocytes from retroperitoneal AT, experiments to evaluate lipogenesis, lipolysis, and RT-PCR, western and blotiing glucose uptake. Test T student. \* p <0.05. Cell culture: 3T3L1 were maintained in DMEM until the 11th day and then were incubated for 24 hours, 96 hours and 12 days with DOX for glucose uptake analysis, MTT, Oil Red, RT-PCR, western blotting, lipolysis and adipogenesis. Anova one and two-way \*p <0.05. Experimental procedure 2: C57/BL6 animals received fractionated doses of DOX hydrochloride (2.5 mg/kg) ip every 72 hours for 2 weeks associated with the use of metformin (300 mg/kg oral daily) (DOXO + MET group) or not (DOXO group) as well as two control groups without administration drugs being administered saline ip and PBS orally (CTRL group) in which one group had pair feeding (PF group) consumption of DOXO group. After euthanasia, the organs of interest were extracted under way: isolation of adipocytes from subcutaneous AT, glucose uptake, histological evaluations, RT-PCR and western blotiing. One way ANOVA \* p <0.05. In the primary retroperitoneal adjpocytes was reduced glucose uptake and protein expression of p-AMPK and GLUT4, lipogenesis and lipolysis decreased accompanied by reduction of the protein content of HSL-p and ATGL. In 3T3L1 cells, DOX promoted reduction in glucose uptake, impaired adipogenesis, reduced the expression of genes related to adipogenesis and lipogenesis and lipolysis also reduced. Seen these results, we proposed the use of fractionated doses of DOX and metformin (300mg/kg) oral daily to evaluate protection possibilities of adverse effects associated with metformin (MET). In the second protocol, the DOX reduced fat mass retroperitoneal and epididymal, decreased glucose uptake, area, perimeter and diameter of adipocytes from subcutaneous AT and reduce the adiponectin and leptin. These effects were not reversed by treatment with MET. Collectively, the results demonstrate that DOX generates a high impact on the homeostasis of the white adipose tissue, endocrine and metabolic functions. The treatment with MET did not reverse these deleterious effects.

**Keywords:** Doxorubicin. Adipose tissue. Metformin. Lipogenesis. Lipolysis. Adipogenesis.

#### LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência dos primers utilizados do RT- PCR	
Tabela 2 - Sequência dos primers utilizados do RT- PCR	57

#### LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vias de ação da doxorrubicina	.18
Figura 2 - Biodistribuição da doxorrubicina	.19
Figura 3 - Relação do tecido adiposo com outros tecidos	.21
Figura 4 - Diferenciação dos adipócitos e os fatores de transcrição representados	
cronologicamente.	.24
Figura 5 - Representação esquemática das vias lipolíticas e lipogênicas	.26
Figura 6 - Os possíveis efeitos da associação da doxorrubicina sobre as vias de	
captação de glicose, adipogênese e lipólise	.33
Figura 7 - Desenho do protocolo experimental 1	.35
Figura 8 - Viabilidade celular depois de 72 (A) e 96 (B) horas de incubação com	
doxorrubicina de células 3T3L1. Tamanho dos adipócitos (C) extraídos do TARP	.41
Figura 9 - Captação de glicose (A) em adipócitos extraídos do TARP de ratos e em células 3T3L1 (B e C). Expressão proteica de AMPK 172-treonina fosforilada e conteúdo total de GLUT4 e FABP4 do TARP de ratos (D). Conteúdo total de	
AMPK172, GLUT4 e GAPDH de células 3T3L1 (E)	.42
Figura 10 - Concentração de adiponectina no soro (A), no TARP (B) de ratos Wistar	сe
no meio de cultura (C) de células 3T3L1	.43
Figura 11 - Acidos graxos incorporados em triacilglicerol (TAG) nos adipócitos	
extraídos do TARP	.43
Figura 12 - Expressão gênica de enzimas lipogênicas FAS (A) e ACC (B) em células 3T3L1	; .44
Figura 13 - Células 3T3L1 coradas com oil red	.44
Figura 14 - Expressão gênica dos fatores adipogênicos PPAR-γ (A), CEBP-α (B) e	
SREBP1c em células 3T3L1	.45
Figura 15 - Glicerol liberado no ensaio de lipólise em adipócitos isolados do TARP (A	۹).
Concentração de glicerol (B) e lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultura de	
células 3T3L1 (C). Expressão proteica de HSL fosforilada em ser-565 e ser-660, AT	GL
e GAPDH (D) das proteínas extraídas do TARP de ratos	.46
Figura 16 - Desenho do protocolo experimental 2	.53
Figura 17 - Peso corporal (A) e consumo alimentar (B)	.59
Figura 18 - Peso do sóleo (A), gastrocnêmio (B), fígado (C), tecido adiposos (t.a.)	
marrom (D), t.a. epididimal (E), t. a. retroperitoneal (F), t. a mesentérico (G) e t.a.	
subcutâneo (H):	.60
Figura 19 - Dosagem de glicose (A), lactato enzimático (B), triacilgicerol (C), LPS	
(endotoxemia) (D), ácidos graxos livres (E) e adiponectinemia (F)	61
Figura 20 - Curva do teste de tolerância à insulina (A) e constante de decaimento-	
KITT (B)	62
Figura 21 - Teste de tolerância ao piruvato (A) e constante de decaimento (B)	63
Figura 22 - Captação de 2-DG glicose em adipócitos extraídos do tecido adiposo	
subcutáneo basal (A) e com estimulo de insulina (100nMol) (B)	.63
Figura 23 - Histologia (coloração com hematoxilina e eosina) do tecido adiposo	
subcutaneo com avaliação da area (B), diâmetro (C) e perimetro (D)	.64
Figura 24 - Dosagem de adiponectina no tecido adiposo subcutâneo (A), adiponectir	na a-
no soro (B) e leptina no soro (C).	.65
Figura 25 - Concentração de MCP-1(A), interferon-γ (B), IL-4 (C), IL-8(D), IL-12(E) e	-
no tecido adiposo subcutâneo	.66

Figura 26 - Expressão gênica de FAS (A), ACC (B), SREBP (C), C/EBP (D) e caspase
3 (E)67
Figura 27 - Expressão proteica de adiponectina, AKT total, GAPDH, AMPK fosforilada
(p-AMPK):

#### LISTA DE ABREVIATURAS

- ACL enzima ATP-citrato liase
- ACC acetil-CoA carboxilase
- ADIPOR1 receptor de adiponectina 1
- ADIPOR2 receptor de adiponectina 2
- AMP adenosina monoifosfato
- AMPK proteína quinase ativada por AMP
- AMPK-p proteína quinase ativada por AMP fosforilada
- ATGL lipase de triacilglicerol do adipócito
- ATP adenosina trifosfato
- cDNA DNA complementar
- C/EBP-a proteínas ligantes do amplificador CCAAT alpha
- C/EBP-β proteínas ligantes do amplificador CCAAT beta
- C/EBP-ō proteínas ligantes do amplificador CCAAT delta
- ChREBP proteína de ligação ao elemento responsivo aos carboidratos
- CPT-1 carnitina palmitotil transferase-1
- DAG diacilglicerol
- DGAT diacilglicerol aciltransferase
- DMEM- dulbecco's modified eagle medium
- DMSO sulfóxido de dimetil
- ERK quinase regulada por sinal extracelular
- FABP-4 -proteína carreadora de ácidos graxos 4
- FAS ácido graxo sintase ADP adenosina difosfato
- GAPDH gliceraldeído trifosfato desidrogenase
- GLUT-1 transportador de glicose 1
- GLUT-4 transportador de glicose 4
- G3P glicerol-3-fosfato
- HSL lipase hormônio sensível
- H&E hematoxilina e eosina
- IBMX 3-isometil-1-butilxantina
- IL-4 interleucina 4
- IL-6 interleucina 6
- IL-8 interleucina 8
- IL-12 interleucina 12
- IMC índice de massa corporal IMC

- LDH lactato desidrogenase
- MAG monoacilglicerol
- MCP-1 proteína quimioatraente de macrófagos 1
- MGAT enzima monoacilglicerol aciltransferase
- MGL lipase de monoacilglicerol
- MTT 3(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium brometo)
- OCT-1 transportador de cátion orgânico 1
- PEPCK fosfenolpiruvato-carboxiquinase
- PEP fosfenolpurivato
- PGC1-α co-ativador um alfa do receptor ativo do PPAR-γ
- PI3K fosfatidil inositol 3-quinase
- PPAR-α receptores ativados de proliferação de peroxissomos alpha
- PPAR-y receptores ativados de proliferação de peroxissomos gamma
- p38MAPK proteína quinase mitógeno-ativada p38
- RLP-19 proteína ribosomal L19
- RT-PCR reação da polimerase em cadeia por transcrição reversa
- SFB soro fetal bovino
- SOD superóxido dismutase
- SPARC proteína secretada de natureza ácida rica em cisteína
- SREBP1c proteína ligadora do elemento regulatório de esteróis 1c
- TAG triacilglicerol
- TARP tecido adiposo retroperitoneal
- TNF-α fator de necrose tumoral alpha
- TGF-β fator de crescimento de transformação beta

### SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Doxorrubicina	16
1.1.1 Indicações e limitação do seu uso	16
1.1.2 Ações celulares da doxorrubicina ou atividade tumoricida:	17
1.1.3 Posologia da doxorrubicina	19
1.2 Tecido Adiposo	20
1.2.1 Adipogênese	23
1.2.2 Lipogênese	24
1.2.3 Lipólise	28
1.3 Doxorrubicina e o tecido adiposo	30
1.4 AMPK e tecido adiposo	31
1.5 A metformina como droga ativadora da AMPK	32
2 OBJETIVOS GERAL 1	34
2.1 Objetivos específicos:	34
3 MATERIAL E MÉTODOS PARA ATENDER OBJETIVO GERAL 1	35
3.1 Animais	35
3.2 Protocolo experimental	35
3.3 Ingestão alimentar e ganho de peso	35
3.4 Isolamento e mensuramento do tamanho dos adipócitos	35
3.5 Cultura de células 3T3L1	36
3.6 Ensaio de MTT	36
3.7 Coloração por o <i>il red</i>	36
3.8 Captação de 2-Deoxy-D-glucose (2-DG)	37
3.9 Análises de proteínas por Western Blotting	37
3.10 Adiponectina no soro e no tecido adiposo retroperitoneal	38
3.11 Expressão gênica por PCR-tempo real	38
3.12 Lipogênese	39
3.13 Lipólise	40
3.14 Análise estatística	40
4 RESULTADOS – PARTE 1	41
5 DISCUSSÃO – PARTE 1	47
6 OBJETIVO GERAL 2:	51
6.1 Objetivos específicos 2:	51

7 MATERIAL E MÉTODOS PARA ATENDER OBJETIVO GERAL 2:	52
7.1 Animais	52
7.2 Protocolo experimental	52
7.3 Composição corporal, ingestão alimentar e ganho de peso	53
7.4 Avaliação de parâmetros plasmáticos	53
7.5 Avaliações da responsividade à insulina:	53
7.6 Isolamento dos adipócitos	54
7.7 Captação de 2-Deoxy-D-glucose (2-DG)	54
7.8 Dosagem de adiponectina e leptina	55
7.9 Parâmetros histológicos	55
7.10 Expressão gênica por PCR-tempo real	56
7.11 Análises de proteínas por Western Blotting	57
7.12 Análise Estatística	58
8 RESULTADOS – PARTE 2	59
9 DISCUSSÃO – PARTE 2	68
10 CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS*	74

#### 1 INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda causa de mortalidade no mundo, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares, no entanto, houve no último século um aumento exponencial no número de mortes devido a essa doença. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, 8,3 milhões de pessoas morrem por ano de câncer, em todo mundo, mostrando o impacto que essa morbidade tem para a nossa sociedade (World Health Organization (WHO), 2015a).

No Brasil, há cerca de 190 mil mortes/ano e 600 mil novos casos a cada ano. O perfil de mortalidade por câncer no Brasil é liderado pelo câncer de mama e de próstata, considerando mulheres e homens respectivamente (WHO, 2015b). Existem mais de 100 tipos de câncer, sendo necessárias diferentes técnicas de diagnóstico e tratamento para cada tipo (WHO, 2015a).

O câncer é definido pelo crescimento desordenado de células, pode ter início com diferentes tipos celulares que determinam a formação de tumores. Como a variabilidade de tipos tumorais, os tratamentos incluem quimioterapias, radioterapias e cirurgias. A quimioterapia é um método que utiliza compostos químicos antineoplásicos, há diversas drogas que podem ser utilizadas inclusive concomitantemente, sendo denominado de poliquimioterapias (Instituto Nacional do Câncer (Inca), 2015a).

Corroborando com isso, a doxorrubicina é um quimioterápico descoberto na década de 60, classificada como um antibiótico e é muito utilizada para o tratamento de diversos tipos de tumores sólidos, dentre eles, os dois mais recorrentes no Brasil (mama e próstata). Apesar de ser um medicamento antigo, é muito eficaz para os tratamentos oncológicos, porém a sua grande toxicidade limita o tratamento dos pacientes. De modo geral, as drogas antineoplásicas não atuam somente nas células tumorais e promovem efeitos colaterais em diversos órgãos, como por exemplo medula óssea, músculo esquelético e enterócitos (Inca, 2015b).

Enquanto grande parte da literatura investiga o efeito da doxorrubicina sobre as células musculares cardíacas, poucos são os estudos que investigam o efeito da doxorrubicina sobre o metabolismo e as alterações moleculares nos adipócitos e no tecido adiposo. Esse tecido tem um papel fundamental para manter a homeostasia energética e endócrina do organismo e a manutenção da sua massa e das suas funções está correlacionada positivamente com a expectativa e qualidade de vida em pacientes com câncer (Bing, 2011).

Apesar de haver um número grande de pesquisadores procurando identificar a origem dessa doença, assim como, investigando novos agentes farmacológicos mais eficazes contra o câncer, a evolução dos nossos conhecimentos sobre essa morbidade ainda é ineficaz. Portanto, a descoberta de co-terapias, que diminuam a toxicidade dessa droga, pode aumentar a qualidade de vida do paciente durante o período de tratamento, assim como a eficácia do tratamento.

#### 1.1 Doxorrubicina

#### 1.1.1 Indicações e limitação do seu uso

A doxorrubicina é um quimioterápico da família das antraciclinas, desenvolvido na década de 60 (Richardson; Johnson, 1997), a partir do preparado de *Streptomyces peucetius var caesuis* (Di Marco et al., 1969). É extremamente indicado e eficaz no tratamento de leucemia, linfomas Hodgkin e non-Hodgkin, câncer de mama, sarcomas, entre outros (Lai et al., 2010), sendo até hoje um dos quimioterápicos mais utilizado na prática clínica. A doxorrubicina também pode ser denominada na literatura como adriamicina.

Para o tratamento do câncer, com frequência são utilizadas estratégias farmacológicas baseadas na intervenção quimioterápica, porém o uso da doxorrubicina é limitado devido à alta cardiotoxicidade causada por esta droga, além de provocar hepatotoxidade (Ayla et al., 2011; Gorselink et al., 2006) e nefrotoxicidade (Singla et al., 2014).

Os efeitos tóxicos das drogas antineoplásicas dependem do tempo de exposição e da concentração plasmática utilizada. A cardiotoxicidade já é amplamente estudada, foi inicialmente descrita em 1974 (Benjamin et al., 1974) e pode gerar inclusive consequências anos após o uso deste quimioterápico (Lipshultz et al., 2013).

Outra limitação do seu uso é o desencadeamento de uma série de efeitos deletérios, como fadiga extrema, anorexia, desconforto muscular (Gorselink et al., 2006), sarcopenia, doenças cardiovasculares e diabetes, que estão entre os sintomas e doenças que mais afligem pacientes oncológicos em tratamento. A resistência à insulina é encontrada em aproximadamente 8 a 18% dos pacientes portadores de câncer, essa diminuição da sensibilidade à insulina em tecidos periféricos permite um aumento na quantidade de substrato energético para ser utilizado pelo tumor (Ko; Chaudhry, 2002).

O efeito da doxorrubicina é muitas vezes devastador capaz de gerar anorexia, vômitos, diarreia, sangramentos incomuns, náuseas, ferimentos na mucosa oral, entre outros sintomas que estão relacionadas com a diminuição na qualidade e expectativa de vida dos pacientes durante o tratamento. Roedores portadores de tumor de mama,

não apresentam perda de peso, até o décimo primeiro dia após a inoculação do tumor, já nos animais tratados com doxorrubicina esta queda é evidenciada a partir do quarto dia (Hajjaji et al., 2012).

#### 1.1.2 Ações celulares da doxorrubicina ou atividade tumoricida:

Muitos são os artigos que vem mostrando, de maneira experimental, e na prática clínica, a eficiência desse medicamento no combate ao câncer (Hadad et al., 2011; Hosono et al., 2010; Landman et al., 2010; Niraula et al., 2012), no entanto, o mecanismo molecular ainda não está totalmente elucidado, apesar de ser um medicamento utilizado há mais de 50 anos.

Parte da sua atividade tumoricida deve-se a sua ação inibindo a enzima Topoisomerase II, assim impedindo a replicação do DNA (Tewey et al., 1984). As topoisomerases são uma família de enzimas essenciais para controle do ciclo celular, estão presentes no núcleo (Topoisomerase I) e mitocondriais (Topoisomerases I, IIα, IIβ, IIIα e IIIβ) (Tomicic; Kaina, 2013). A topoisomerase II é amplamente expressa em células tumorais e por isso é um alvo de diversos agentes antitumorais. A doxorrubicina gera a formação de um complexo de clivagem DOX-TOP2-DNA que pode induzir a quebra da fita dupla de DNA, levando a morte celular (Rochette et al., 2015).

A doxorrubicina também pode causar diretamente a formação de radicais livres levando a um aumento na geração de estresse oxidativo que pode gerar lesão de DNA (Rochette et al., 2015). Além disso, altas concentrações do quimioterápico pode aumentar a afinidade da proteína p53 com o DNA, ativando a cascata de caspases e induzindo a apoptose através da sobrerregulação de Bax (Chang et al., 2011; Fang; Nakamura et al., 2007, Minotti et al, 2004; Rochette et al., 2015).



Os mecanismos propostos podem ser visualizados na figura abaixo:

Figura 1 - Vias de ação da doxorrubicina (Thorn et al., 2010).

Além disso, como a cardiotoxidade já é um efeito amplamente estudado, sabese que a doxorrubicina nos cardiomiócitos pode se ligar ao ferro, gerando uma molécula conjugada com ferro (Fe<sup>2+</sup>) que pode ser reduzida formando ion férrico (Fe<sup>3+</sup>) na presença de glutationa e citocromo P450. Essas reações são reversíveis e geram espécies reativas de oxigênio nas duas direções (Rao, 2013).

Ainda, a doxorrubicina pode formar um radical semiquinona que também é reversível gerando um ciclo capaz de gerar superóxido radical livre. Através da SOD (superóxido dismutase) os radicais livres formam H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que na presença de mais superóxidos leva a formação de radicais hidroxilas. Esses radicais hidroxilas, por sua vez, são altamente reativos com muitas moléculas da célula, gerando danos celulares

como peroxidação lipídica, prejuízos no DNA e oxidação de diversas proteínas (Rao, 2013).

#### 1.1.3 Posologia da doxorrubicina

A doxorrubicina para humanos deve ser administrada intravenosa em infusão rápida. Não deve ser intramuscular devido a toxicidade local e deve ser dissolvida em solução salina (0,9%). A dose mais frequente recomendada com alta eficácia tumoricida e toxicidade baixa é ao redor de 50 a 75 mg/m<sup>2</sup> de superfície corpórea a cada 21 ou 28 dias (Inca, 2015b).

Já que as drogas antineoplásicas atingem as células não-tumorais, o tratamento quimioterápico pode ser aplicado em ciclos periódicos. Dessa forma, as células da medula óssea e da mucosa do trato gastrointestinal, por exemplo, podem recuperar e renovar nesse intervalo sem a aplicação da droga (Inca, 2015b). Apesar disso, evidências sugerem que ainda não há doses consideradas seguras para a doxorrubicina devido ao seu efeito cumulativo, inclusive podendo variar entre os tipos de câncer e gênero (Lipshultz et al., 2013).

Em ratos, a utilização de 15 mg/kg de peso em experimentos gera efeitos cardiotóxicos (Al-Shabanah et al., 2000; Arozal et al., 2014), hepatotóxicos (Zolfagharzadeh e Roshan, 2013) e toxicidade testicular (El-Sheikh et al., 2014).

Estudos que avaliam a biodistribuição da doxorrubicina em animais mostram que há acúmulo da droga em diversos tecidos. A aplicação de 2 mg/kg de peso em animais já promoveu acúmulo em diferentes tecidos no fígado, rins, coração, pulmão e baço (Longmuir et al., 2009), conforme descrito na figura a seguir.

No entanto, os efeitos citotóxicos agudos e crônicos decorrentes do uso da droga em células não tumorais estão relacionados aos mecanismos envolvendo danos ao DNA e produção de espécies reativas de oxigênio (Rao et al., 2013; Rochette et al., 2015).



Figura 2 - Biodistribuição da doxorrubicina (Longmuir et al., 2009)

#### 1.2 Tecido Adiposo

O papel do tecido adiposo é fundamental para a manutenção da homeostasia. No organismo humano, o tecido adiposo pode ser dividido anatomicamente em subcutâneo e visceral, e encontrado também como marrom e branco apresentando diferentes funcionalidades, morfologias e estruturas (Junqueira et al., 2008).

O tecido adiposo branco tem um papel central no balanço energético por ser um importante depósito de substratos para geração de ATP, além de possuir atividade endócrina através da secreção de peptídeos bioativos que promovem diversas ações fisiológicas e patológicas (Li et al., 2010).

Em roedores, o tecido adiposo marrom atua principalmente na termogênese e na dissipação de energia na forma de calor durante a termogênese que pode ser gerada pelo frio e pela dieta (Kwon; Pessin, 2013; Queiroz et al., 2009).

Sua importância como órgão endócrino está bem estabelecida pela sua alta capacidade pleiotrópica, de remodelamento e de produção de adipocinas (Murdolo et al., 2013, Rosen; Spiegelman, 2006). Em humanos, os tecidos adiposos brancos viscerais e subcutâneos secretam mais de 20 hormônios e uma ampla gama de adipocinas pró e anti-inflamatórias para modular a inflamação. A desregulação desses processos inflamatórios e endócrinos tem sido relacionada com doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2 e obesidade (Kwon; Pessin, 2013). Essas adipocinas em sua maioria são produzidas pelo tecido adiposo e promovem numerosas funções em diferentes órgãos e tecidos, conforme pode ser visualizado na figura abaixo:



Figura 3 - Relação do tecido adiposo com outros tecidos. (Rosen; Spielgman, 2014)

Entre as principais secreções do tecido adiposo que regulam o comportamento alimentar, a sensibilidade à insulina e a inflamação são a leptina, adiponectina, fator de necrose tumoral alpha (TNF-α), interleucina 6 (IL-6), resistina, visfatina, omentina, fator de crescimento semelhante à insulina, proteína quimioatraente de macrófagos 1 (MCP-1), entre outros. Além disso, a leptina e a adiponectina são adipocinas fortemente associadas com o balanço energético, metabolismo lipídico e de glicose (Queiroz et al., 2009).

A adiponectina é uma proteína de 30 kDa envolvida na regulação do metabolismo da glicose e dos lipídeos, possui propriedades de sensibilização à insulina, anti-inflamatórias, anti-aterogênicas, esses efeitos são protetores contra doenças cardiovasculares e metabólicas. A concentração plasmática de adiponectina é correlacionada negativamente com a massa do tecido adiposo e o índice de massa corporal (IMC) (Smitka; Maresová et al., 2015).

É produzida principalmente pelo tecido adiposo, sintetizada em monômeros que podem formar trímeros (baixo peso molecular), este por sua vez, oligomerizam formando hexâmeros (médio peso molecular) e formas de alto peso molecular - 12 a 18 monômeros (Shehzad et al., 2012).

Suas ações ocorrem pela ligação com seus receptores ADIPOR1, ADIPOR2 e T-caderina. Através da APPL1, a adiponectina promove a ativação da AMPK e de outras moléculas sinalizadoras como a proteína quinase mitógeno-ativada p38 (p38MAPK), proteína associada-Ras Rab5, receptores ativados de proliferação de peroxissomos *alpha* (PPAR-α), fosfatidil inositol 3-quinase (PI3K) e proteína ligadora do elemento regulatório de esteróis 1c (SREBP1c). Ao ativar essas vias, promove respostas como aumento da oxidação de ácidos graxos, citoproteção e captação de glicose (Shehzad et al., 2012).

A leptina é a maior sinalizadora do estado nutricional envolvida na modulação do consumo alimentar e do gasto energético. É um polipeptídeo de 16 kDa sintetizado predominantemente pelo tecido adiposo, mas também pode ser produzido em outros tecidos como placenta, medula óssea e tecidos linfóides. É secretada seguindo o ritmo circadiano, atingindo o pico mais alto durante a noite e o pico mais baixo no início da manhã. Possui 6 isoformas de receptores sendo ObRa, ObRb, ObRc, ObRd, ObRe e ObRf (Szewczyk-Golec et al., 2014).

Durante o jejum, a secreção de leptina é reduzida, assim sinalizando o aumento do consumo alimentar e redução do gasto energético para que se mantenha a homeostase energética. No hipotálamo, através do receptor ObRb ocorre a regulação da síntese de neuropeptídeos que realizam este controle. Portanto, em resposta à redução da concentração de leptina, há o aumento da secreção de neuropeptídios orexígenos (por exemplo, neuropeptídeo Y e proteína agout-relacionado – NPY e AgRP, respectivamente) e redução de neuropeptídeos anorexígenos (por exemplo pró-opiomelanocortina e transcrito regulado pela cocaína e anfetamina – respectivos POMC e CART) no núcleo arqueado, e o subsequente aumento da sensação de fome (Mantzoros et al., 2011).

A secreção de leptina está relacionada diretamente ao IMC e massa do tecido adiposo (Szewczyk-Golec et al., 2014). No tecido adiposo, a leptina promove menor deposição lipídica e a dissipação de energia. Inclusive, pode aumentar a oxidação lipídica e de glicose, bem como a lipólise. A administração de leptina *ex vivo* em humanos, tanto no tecido adiposo subcutâneo e omental, promoveu a ativação de

STAT3 e AMPK (Moon et al., 2011), sugerindo evidencias favoráveis ao metabolismo do tecido adiposo.

#### 1.2.1 Adipogênese

As células tronco embrionárias mesenquimais multipotentes dão origem aos adipócitos, em condições apropriadas. As células tronco residentes no estroma do tecido adiposo permitem também a renovação contínua das células precursoras (Gustafson; Smith et al., 2015). A adipogênese pode ser definida por um estágio inicial denominado determinação e outro de diferenciação terminal (Queiroz et al., 2009).

A determinação é o processo na qual as células mesenquimais, tornam-se préadipócitos, ou seja, já há um comprometimento com a linhagem de adipócitos e também há perda na habilidade em originar outros tipos celulares. Na segunda fase, a diferenciação é caracterizada por adipócitos maduros que acumulam gotículas lipídicas e adquirem a capacidade de responder a hormônios como, por exemplo, a insulina (Li et al., 2010; Queiroz et al., 2009).

Para que ocorra a diferenciação, diversos fatores de transcrição induzem a expressão e o silenciamento de mais de 2000 genes envolvidos nesse processo. Na literatura, a diferenciação celular tem sido bem estudada em células de linhagem 3T3L1 (Li et al., 2010). Além disso, culturas da linhagem de células 3T3L1 tem características aproximadas do tecido adiposo humano.

Os pré-adipócitos 3T3L1 podem ser diferenciados quando tratados com coquetel adipogênico, que contém insulina (ativa receptores de IGF-1), dexametasona (ativa receptores glicocorticoides) e metilisobutixantina (inibidor de AMPc fosfodiesterases). Após a adição do coquetel, dentro de 24 horas já inicia um acúmulo de C/EBP- $\beta$  e - $\delta$  (proteínas ligantes do amplificador *CCAAT beta* e *delta*) e as células reiniciam o ciclo celular. Por sua vez, esses fatores induzem a expressão do PPAR- $\gamma$  e C/EBP- $\alpha$ , iniciando então a diferenciação terminal. O SREBP1c é um importante regulador do PGC1- $\alpha$  (co-ativador um alfa do receptor ativo do PPAR- $\gamma$ ) que permite a manutenção da homeostase energética dos adipócitos e também pode ativar a expressão gênica de fatores dependente de insulina (Li et al., 2010).



Figura 4 - Diferenciação dos adipócitos e os fatores de transcrição representados cronologicamente (Queiroz et al., 2009).

Conforme podemos verificar na figura 4 acima, durante a adipogênese, o C/EBP- $\beta$  e - $\delta$  precedem a indução do PPAR- $\gamma$  que é o maior regulador da diferenciação adipocitária e também é necessário para a transcrição de genes envolvidos nas diversas funções do adipócito como, por exemplo, GLUT-4 (transportador de glicose-4), FABP-4 (proteína carreadora de ácidos graxos 4), adiponectina, leptina, entre outros. Animais mutados que não expressão PPAR- $\gamma$  apresentam severas alterações como a lipodistrofia e hiperlipidemias (Jones et al., 2005; Koutnikova et al., 2003).

Esses fatores de transcrição se autorregulam para induzir à sua própria expressão e também de outros marcadores envolvidos na geração e manutenção do adipócito. A lipogênese, lipólise, transporte de glicose dependente de insulina e secreção de adipocinas (Ntambi; Kim, 2000; Queiroz et al., 2009) são os processos relacionados com a regulação do metabolismo lipídico.

#### 1.2.2 Lipogênese

A lipogênese é um processo anabólico fundamental para manter a homeostase energética caracterizado pela síntese de triacilglicerol (TAG). O TAG é forma de estocagem de lipídeos intracelulares que são mantidos em uma região hidrofóbica da célula formando gotículas lipídicas (Saponaro et al., 2015). A produção e o acúmulo de TAG nas células são estimulados quando a ingestão calórica é maior do que a utilização dessas fontes de energia, ou seja, o balanço energético permanece positivo. Dessa forma, as gotículas lipídicas podem formar gotículas lipídicas maiores ou únicas (Jin et al., 2014; Saponaro et al., 2015).

A lipogênese ocorre principalmente no tecido adiposo, porém também ocorre no fígado, pâncreas, tecidos musculares esquelético e cardíaco. Os adipócitos são as únicas células capazes de estocar lipídeos sem que haja prejuízos a sua integridade funcional (Fonseca-alaniz et al., 2006; Saponaro et al., 2015).

Para ocorrer a síntese de TAG, é necessária a reação de 1 molécula de glicerol-3-fosfato (G3P) com 3 cadeias de ácidos graxos (Saponaro et al., 2015).

#### • Síntese de glicerol-3-fosfato (G3P):

O G3P pode ser obtido através do glicerol circulante, pelas vias de síntese *de novo* e glicólise. A glicose é o maior recurso de carbonos para a formação de G3P no tecido adiposo branco e marrom; com o estimulo de insulina a glicose é captada e há a formação de diidroxicetona-3-fosfato que, através da G3P-desidrogenase, forma o G3P (Nye et al., 2008; Saponaro et al., 2015).

O glicerol plasmático pode ser fosforilado pela enzima glicerol-quinase, porém no tecido adiposo sua atividade é considerada baixa, então o principal recurso para a formação do G3P neste órgão é a via glicolítica (Saponaro et al., 2015).

Outro recurso de G3P é pela síntese *de novo* que é denominada de gliceroneogênese, essa via utiliza como substratos o piruvato, lactato e/ou aminoácidos. As etapas da gliceroneogênese podem ser visualizadas na figura 4. A enzima chave desse processo é a fosfenolpiruvato-carboxiquinase (PEPCK) que catalisa a decarboxilação do oxalacetato para formar o fosfenolpurivato (PEP) (Nye et al., 2008). Na restrição alimentar (jejum) a atividade da PEPCK geralmente é aumentada e em animais tratados com dieta de cafeteria (hipercalórica) tem sua atividade reduzida no tecido adiposo branco (Chaves et al., 2006; Nye et al., 2008). As vias podem ser visualizadas na figura 5.

#### • Síntese dos ácidos graxos:

Para a formação do TAG, os ácidos graxos podem ser obtidos pela dieta, lipólise periférica e lipogênese *de novo*. A lipogênese *de novo* é definida pela síntese de ácidos graxos a partir de outros substratos que não sejam lipídicos (Saponaro et al., 2015).



Figura 5 - Representação das vias lipolíticas e lipogênicas (Saponaro et al., 2015)

Para que ocorra a formação do ácido graxo, durante o ciclo do ácido cítrico ocorre a formação subsequente de acetil-CoA, malonil-CoA e palmitato. As enzimas chaves que regulam esses processos e as suas principais funções são:

- Conversão do citrato a acetil-Coa é feita pela enzima ATP-citrato liase (ACL);

- Carboxilação do acetil-Coa em malonil-CoA pela Acetil-CoA carboxilase (ACC);

- Formação de palmitato a partir do malonil-CoA pela ácido graxo sintase (FAS) (Ammer et al., 2014).

O palmitato pode ser alongado e esterificado formando outros ácidos graxos como, por exemplo, o ácido esteárico por alongamento do ácido palmítico e ácido palmitoleico pela desaturação do ácido palmítico (Saponaro et al., 2015).

Alguns fatores de transcrição regulam as enzimas chaves da lipogênese, a proteína de ligação do elemento de regulação do esterol-1c (SREBP1c) e a proteína de ligação do elemento de resposta sensível a carboidratos (ChREBP) tem um

importante papel na regulação das enzimas FAS, ACC e ACL (Ammer et al., 2014; Saponaro et al., 2015).

Em resposta a insulina e a subsequente captação da glicose, modificações pós-translacionais ativam o ChREBP que será importado para o núcleo se ligando em regiões promotoras de enzimas lipogênicas e mediar efeitos metabólicos benéficos como a melhora da sensibilidade à insulina (Ammer et al., 2014; Saponaro et al., 2015).

Outro efeito mediado pela insulina, é a ativação do SREBP-1c que é clivado e seus fragmentos S1P e S2P são translocados do retículo plasmático para o complexo de golgi e depois chega ao núcleo. Dessa forma, pode estimular a transcrição de GLUT-4 e muitos genes lipogênicos como ACC, FAS, ACL entre outros (Czeh et al., 2013). Ratos que superexpressam SREBP1c no tecido adiposo branco não apresentam maturação dos adipócitos, porém possuem a lipogênese elevada, diabetes e estatose hepática (Horton et al., 2003; Shimomura et al., 1998).

#### • Formação do triacilglicerol (TAG):

Há duas principais vias de biossíntese do TAG. No processo de esterificação do TAG primeiramente é necessário a formação de Acil-CoA a partir do ácido graxo livre (palmitato) (Jin et al., 2014; Saponaro et al., 2015).

Inicialmente, o Acil-CoA ao se ligar ao G3P formará um monoacilglicerol (MAG) que por sua vez é catalisado pela enzima monoacilglicerol aciltransferase (MGAT) produzindo então o diacilglicerol (DAG). Essa via pode ser denominada de via do monoacilglicerol e é ativa no tecido adiposo, sendo fundamental para formar estoques energéticos. Porém essa via também predomina nos enterócitos, após a digestão dos lipídeos provenientes da alimentação (Jin et al., 2014; Saponaro et al., 2015).

A outra via é através da G3P, que ocorre na maioria dos tecidos. O G3P é acilado formando o ácido lisofosfatídico seguido pela acilação e desfosforilação produzindo o DAG (Jin et al., 2014; Saponaro et al., 2015).

Ambas as vias convergem para a formação de DAG, substrato necessário para que a diacilglicerol aciltransferase (DGAT) catalise a formação de TAG. A isoforma mais expressa no tecido adiposo é a DGAT2 (Jin et al., 2014; Saponaro et al., 2015).

#### 1.2.3 Lipólise

A lipólise consiste na hidrólise do TAG em ácidos graxos e glicerol, é uma via catabólica na qual os substratos metabólicos são mobilizados a fim de atender uma demanda energética nos órgãos periféricos (Zechner et al., 2009).

O tecido adiposo subcutâneo é o que mais contribui para a manutenção da concentração plasmática de ácidos graxos livres, sendo que o tecido adiposo visceral contribui minimamente para essa concentração sistêmica (Saponaro et al., 2015).

As principais lipases envolvidas neste processo e as suas funções principais são:

- Lipase de triacilglicerol do adipócito (ATGL): hidrolisar o TAG em DAG e ácido graxo livre;

É a enzima responsável majoritariamente pela hidrólise inicial e está presente em diferentes tipos celulares e não somente nos adipócitos; está localizada nas gotículas lipídicas e no citosol. Pode ser ativada por glicorcorticóides, e agonistas de receptores ativados por proliferadores de peroxissomo (PPARs) gerando ações preferencialmente no tecido adiposo. O estado nutricional também altera a expressão gênica de ATGL, na restrição alimentar (jejum) há o aumento e a realimentação reduz sua expressão (Saponaro et al., 2015; Zechner et al., 2009).

- Lipase hormônio sensível (HSL): hidrolisar o DAG em MAG e ácido graxo livre;

A HSL é capaz de hidrolisar inclusive o TAG e MAG em menores proporções quando comparado à utilização do TAG como substrato, além disso pode hidrolisar ésteres de colesterol e outros lipídeos. Pode ser ativada principalmente por estímulos beta-adrenérgicos, que promove a fosforilação da PKA (proteína quinase dependente de AMPc) resultando na translocação da HSL para a gotícula lipídica e dessa forma promove a hidrólise (Saponaro et al., 2015; Zechner et al., 2009). Animais deficientes em HSL apresentam um acúmulo de DAG no tecido adiposo, músculo e testículos, além de não serem fertéis devido a incapacidade de maturação dos espermatozoides (Haemmerle et al., 2002).

- Lipase de monoacilglicerol (MGL): hidrolisar o MAG em ácido graxo livre e glicerol;

Essa enzima é expressa ubiquitinada no citoplasma, na membrana plasmática e na gotícula lipídica; é abundante em muitos tecidos por isso é sugerido que essa fase não seja extensivamente regulada (Saponaro et al., 2015; Zechner et al., 2009).

Os substratos gerados pela lipólise como o DAG, MAG, ácido graxo livre, glicerol, são utilizados como fontes para produção de adenosina trifosfato (ATP) e também podem exercer funções fisiológicas importantes como precursores de outras classes lipídicas, como por exemplo, leucotrienos, prostaglandinas, membranas lipídicas e ceramidas. O glicerol liberado poderá ser utilizado nas vias glicolíticas e na gliconeogênese (Zechner et al., 2009).

Para promover a homeostase energética e então as células gerem energia na forma de ATP, os ácidos graxos gerados pela lipólise podem ser oxidados pela beta-oxidação ocorre nas mitocôndrias (Saponaro et al., 2015).

Primeiramente, os ácidos graxos livres são captados através das FAT/CD36 e transportados no citosol pela FABP-4 onde são clivados a Acil-Coa graxo. Em sequência, a carnitina palmitotil transferase-1 (CPT-1) transfere o grupamento Acil proveniente de uma cadeia longa de Acil-CoA graxo à carnitina formando Acil-carnitinas. A carnitina acil-transferase transporta essa molécula para o interior da mitocôndria, onde a CPT-2 reconverte em Acil-CoA e carnitina. Por sua vez, o Acil-CoA é degradado a moléculas de acetil-CoA pelo ciclo da beta-oxidação. Por fim, o acetil-Coa então é degradado pelo ciclo de Krebs para produzir ATP (Saponaro et al., 2015).

Ainda, o Acetil-CoA produzido na beta-oxidação também pode ser convertido em corpos cetônicos (cetona, acetoacetato e betahidróxibutirato) que são utilizados como recursos energéticos por outros tecidos como cérebro, músculo esquelético e coração (Saponaro et al., 2015).

A glicose, hormônios como a insulina e glucagon, catecolaminas, restrição alimentar (jejum), estresse entre outros reguladores controlam a lipólise e a lipogênese. Dessa forma, a disponibilidade de substratos é modulada com objetivo de manter o equilíbrio entre as vias catabólicas e anabólicas, contribuindo para a homeostase metabólica (Saponaro et al., 2015).

#### 1.3 Doxorrubicina e o tecido adiposo

Poucos são os estudos que investigam o efeito da doxorrubicina sobre o metabolismo e as alterações moleculares nos adipócitos e no tecido adiposo que é o órgão que tem um importante papel para a manutenção da homeostasia energética e da qualidade de vida.

Enquanto grande parte da literatura investiga os efeitos dessa droga sobre os cardiomiócitos, já se sabe que algumas citocinas produzidas pelo tecido adiposo, como a omentina e a adiponectina, podem proteger os cardiomiócitos da ação toxica da doxorrubicina (Kazama et al., 2015; Maruyana et al., 2011).

O quimioterápico, apesar da eficácia como antitumoral, também é toxico para o sistema reprodutivo. Tirupathi Pichiah et al., (2012) propuseram que distúrbios na espermatogênese decorrente do uso de doxorrubicina está diretamente relacionada com a perda da massa adiposa epididimal nos animais.

Classicamente a doxorrubicina promove uma severa perda de peso em tratamentos de animais saudáveis (Panjrath et al., 2007). Além disso, pode gerar anorexia e outros efeitos deletérios em órgãos com relevante importância metabólica como a perda de massa muscular e de massa gorda. Sendo essas características relacionadas com a síndrome da caquexia associada ao câncer promovendo redução na qualidade e expectativa de vida dos pacientes em tratamento (Gorselink et al., 2006 Hajjaji et al., 2012).

Dados não publicados do nosso grupo mostram que nos animais tratados com o quimioterápico possuem uma diminuição na sensibilidade à insulina e aumento da concentração plasmática de ácidos graxos livres não-esterificados. Entretanto, esses animais apresentam a expressão proteica prejudicada de proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e GLUT-4 no tecido muscular esquelético.

Arunachalam et al., (2012) mostrou que pré-adipócitos 3T3L1 tratados com doxorrubicina inibem a adipogênese de maneira dose e tempo dependente. A diminuição da adipogênese se deu pela inibição de dois fatores de transcrição associados a esse processo, PPAR-γ e C/EBP-β (Arunachalam et al., 2012), sendo este o único estudo na literatura, até o momento, em que foram realizados experimentos com o uso do medicamento em células adiposas.

Liao et al., 2007 verificaram que supressão de PPAR-γ em células 3T3L1 reduziu a captação de glicose dependente de insulina pelo GLUT-4. Mutações no DNA ou nos sítios de ligações do PPAR-γ provocam uma profunda resistência à insulina em animais e humanos (Agostini et al., 2006). Portanto, foi sugerido que essa pode ser uma das vias que gera a diminuição da captação de glicose no tecido adiposo de animais tratados com doxorrubicina (Arunachalam et al., 2013).

Posto isso, o estudo sobre o metabolismo do tecido adiposo na terapia contra o câncer torna-se de extrema relevância. Portanto o principal objetivo foi investigar os efeitos metabólicos da doxorrubicina sobre o tecido adiposo branco *in vivo* e *in vitro* buscando evidências na lipólise, lipogênese, captação de glicose e adipogênese.

#### 1.4 AMPK e tecido adiposo

Estudos prévios sugerem que parte do caos metabólico gerado pelo tratamento agudo com doxorrubicina, no qual houve o prejuízo do metabolismo lipídico e de carboidrato e o desacoplamento mitocondrial, são em parte causados pela grande inibição na forma ativa da AMPK.

A AMPK é uma enzima heterotrímera ativada pela fosforilação em treonina-172 na subunidade catalítica alfa. É o principal sensor dos níveis energéticos celulares (Steinberg; Kemp, 2009). O fator crucial para a estimulação da AMPK é a razão AMP/ATP e ADP/ATP (Oakhill et al., 2011). A razão ADP/ATP permanece em equilíbrio em situações em que a célula encontra-se em equilíbrio dinâmico. Porém, em situações de estresse celular que aumentam o consumo de ATP, como por exemplo, a ativação de proteínas motoras durante a contração que levam a ativação da AMPK (Hardie et al., 2012).

A AMPK no tecido adiposo exerce papel sobre os principais processos metabólicos, como a adipogênese, lipólise, lipogênese, oxidação de gordura e na captação de glicose.

Por ser uma enzima capaz de ser modulada pelo estresse energético a sua ativação no adipócito suprime a síntese de ácidos graxos e TAG (Daval et al., 2006) pela inibição da atividade e da expressão gênica da enzima chave do processo lipogênico, a ACC carboxilase (Orci et al., 2004; Sim; Hardie, 1988).

Além disso, AMPK é uma enzima inibitória da lipólise estimulada via receptores beta adrenérgicos, inibindo a ativação da HSL, fosforila essa enzima no resíduo serina 565 (Daval et al., 2005), sugerindo inclusive que a AMPK tem uma importante função no processo de retroalimentação negativa. Quando o organismo necessita de um aumento na produção de ATP, os ácidos graxos do tecido adiposo são mobilizados para servirem como fonte energética, porém a ativação da AMPK impede que esse efeito seja exagerado evitando a lipotoxicidade (Arunachalam et al., 2013; Daval et al., 2006).

Ainda, AMPK também controla a oxidação de ácidos graxos, aumentando a expressão e a atividade da CPT-1, enzima responsável pelo transporte dos ácidos graxos do citosol para a mitocôndria, onde serão oxidados; além de atuar aumentando a biogênese mitocondrial por estimular o PGC-1α (Rossmeisl et al., 2002). Outra função importante para essa enzima é regular a captação de glicose no adipócito, já que a AMPK é capaz de ativar a translocação de GLUT-4 independente da insulina (Frøsig et al., 2010).

O nosso grupo observou, 72 horas após a administração intraperitoneal de doxorrubicina, houve hiperglicemia e hiperinsulinemia nesses animais. Portanto, mecanismos que evitem esses efeitos e promovam a recuperação da homeostase dos adipócitos podem ser essenciais na preservação da qualidade e expectativa de vida dos indivíduos tratados com esse quimioterápico (Lima et al., 2016).

#### 1.5 A metformina como droga ativadora da AMPK

A metformina é um medicamento amplamente utilizado no tratamento de diabetes tipo 2 no mundo. É formada por um composto de dimetilbiguanidina, derivada esta da biguanidina, que já na década de 20 foi usada com sucesso para diminuir a glicemia em modelo animal (Hesse; Taubmann, 1929) e passou a ser utilizada realmente na prática clínica a partir da década de 60 (Hardie et al., 2012).

Os mecanismos moleculares envolvidos na ação da metformina envolvem a ativação da AMPK, que por sua vez pode conduzir a efeitos farmacológicos diferentes, incluindo inibição da síntese da glicose e lipídios (Foretz, 2011; Viollet et al., 2012). Os mecanismos de ativação metformina através da AMPK ainda não estão bem elucidados, mas estudos indicam que a metformina atravessa a membrana plasmática por difusão passiva e/ou se liga ao OCT-1 (transportador de cátion orgânico 1),

estimulando a LKB-1/STK 11 (Serina/threonina quinase 11) e ativando downstream a AMPK (Shu et al., 2007).

Além desse mecanismo de ativação, a metformina é capaz de inibir o complexo 1 da cadeia respiratória, diminuindo assim a síntese de ATP, promovendo aumento da taxa AMP/ATP e ADP/ATP e a subsequente ativação da AMPK (Hawley et al., 2010).

A utilização da metformina também foi eficiente na diminuição da cardiotoxicidade, por diminuir o estresse oxidativo em cardiomiócitos pré-tratados com metformina e posteriormente incubados com doxorrubicina, diminuindo a morte celular. Além disso, a inibição do ADIPOR1 e ADIPOR2 reduziu a ativação da via da AMPK pela metformina, prejudicando o efeito protetor dessa droga sobre a morte celular dos cardiomiócitos (Asensio-Lopes et al., 2011).

Muitos são os artigos que vem mostrando, de maneira experimental e na prática clínica, a eficiência desse medicamento no combate ao câncer (Hadad et al., 2011; Hosono et al., 2010; Landman et al., 2010; Niraula et al., 2012). Sendo assim, o estudo da utilização da metformina como co-adjuvante na terapia contra o câncer torna-se de extrema relevância.

Portanto o objetivo secundário do estudo é ampliar o conhecimento a respeito do efeito metabólico da doxorrubicina sobre o tecido adiposo e a possibilidade de associação da metformina durante o tratamento da doxorrubicina, com o intuito de proteção dos efeitos adversos desse quimioterápico sobre as células adiposas (figura 6).



Figura 6 - Os possíveis efeitos da associação da doxorrubicina sobre as vias de captação de glicose, adipogênese e lipólise. •••••

inibicão

ativacão

#### **2 OBJETIVOS GERAL 1**

Verificar os efeitos metabólicos da doxorrubicina sobre o tecido adiposo branco.

#### 2.1 Objetivos específicos:

Realizar curva dose resposta avaliando a toxicidade e a morte celular em diferentes doses de doxorrubicina em células 3T3L1;

Caracterizar inicialmente efeitos da doxorrubicina no tecido adiposo retroperitoneal de ratos tratados com aplicação única de doxorrubicina de 15 mg/kg de peso;

Analisar as alterações no tecido adiposo retroperitoneal e em cultura de células da linhagem 3T3L1, avaliando a captação de glicose e tamanho dos adipócitos isolados;

Verificar as alterações encontradas no tecido adiposo retroperitoneal e na cultura in vitro, verificando as vias da adipogênese, lipogênese e lipólise através de análises de expressão gênica (FAS, ACC, CEBP-α, SREBP1c, PPAR-γ) e proteica (GLUT4, AMPK, ATGL, HSL, FABP4);

#### 2 MATERIAL E MÉTODOS PARA ATENDER OBJETIVO GERAL 1

#### 3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar com idade de 14 semanas com peso de 350 a 380 gramas. Os animais foram mantidos em sala com ciclo claro-escuro de 12-12 horas e temperatura de 23±2 °C, com dieta normal (ração Nuvital da Nuvilab, Colombo, PR, Brasil) e água *ad libitum* durante o tratamento, sendo 4 animais por caixa. Todos os procedimentos desse estudo seguiram os princípios éticos de experimentação animal e foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de São Paulo.

#### 3.2 Protocolo experimental

Vinte e seis animais foram divididos em dois grupos: grupo controle (n=13) e grupo doxorrubicina (n=13). Os ratos Wistar foram tratados com cloridrato de doxorrubicina (Eurofarma, Campinas, Brasil) dose 15 mg/kg de peso corporal através de injeção intraperitoneal e o grupo controle com injeção de solução salina (0,9%).

Foram eutanasiados após 72 horas por decapitação. O tecido adiposo retroperitoneal foi removido, pesado, congelado em nitrogênio líquido e congelado a - 80 °C. O sangue foi centrifugado a 2.500 rpm por 15 minutos e o soro foi coletado e congelado no freezer a -80 °C para análises posteriores. O protocolo experimental pode ser visualizado na figura 7.



Figura 7 - Desenho do protocolo experimental 1

#### 3.3 Ingestão alimentar e ganho de peso

O peso corporal e a ingestão alimentar dos animais foram acompanhados diariamente.

#### 3.4 Isolamento e mensuramento do tamanho dos adipócitos
Para isolamento dos adipócitos, imediatamente após eutanásia, o tecido adiposo retroperitoneal foi digerido em meio *Dulbecco's modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com HEPES (20 mM), piruvato de sódio (2 mM), albumina (BSA, 1%) e com colagenase tipo 2 (1 mg/mL), pH 7.4, banho-maria a 37 °C agitador orbital. Os adipócitos isolados foram filtrados e lavados 3 vezes no mesmo tampão porém sem adição de colagenase.

Para mensurar tamanho dessas células, os adipócitos foram fotografados em microscópio óptico (magnitude de 100 x) utilizando uma câmera Moticam 1000 (Motic, Richmond, British Columbia, Canada) e o diâmetro foi determinado utilizando medições de 50 células pelo software Motic-images plus 2.0.

## 3.5 Cultura de células 3T3L1

As células 3T3L1 foram obtidas pela ATCC (Manassas, VA, EUA) e colocadas em placas de 6, 12 e 24 poços, sendo mantidas com *Dulbeccos modified Eagle Medium* (DMEM) com glicose (4500 mg/L) e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 3% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram mantidas na incubadora a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após atingir a 100% confluência, foram mantidas por 4 dias em meio de diferenciação contendo 10% SFB, 3% antibiótico, IBMX (0,5 mM), insulina (1,6  $\mu$ M) e dexametasona (1  $\mu$ M). Depois, foram mantidas em DMEM *feeding* contendo 10% SFB, 3% antibióticos e insulina (0,4  $\mu$ M) até o 11° dia, o meio foi trocado a cada 2 dias. No 11° dia as células foram mantidas em DMEM com 0,5% SFB por 24 horas e então os experimentos foram realizados.

### 3.6 Ensaio de MTT

Para avaliação da viabilidade celular, as células 3T3L1 foram incubadas com concentrações de doxorrubicina (0,001 a 100 µM) durante 72 e 96 horas no meio de cultura. Depois desse período, o meio de cultura foi trocado por PBS contendo 0,5 mg/mL de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) e cultivadas por 3 horas na incubadora. O sobrenadante foi removido e foi adicionado isopropanol-HCI (11M). A absorbância foi medida a 595 nm. Para verificar o efeito da doxorrubicina na viabilidade celular foi relativizado pelo grupo controle.

## 3.7 Coloração por oil red

As gotículas lipídicas celulares foram avaliadas por *oil red* (Sigma-Aldrich). Depois da diferenciação, as células foram lavadas, fixadas em paraformaldeído 4% por 1 hora seguido de coloração com solução de trabalho de *oil red* e lavado 3 vezes com PBS. As células foram fotografadas utilizando microscópio de luz (Olympus, Osaka, Japão). O tamanho do conteúdo lipídico foi analisado utilizando software image pro-plus 5.02.

### 3.8 Captação de 2-Deoxy-D-glucose (2-DG)

Células 3T3L1 diferenciadas e adipócitos primários isolados do tecido adiposo retroperitoneal foram lavados em PBS e incubados com e sem insulina (100 nMol/L) em tampão composto de (mM): 140 NaCl, 20 Hepes, 5 KCl, 2,5 MgSO4, 1 CaCl2, BSA 1% (pH 7.4), por 20 minutos a 37 °C. Depois, a 2-deoxy-D-[3H]-glucose (0.4 mmol/L, 1850 Bq/tube por poço) foi colocado e a reação seguiu por 4 e 3 minutos exatos, respectivamente para 3T3L1 e adipócitos primários. A reação foi interrompida através da adição de 250 µL de fluoretina gelada (0,3 mmol/L em sais de Earle, HEPES 10 mM, BSA 1% e DMSO 0,05%). 3T3L1 foi lavada com PBS gelado, adicionado 300 µL de NaOH (50 mM), a placa foi mantida em agitação por 20 minutos e 250 µL foi coletado para medir a radioatividade (1450 LSC, Couter Micro Beta, Trilux, Perkin Elmer).

Para os adipócitos primários extraídos do tecido adiposo retroperitoneal, alíquotas de 200  $\mu$ L dessa mistura final foram mergulhadas com 200  $\mu$ L de óleo de silicone (densidade de 0,963 mg/mL) em tubos de microcentrífuga e centrifugados durante 10 segundos a 11.000 g a fim de separar as células do tampão através da camada de óleo. O pellet formado acima da camada de óleo foi coletada, transferida para tubos contendo líquido de cintilação para medir a radiotividade através do contador beta. Os resultados foram expressos em  $\mu$ Mol de glicose por 1 x 10<sup>6</sup> células 3T3L1 e pMol por cm<sup>2</sup> para os adipócitos primários retroperitoneais.

### 3.9 Análises de proteínas por Western Blotting

As células 3T3L1 e os tecidos adiposos retroperitoneais foram homogeneizados em tampão de extração (50 mM de Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM de NaCl, 1 mM de ortovanadato de sódio, inibidores de fosfatases e proteases e 0,1% de triton). As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, a 4 °C, por 30 minutos e os sobrenadantes submetidos à quantificação protéica pelo método de Bradford, usando curva de albumina como padrão.

A análise por Western Blotting foi realizada segundo Towbin et al., (1979). Alíquotas de cada amostra, com a mesma concentração de proteínas totais (30 μg), foram tratadas de acordo com o método descrito por Laemmli (1970) e submetidas à eletroforese em SDS-gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Shapiro et al., 1967). Em seguida, as proteínas do gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose e/ou pvdf, por 80 min, a 15V. Após o bloqueio com 5% de leite desnatado por 1 hora e lavagem da membrana (3 x 10 min), foram incubadas com anticorpos contra GLUT-4, AMPK fosforilada treonina-172, GAPDH, FABP4, HSL fosforilada serina565 e serina 660 e ATGL, em solução basal contendo albumina bovina a 1% *overnight* à temperatura ambiente. Os anticorpos foram obtidos da Cell Signaling Technology® (Danvers, MA, EUA), exceto GAPDH que foi obtido da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA). As membranas então foram lavadas novamente e submetidas à incubação com o segundo anticorpo anti-IgG conjugado com peroxidase, por 1-2 horas, em solução basal acrescida de 3% de leite desnatado à temperatura ambiente. Após nova sessão de lavagens, as membranas foram incubadas com o substrato para peroxidase (kit ECL) por 1 min e imediatamente colocadas no foto-documentador por períodos variáveis de tempo, de 1 a 20 min. As intensidades das bandas autoradiografias foram quantificadas por densitometria óptica, pelo programa Scion Image (Frederick, Maryland, EUA).

#### 3.10 Adiponectina no soro e no tecido adiposo retroperitoneal

O tecido adiposo retroperitoneal foi homogeneizado em tampão RIPA (10 nM de NA<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,3 M de NaCl, 0,1% de Sódio dodecil sulfato, 2 mM de EDTA no pH 7.2) contendo inibidoresde fosfatase e preotease. Depois foi centrifugado e coletado o sobrenadante, então a concentração de proteínas foi determinada pelo ensaio de Bradford (Bio-Rad, Hercules, California) com curva de albumina como padrão. A avaliação quantitativa da adiponectina no tecido adiposo retroperitoneal e no soro foi realizada por Elisa (DuoSet ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) em duplicatas, sendo mostrado o valor médio.

### 3.11 Expressão gênica por PCR-tempo real

O RNA total foi extraído das células com trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) para extração do RNA total (Chomczynski e Sacchi, 1987). O RNA foi quantificado por leitura em espectrofotômetro a 260 nm (A260 nm = 1 corresponde a 44 µg/mL) e o grau de pureza determinado pelo razão 260/280 nm (razão igual a 2 indica alto grau de pureza). O cDNA foi sintetizado a partir de 2 µg do RNA total extraído utilizando a transcriptase reversa. A expressão gênica foi quantificada por PCR em tempo real (Higuchi et al., 1992), utilizando o aparelho

ROTOR GENE 3000 da Corbett Research (Mortlake, NSW, Austrália) e SYBER Green como marcador fluorescente. A quantificação da expressão dos genes foi realizada usando o método da Ct comparativa (Ct = threshold cycle; número de ciclo no qual o produto do PCR atinge um limiar de detecção), tendo a expressão da RPL-19 como padrão interno. Foram avaliados genes envolvidos no metabolismo de glicose e ácidos graxos (ACC, FAS, CEBP, SREBP, PPAR-γ, RPL-19).

Sequência dos primers utilizados (tabela 1):

GENE	FORWARD PRIMER	REVERSE PRIMER
RLP-19	CAATGCCAACTCCCGTCA	GTGTTTTTCCGGCAACGAG
FAS	GATTCGGTGTATCCTGCTGTC	CATGCTTTAGCACCTGCTGT
ΑССα	CCAGCAGATTGCCAACATC	ACTTCGGTACCTCTGCACCA
PPAR-γ	ATCTTAACTGCCGGATCCAC	CAAACCTGATGGCATTGTGAG
CEBP-α	TAGGTTTCTGGGCTTTGTGG	GATGGATCGATTGTGCTTCA
SREBP1c	TGGACCACAGAAAGGTGGA	ATGGCCTTGTCAATGGAACT

# Tabela 1 - Sequência dos primers utilizados do RT- PCR

## 3.12 Lipogênese

primários Os adipócitos foram incubados em tampão contendo Krebs/Ringer/fosfato (contendo BSA 1%, 2 mM de glicose, 200 µM palmitato-[1-14C], 1859 Bq/tubo no pH 7.4) durante 2 horas em banho-maria a 37 °C. No final da incubação, a mistura foi transferida para tubos de 1,5mL contendo 400 µL de óleo de silicone e centrifugado por 30 segundos. O pellet superior foi transferido para tubos de polipropileno contendo 2,5 mL de reagente Dole [isopropanol:n-heptano:H2SO4 (4:1:0,25, vol/vol/vol)] para a extração de lipídeos. Depois da adição de n-heptano (1,5 mL), tubos foram vorticados e decantados por 5 minutos. Uma alíquota da fase superior foi colocada em um tubo de cintilação para determinação de radioatividade incorporada em triacilglicerol (1450 LSC, Counter MicroBeta, Trilux; PerkinElmer). Os resultados estão expressos em nmol de palmitato incorporado em triacilglicerol por 1x10<sup>6</sup> células/h.

### 3.13 Lipólise

A lipólise foi estimada através da liberação de glicerol no meio de incubação. Para isso, os adipócitos primários do tecido adiposo retroperitoneal (1 x  $10^6$  células/mL) foram incubadas em tampão Krebs/Ringer/fosfato (pH 7.4) contendo BSA (20 mM) e glicose (5 mM) por 30 minutos a 37 °C sob presença ou ausência de isoproterenol (2  $\mu$ M). Depois a reação foi bloqueada no gelo e o meio foi coletado cuidadosamente para medir a liberação de glicerol (Glicerol livre kit; Sigma, Saint Louis, MI, EUA).

Já nas células 3T3L1, após diferenciação, foram incubadas em tampão transportador de glicose (1 mM NaCL, 0.8 mM MgSO47H20, 5.36 mM KCl, 0.845 mM NaH2PO4, 1.5 mM CaCl2H2O, 25 mM Hepes, 0,02 μM Fenol Red, 1% BSA, 5 mM glicose) por 30 minutos a 37°C sob presença ou ausência de isoproterenol (10μM). O meio de incubação foi coletado para avaliar o glicerol liberado (Triacilglicerol kit, labtest, ref. 87, Lagoa Santa, MG, Brasil). Os resultados estão expressos em nmol de glicerol por 1x10<sup>4</sup> adipócitos primários e nmol por grama de proteína de células 3T3L1.

#### 3.14 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando GraphPad Prism statistics software package versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão da média (DPM). Foram analisados por teste T-student para comparação entre dois grupos e para as análises dos ensaios de cultura *in vitro* foram utilizados ANOVA one-way e two-way seguido pelo pós-teste de Bonferroni e teste T-student. O valor de P<0,05 foi considerado estatisticamente significante.

### 4 RESULTADOS – PARTE 1

A doxorrubicina promoveu toxicidade em células 3T3L1: inicialmente foi observado que a doxorrubicina promove letalidade em 72 e 96 horas de incubação (figura 8A e B) e em doses menores do que 1uM não houve toxicidade. Além disso, adipócitos primários de ratos wistar apresentaram tamanho reduzido quando tratados com doxorubicina (15 mg/Kg peso corporal) (figura 8C).



Figura 8 - Viabilidade celular depois de 72 (A) e 96 (B) horas de incubação com doxorrubicina (DX) de células 3T3L1. As concentrações variam de 0,001 a 100 uM. Avaliada pelo ensaio de MTT e normalizado utilizando a absorbância do controle (CT) como 100% de sobrevivência. Valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de 3 experimentos independentes (n=3). Tamanho dos adipócitos (C) extraídos do TARP de ratos tratados com 15 mg/Kg de peso corporal de cloridrato de doxorrubicina i.p. eutanasiados após 72 horas. Média  $\pm$  desvio padrão de 5 a 6 experimentos. Os grupos foram comparados usando anova de uma via seguida pelo teste de Dunnetts (A e B) e teste T (C), sendo \*p<0,05 \*\*\*p<0,001.

**Doxorrubicina reduziu a captação de glicose:** adipócitos primários de animais tratados com doxorrubicina exibiram menor captação de glicose, após estímulo com insulina (figura 9A). Resultados similares foram exibidos em células 3T3L1, mesmo em doses menores e períodos curtos de tratamento (30 minutos, figura 9B) ou crônicos (24 horas, figura 9C) houve redução na captação de glicose, quando estimulados com insulina. Em corroboração com os dados de captação de glicose,

também houve diminuição da expressão proteica de GLUT-4 e AMPK fosforilado no tecido adiposo retroperitoneal (figura 9D), porém nas células 3T3-L1 já não houve tais alterações (figura 9E).



Figura 9 - Captação de glicose (A) em adipócitos extraídos do TARP de ratos e em células 3T3L1 (B e C). A captação de glicose foi avaliada pela captação de 2-DG com e sem estimulação por insulina (100nM) em adipócitos e 3T3L1. Os adipócitos primários foram obtidos do TARP de ratos tratados com 15 mg/Kg de peso corporal de cloridrato de doxorrubicina i.p. eutanasiados após 72 horas. 3T3L1 foram incubadas com doxorubicina (1uM) por 30 minutos (B) e 24 horas (C), após 10 dias de diferenciação em adipócitos maduros. Media ± desvio padrão de 5 a 6 experimentos. Expressão proteica de AMPK 172-treonina fosforilada e conteúdo total de GLUT4 e FABP4 extraídos do TARP de ratos (D); e conteúdo total de AMPK172, GLUT4 e GAPDH de células 3T3L1 incubadas com doxorrubicina (1uM) por 24 horas, após 10 dias de diferenciação em adipócitos maduros (E). Os grupos foram comparados usando anova de duas vias seguida pelo teste de Dunnetts) (A, B e C), sendo \*p<0,05 \*\*p<0,01. Figura representa 4 experimentos por grupo (D e E).

**Concentração de adiponectina diminuída pela doxorrubicina:** foi verificada a redução na concentração de adiponectina no soro (figura 10A) e nos TARP (figura 10B) dos animais tratados com doxorrubicina. Ainda, baixa dose de doxorrubicina suprimiu a adiponectina secretada no meio de cultura, após 24 horas de incubação em células 3T3L1 (figura 10C).



Figura 10 - Concentração de adiponectina no soro (A) e no TARP (B) de ratos Wistar. Concentração de adiponectina liberada no meio de cultura (C) de células 3T3L1 tratadas com doxorrubicina (DX) 1uM por 24 horas. Os ratos foram tratados com 15 mg/Kg de peso corporal de cloridrato de doxorrubicina i.p., eutanasiados após 72 horas. 3T3L1 foram incubadas com doxorubicina (1 uM) 24 horas, após 10 dias de diferenciação em adipócitos maduros. Média ± desvio padrão de 6 experimentos. Os grupos foram comparados usando teste T, sendo \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001.

**Doxorrubicina afetou a lipogênese:** o tratamento com esse medicamento também alterou outras vias metabólicas. Ratos tratados exibiram menor síntese de lipídeos a partir do palmitato, *ex vivo* (figura 11). Corroborando com esse resultado, células 3T3L1 tratadas apresentaram baixa expressão de genes relacionados com a regulação da lipogênese. FAS e ACC exibiram redução da sua expressão gênica (figura 12A e B) em 96 horas e 12 dias de incubação, após a indução da diferenciação concomitante ao tratamento com doxorrubicina.



Figura 11 - Ácidos graxos incorporados em triacilglicerol (TAG) nos adipócitos extraídos do TARP de ratos tratados com doxorrubicina (DX) (15 mg/kg) ou solução salina (CT). Média  $\pm$  desvio padrão de 4 a 6 experimentos. Os grupos foram comparados usando teste T, sendo\*p<0,05.



Figura 12 - Expressão gênica de enzimas lipogênicas FAS (A) e ACC (B) em 24 horas, 96 horas e 12 dias depois da diferenciação em células 3T3L1 tratadas com 1 uM de doxorrubicina, avaliada por PCR em tempo real. Média ± desvio padrão de 4 a 6 experimentos. Os grupos foram comparados usando anova de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni, sendo \*p<0,05 e \*\*\*p<0,001.

Adipogênese também é comprometida pela doxorrubicina: através da coloração com *oil red* foi observada a inibição da diferenciação de células 3T3L1 após 12 dias de incubação com doxorrubicina (figura 13). A expressão gênica de fatores que modulam a adipogênese também foi alterada. Portanto, PPAR-γ e CEBP-α (figura 14A e B) foram fortemente reduzidos nos três períodos de tempo avaliados, porém SREBP1c apresentou inibição apenas em 24 horas de incubação com a droga (figura 14C).



Figura 13 - Células 3T3L1 coradas com oil red, após tratamento com doxorrubicina (DX) 1 uM ou PBS (controle) por 12 dias depois de adicionar o coquetel de diferenciação. Fotos obtidas por microscopia óptica, resolução de 200X



Figura 14 - Expressão gênica dos fatores adipogênicos PPAR- $\gamma$  (A), CEBP- $\alpha$  (B) e SREBP1c em 24 horas, 96 horas e 12 dias depois da diferenciação em células 3T3L1 tratadas com 1 uM de doxorrubicina. Média  $\pm$  desvio padrão de 4 a 6 experimentos. Os grupos foram comparados usando anova de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni, sendo \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001.

A lipólise foi outro processo metabólico inibido pela doxorrubicina: para finalizar, a doxorrubicina reduziu a lipólise tanto a basal quanto estimulada por isoproterenol, em adipócitos primários (figura 15 A e B). Nas células de linhagem, as duas doses de doxorrubicina (0,1 uM e 1 uM) utilizadas não promoveram morte dessas células (figura 15C), mas também diminuíram a lipólise na presença e ausência de isoproterenol. Em similaridade com esses resultados, o conteúdo proteico de HSL fosforilada e ATGL no TARP também foi reduzido (figura 15D).



Figura 15 - Glicerol liberado no ensaio de lipólise em adipócitos isolados do TARP de animais na ausência e presença de isoproterenol (Iso) (10  $\mu$ M) por 30 minutos (A). Concentração de glicerol (B) e lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultura de células 3T3L1 (C) tratadas com doxorrubicina (DX) por 24 horas em duas doses, 0,1 uM e 1 uM, na ausência e presença de isoproterenol (Iso) (10  $\mu$ M). Os parâmetros foram normalizados pela concentração das proteínas extraídas das células. Média ± desvio padrão de 4 a 8 experimentos. Os grupos foram comparados usando anova de duas vias, seguida pelo pós-teste de Bonferroni, sendo \*p<0,05, \*\*p<0,01 e \*\*\*p<0,001. Expressão proteica de HSL fosforilada em ser-565 e ser-660, ATGL e GAPDH (D) das proteínas extraídas do TARP de ratos. Os ratos foram tratados com 15 mg/Kg de peso corporal de cloridrato de doxorrubicina i.p., eutanasiados após 72 horas. Figura representa 4 experimentos por grupo.

## 5 DISCUSSÃO – PARTE 1

Resultados prévios do nosso grupo mostraram que a administração i.p. de doxorrubicina em ratos Wistar, promoveram perda de peso e expressiva redução da massa do tecido adiposo retroperitoneal (Lima et al., 2016). Esses resultados são semelhantes com o que é encontrado na literatura, mesmo em baixas doses a doxorrubicina causa perda de peso corporal e consequentemente do tecido adiposo também (Kelishomi et al., 2008; Xu et al., 2011).

Portanto, visto que a perda da massa adiposa contribui para um prognóstico ruim em pacientes com câncer (Bing; Trayhurn, 2009; Hallabi et al., 2007, Lieffers et al., 2009) a proposta desse estudo foi investigar se a doxorrubicina pode ser tóxica e gerar impactos nas vias metabólicas do tecido adiposo. Nesse estudo, mesmo baixas doses (0,1 uM) de doxorrubicina foram tóxicas para as células 3T3L1 e causou a morte celular; bem como a administração de doxorrubicina alterou a captação de glicose, adipogênese, lipogênese e lipólise. Assim, nossas evidências mostram que a doxorrubicina causa um profundo impacto na homeostase do tecido adiposo.

A doxorrubicina promoveu inviabilidade dos adipócitos *in vitro* (figura 8A e B) e reduziu o tamanho dos adipócitos *ex vivo* (figura 8C). O tecido adiposo branco tem uma função endócrina produzindo e liberando adipocinas necessárias para a manutenção das condições fisiológicas (Hyvonen; Spalding, 2014), além de fornecer ácidos graxos para o a produção de energia em períodos de privação energética (Masoodi et al., 2015; Obregon et al., 2014).

O tecido adiposo branco é um tecido importante para a regulação da homeostase glicêmica. Estudo recente (Standford et al., 2015) mostrou que o transplante de tecido adiposo subcutâneo de ratos treinados para animais sedentários foi suficiente para atenuar a resistência à insulina e melhora da tolerância à glicose, demonstrando os efeitos endócrinos que o tecido adiposo exerce no organismo.

A captação de glicose é estimulada pela insulina. A administração intraperitoneal de doxorrubicina levou a redução da captação de glicose (figura 9A). Em condições fisiológicas, o transporte de glicose através da membrana celular ocorre principalmente pela translocação de GLUT-4 (Stockli et al., 2011). O tratamento quimioterápico causou uma redução do conteúdo proteico de GLUT-4 e AMPK fosforilada *in vivo* (figura 9D). Já no tratamento *in vitro*, a redução na captação de glicose foi similar (figura 9B e C) exceto as alterações de AMPK fosforilada e GLUT-4 que não foi diminuída (figura 9E). Lima et al., (2016) verificaram que no músculo

esquelético a inibição de GLUT-4 e AMPK foi semelhante tanto *in vivo* como *in vitro*, portanto resultados diferentes dos encontrados no tecido adiposo.

A redução da captação de glicose em células estimuladas pela insulina pode ser explicada pela diminuição da expressão genica de PPAR-γ (figura 14A). O PPAR-γ é um receptor nuclear altamente expresso no tecido adiposo e tem uma função chave na homeostase glicêmica. A ativação deste receptor, através do uso de medicamentos da família dos tiazolidinedionas, é utilizado na prática clínica devido sua capacidade de aumentar a sensibilidade à insulina (Schondorf et al., 2011; Takada; Makashima, 2015). Em concordância, a inibição de PPAR-γ diminui a captação de glicose pelos adipócitos de 3T3L1 através da redução de GLUT-1 e GLUT-4 (Liao et al., 2007).

O PPAR-γ é o principal fator de transcrição no tecido adiposo. Dentre suas funções na homeostase glicêmica, este receptor nuclear é responsável por efeitos pleiotrópicos, ou seja, modulando assim diversas vias como a lipogênese, adipogênese e lipólise (Janani e Ranjitha Kumari, 2015). Porém, os mecanismos que o PPAR-γ regula esses diferentes processos metabólicos são dependentes de ações sinérgicas com outros fatores de transcrição (Lehrke; Lazar, 2005; Sheu et al., 2005).

A adiponectina é o maior sensibilizador de insulina endógeno, esse hormônio é produzido pelos adipócitos e tem papel protetivo importante para a homeostase energética. Geralmente, sua concentração plasmática é inversamente proporcional aos estados de resistência à insulina (Weyer et al., 2001). Esses efeitos normalmente são derivados da ativação de AMPK e outras moléculas sinalizadoras como proteína quinase RAS associada à proteina Rab5, p38MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno), PI3K e AKT (Shehzad et al., 2012). Nossos resultados mostram redução na concentração da adiponectina no tecido adiposo retroperitoneal e no meio de cultura das células também, após o tratamento quimioterápico (figura 10A, B e C). É importante ressaltar que Maruyama et al., (2011) verificaram que a administração de adiponectina protegeu os animais da cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina através da via de sinalização da AKT. No entanto, a inibição de PPAR-γ e de adiponectina pode ser causa ou efeito da redução na captação de glicose.

Em adição aos efeitos na captação de glicose, a doxorrubicina causa alterações em outras vias metabólicas como a lipogênese, levando a redução da incorporação de ácidos graxo em TAG *in vivo* acompanhado da redução da expressão gênica de FAS e ACC (figura 12), enzimas envolvidas na regulação da lipogênese *de novo*. A baixa utilização de glicose para formar TAG e reduzida expressão gênica de

FAS e ACC contribuem para diversos efeitos colaterais da biologia do adipócito. Em adição, esses resultados podem ser explicados pela redução da sensibilidade à insulina (Lima et al., 2016), da captação da glicose e da expressão proteica de GLUT-4, ou seja, há menor disponibilidade de substratos intracelulares e as células não conseguem manter as vias lipogênicas (Brunengraber et al., 2003).

Em concordância com a redução da lipogênese, a doxorrubicina rompeu a adipogênese através da redução de fatores chaves para o desenvolvimento dos adipócitos (figura 14 A, B e C). C/EBP $\alpha$  é um fator de transcrição que regula outros fatores, induzindo a expressão de PPAR- $\gamma$ . Além de ter papel crítico no desenvolvimento de adipócitos e consequentemente no acúmulo de lipídeos ou na lipogênese (Shehzad et al., 2012). Outro fator pró-adipogênico é o SREBP1c que parece contribuir com a expressão de PPAR- $\gamma$  e C/EBP- $\beta$ . Corroborando com os resultados apresentados nesse estudo, a doxorrubicina suprimiu a adipogênese em células 3T3L1 de maneira dose-dependente, inibindo C/EBP- $\alpha$  e PPAR- $\gamma$  (Arunachalam et al., 2012).

Em estudo anterior do nosso grupo, houve aumento dos ácidos graxos livres plasmáticos de ratos tratados com doxorrubicina (Lima et al., 2016). Contudo, a lipólise nos adipócitos primários foi reduzida sob condições basais e estimuladas por isoproterenol também (figura 15A), e consequentemente promoveu a redução da expressão proteica das lipases essenciais para esse processo que são a ATGL e HSL fosforilada em serina 660, efeitos causados pelo tratamento com o quimioterápico (figura 15D). Interessantemente a fosforilação do resíduo 565, um resíduo inibitório da HSL, fosforilado pela AMPK foi reduzido também, mostrando um efeito deletério na atividade da AMPK. Além da resposta molecular, observou-se diminuição da liberação de glicerol pelos adipócitos (figura 15B). O processo lipolítico é dependente de um ciclo entre a re-esterificação e hidrólise dos ácidos graxos (Masoodi et al., 2005), porém mais estudos são necessários para explicar esses efeitos promovidos pela doxorrubicina.

Muitas características encontradas no tratamento com doxorrubicina são similares à síndrome da caquexia associada ao câncer (Arunachalam et al., 2013). Em contrapartida, considerando nossos resultados de lipólise, são encontradas condições antagonistas. Na caquexia, a redução do tecido adiposo é decorrente da lipólise elevada (pelo aumento da atividade da HSL) (Argiles et al., 2014) e a deficiência da ATGL ou HSL em animais com câncer previne a lipólise e aumenta a sobrevivência desses animais (Das et al., 2011).

Sendo assim, nossos resultados coletivamente mostram que o tratamento com doxorrubicina provoca um profundo impacto na homeostase do tecido adiposo, prejudicando as funções endócrinas e metabólicas deste tecido. Essas disfunções podem ser causadas pelo aumento da morte dos adipócitos. Em humanos, quimioterapia provoca efeitos similares ao fenômeno denominado "*fat necrosis*", que é o resultado de morte do tecido adiposo devido doença e outras condições patológicas (Belakhlef et al., 2008).

Para concluir, muitos efeitos do tratamento quimioterápico com doxorubicina podem ser causados pelo impacto da droga no tecido adiposo branco. Efeitos colaterais, como as mudanças metabólicas e endócrinas, geram prejuízos na qualidade de vida dos pacientes em tratamento. Portanto, os resultados desse modelo experimental são importantes para entender os efeitos colaterais que os pacientes em tratamento quimioterápico comumente apresentam e auxiliar em pesquisas por tratamentos adjuvantes que possam melhorar a qualidade de vida.

Visto os efeitos da doxorrubicina no tecido adiposo, propomos outro modelo experimental. Este modelo tem, além do tratamento quimioterápico, um tratamento adjuvante que busca alternativas para proteger o tecido adiposo do impacto metabólico e endócrino já apresentado, sendo então descrito a seguir.

## 6 OBJETIVO GERAL 2:

Avaliar os efeitos metabólicos da doxorrubicina sobre o tecido adiposo subcutâneo e as possibilidades de proteção dos efeitos adversos quando associado com metformina.

## 6.1 Objetivos específicos 2:

Avaliar inicialmente a influência do protocolo de aplicação de 2,5 mg/Kg de peso corporal da doxorrubicina i.p. a cada 72 horas, com a administração concomitante de metformina ou não;

Verificar a sensibilidade à insulina desses animais;

Caracterizar o modelo experimental e os efeitos sistêmicos gerados pelo tratamento;

Observar as alterações encontradas no tecido adiposo subcutâneo desses animais, avaliando a captação de glicose *ex vivo* em adipócitos isolados, expressão proteica de AMPK e a expressão de genes relacionados a adipogênese e lipogênese;

Analisar as alterações histológicas do tecido adiposo subcutâneo decorrentes do tratamento com a doxorrubicina quanto ao tamanho, área e perímetro dos adipócitos e à presença de fibrose;

## 7 MATERIAL E MÉTODOS PARA ATENDER OBJETIVO GERAL 2:

### 7.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57/BL6 com idade aproximada de 10 semanas de vida. Os animais foram mantidos em sala com ciclo claro-escuro de 12-12 horas e temperatura de 23±2 °C, com dieta normal (ração Nuvital da Nuvilab, Colombo, PR, Brasil) e água *ad libitum* durante o tratamento. Todos os procedimentos desse estudo seguirão os princípios éticos de experimentação animal e serão submetidos ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de São Paulo.

### 7.2 Protocolo experimental

80 animais foram divididos em 4 grupos, grupo controle, grupo *pair-feeding*, grupo doxorrubicina e grupo doxorrubicina + metformina, conforme descrito a seguir:

- Grupo controle (CTRL): injeção de solução salina (i.p.);
- Grupo pair-feed (PF): injeção de solução salina (i.p.) e restrição alimentar;
- Grupo doxorrubicina (DOXO): injeção de cloridrato de doxorrubicina (i.p.);
- Grupo doxorrubicina + metformina (DOXO + MET): aplicação de doxorrubicina (i.p.) e metformina (oral).

Os animais foram tratados com cloridrato de doxorrubicina (Eurofarma, Campinas, SP, Brasil) a cada 72 horas (dose 2,5 mg/kg de peso) através de injeção intraperitoneal (i.p.), até perfazer a dose final do tratamento de 10 mg/kg de peso, portanto foram 2 semanas de tratamento.

Já o grupo tratado com ambas as drogas, recebeu 300 mg/kg de peso corporal diariamente de metformina (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) através de gavagens orais, durante todo protocolo experimental, ou seja, juntamente as injeções de doxorrubicina. Os grupos controle e *pair-feeding* receberam injeções i.p. de solução salina e gavagens diárias com PBS.

Após o tratamento realizado durante 2 semanas, os animais foram sacrificados por decapitação depois de 6 horas de restrição calórica (jejum) e o sangue coletado para as avaliações plasmáticas. O tecido adiposo subcutâneo foi removido, pesado, congelado em nitrogênio líquido e congelado a -80 °C. O sangue foi centrifugado a 2.500 rpm por 15 minutos e o soro foi coletado e congelado no freezer a -80 °C para análises posteriores.



Figura 16 - Desenho do protocolo experimental 2

## 7.3 Composição corporal, ingestão alimentar e ganho de peso

O peso e a ingestão alimentar foram acompanhados ao longo do tratamento. Ao final, os seguintes parâmetros foram mensurados: peso dos músculos sóleo e gastrocnêmio, dos depósitos adiposos retroperitoneal, subcutâneo, epididimal e mesentérico e do fígado.

# 7.4 Avaliação de parâmetros plasmáticos

Os parâmetros plasmáticos foram avaliados por kits específicos: a concentração plasmática de glicose, triacilglicerol, lactato desidrogenase foram estabelecidos por método de sistema enzimático (Labtest, liquiform, ref:. 133, 87, 138 respectivamente, Lagoa Santa, MG, Brasil). Os ácidos graxos livres foram avaliados pelo kit NEFA-HR (Wako, ref. 999-34691, 991-34891, 993-35191, Chuo-Ku, Osaka, Japão) e LPS pelo kit QCL-1000 (Lonza, ref. 50-647U e 50-648U, Walkersville, MD, EUA).

## 7.5 Avaliações da responsividade à insulina:

Teste oral de tolerância ao piruvato

Os animais em jejum prévio de 16 horas receberam uma dose de piruvato de sódio (2 g/Kg de peso corporal). Então, a determinação da glicemia capilar caudal foi medida através de glicosímetro (OneTouch Ultra, Johnson & Johnson), em diferentes momentos para a construção da curva glicêmica: 0 (pré-injeção), 20, 40, 60 e 80 minutos após a administração de piruvato de sódio.

### Teste de tolerância à insulina

O teste de tolerância à insulina foi avaliado conforme descrito previamente por Saad et al., (1996). A glicemia foi então mensurada e monitorada a cada 5 min após a injeção intraperitoneal de insulina (0,5 UI/kg de peso corpóreo), até os 30 min. A taxa de decaimento de glicose após a administração de insulina foi calculada segundo Saad et al., (1996).

### 7.6 Isolamento dos adipócitos

Para isolamento dos adipócitos, imediatamente após eutanásia, o tecido adiposo subcutâneo foi digerido em meio *Dulbeccos modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com HEPES (20 mM), piruvato de sódio (2 mM), albumina (BSA, 1%) e com colagenase tipo 2 (1 mg/mL), pH 7.4, banho-maria a 37 °C agitador orbital. Os adipócitos isolados foram filtrados e lavados 3 vezes no mesmo tampão porém sem adição de colagenase.

## 7.7 Captação de 2-Deoxy-D-glucose (2-DG)

Os adipócitos primários isolados do tecido adiposo subcutâneo foram lavados em PBS e incubados com e sem insulina (100 nMol/L) em tampão composto de (mM): 140 NaCl, 20 Hepes, 5 KCl, 2,5 MgSO4, 1 CaCl2, BSA 1% (pH 7.4), por 20 minutos a 37 °C. Depois, a 2-deoxy-D-[3H]-glucose (0.4 mmol/L, 1850 Bq/tube por poço) foi colocado e a reação seguiu por 3 minutos exatos. Depois, a reação foi interrompida através da adição de 250µL de fluoretina gelada (0,3 mmol/L em sais de Earle, HEPES 10 mM, BSA 1% e DMSO 0,05%). Então, alíquotas de 200 µL dessa mistura final foram mergulhadas com 200 µL de óleo de silicone (densidade de 0,963 mg/mL) em tubos de microcentrífuga e centrifugados durante 10 segundos a 11.000 g a fim de separar as células do tampão através da camada de óleo. O pellet formado acima da camada de óleo foi coletada, transferida para tubos contendo líquido de cintilação para medir a radiotividade (1450 LSC, Couter Micro Beta, Trilux, Perkin Elmer). Os resultados foram expressos em pMol por cm<sup>2</sup>.

### 7.8 Dosagem de adiponectina e leptina

O tecido adiposo subcutâneo foi homogeneizado em tampão RIPA (10 nM de NA<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,3M de NaCl, 0,1% de Sódio dodecil sulfato, 2mM de EDTA no pH 7.2) contendo inibidores de fosfatase e preotease. Depois foi centrifugado e coletado o sobrenadante, então a concentração de proteínas foi determinada pelo ensaio de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) com curva de albumina como padrão. A avaliação quantitativa da adiponectina no tecido adiposo e no soro foi realizada por Elisa (DuoSet ELISA, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA). Leptina foi avaliada com amostras do soro através do método de Elisa (Quantikine ELISA, R&D Systems, ref. SMOB00, Minneapolis, MN, EUA).

### 7.9 Parâmetros histológicos

### Obtenção e processamento dos tecidos

O tecido adiposo subcutâneo obtido foi colocado em solução fixadora paraformaldeido 4% em tampão PBS (4% (p/v), pH 7,4, 4 °C) permanecendo por 24 horas e logo depois foi colocado em álcool 70%. Depois foi feita a desidratação com a concentração crescente de álcool até o etanol absoluto, com intervalos de 30 minutos entre cada banho e diafinizados com xilol sendo em 3 banhos de 20 minutos cada. Na sequência, foram incluídos em paraplast (Sigma, São Paulo, SP, Brasil) e emblocados em *tissue* cassetes (Fisher Scientific, São Paulo, SP, Brasil). Os blocos foram submetidos à microtomia em cortes consecutivos de 5 µm de espessura e estendidos em lâminas cobertas com polilisina (Sigma, São Paulo, SP, Brasil).

#### Desparafinização e hidratação

Depois do processamento todo, as lâminas foram desparafinizadas com xilol e hidratadas em banhos decrescentes de etanol (100%, 95% e 70%, por 5 minutos cada etapa) e lavadas em água destilada.

### Coloração por hematoxilina e eosina (H&E)

Após desparafinização e hidratação, as lâminas foram coradas com hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavadas em água corrente, e coradas com eosina durante 1 minuto. As lâminas foram então colocadas rapidamente em álcool 95% e 100% e depois receberam 3 banhos de xilol, 1 a 2 minutos cada. Por fim, as lâminas foram fechadas com goma de Damar.

### Coloração Picro Sirius Red

Depois de todo processamento, as lâminas foram coradas com Direct Red 80 (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) por 1 hora. Depois, as lâminas foram colocadas em álcool 95% e 100% e por último receberam 3 banhos de xilol, 1 minuto cada, as lâminas foram montadas com goma de Damar.

### Imagens histológicas

A análise da morfologia dos tecidos foi realizada utilizando imagens digitalizadas com aumento de 40 x nas colorações de H&E e Picro Sirius Red, através do software ImageJ. As imagens foram obtidas utilizando um microscópio óptico modelo ICS Standard 25 (CarZeiss, Brasil) com câmera acoplada modelo AxioCam HRC (CarZeiss, Brasil). Para cada corte histológico foram capturadas 5 imagens coradas.

#### 7.10 Expressão gênica por PCR-tempo real

O RNA total foi extraído do tecido adiposo subcutâneo com trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) para extração do RNA total (Chomczynski; Sacchi, 1987). O RNA foi quantificado por leitura em espectrofotômetro a 260 nm (A260 nm = 1 corresponde a 44  $\mu$ g/mL) e o grau de pureza determinado pelo razão 260/280 nm (razão igual a 2 indica alto grau de pureza). O cDNA foi sintetizado a partir de 2  $\mu$ g do RNA total extraído utilizando a transcriptase reversa. A expressão gênica foi quantificada por PCR em tempo real (Higuchi et al., 1992), utilizando o aparelho ROTOR GENE 3000 da Corbett Research (Mortlake, NSW, Austrália) e SYBER Green como marcador fluorescente. A quantificação da expressão dos genes foi realizada usando o método da Ct comparativa (Ct = threshold cycle; número de ciclo no qual o produto do PCR atinge um limiar de detecção), tendo a expressão da RPL-19 como padrão interno. Foram avaliados genes envolvidos no metabolismo de glicose e ácidos graxos (ACC, FAS, CEBP- $\alpha$ , SREBP1c, PPAR- $\gamma$ , RPL-19).

GENE	FORWARD PRIMER	REVERSE PRIMER
RLP-19	CAATGCCAACTCCCGTCA	GTGTTTTTCCGGCAACGAG
FAS	GATTCGGTGTATCCTGCTGTC	CATGCTTTAGCACCTGCTGT
ΑССα	CCAGCAGATTGCCAACATC	ACTTCGGTACCTCTGCACCA
Caspase 3	GTAAAGACCATACATGGGAGCA	ATGCATATGCCCATTTCAGG
<b>CEBP-α</b>	TAGGTTTCTGGGCTTTGTGG	GATGGATCGATTGTGCTTCA
SREBP1c	TGGACCACAGAAAGGTGGA	ATGGCCTTGTCAATGGAACT

Tabela 2: Sequência dos primers utilizados do RT-PCR

## 7.11 Análises de proteínas por Western Blotting

Os tecidos adiposos subcutâneos foram homogeneizados em tampão de extração (50 mM de Tris-HCI, pH 7,5; 150 mM de NaCI, 1 mM de ortovanadato de sódio, inibidores de fosfatases e proteases e 0,1% de triton). As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, a 4° C, por 30 minutos e os sobrenadantes submetidos à quantificação proteica pelo método de Bradford (1976), usando curva de albumina como padrão.

A análise por Western Blotting foi realizada segundo Towbin et al., (1979). Alíquotas de cada amostra, com a mesma concentração de proteínas totais (30 µg), foram tratadas de acordo com o método descrito por Laemmli, (1970) e submetidas à eletroforese em SDS-gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Shapiro et al., 1967). Em seguida, as proteínas do gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose e/ou pvdf, por 80 min, a 15V. Após o bloqueio com 5% de leite desnatado por 1 hora e lavagem da membrana (3 x 10 min), foram incubadas com anticorpos contra AMPK fosforilada treonina-172, GAPDH, AKT total e adiponectina, em solução basal contendo albumina bovina a 1% *overnight* à temperatura ambiente. Os anticorpos foram obtidos da Cell Signaling Technology® (Danvers, MA, EUA), exceto GAPDH que foi obtido da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA). As membranas então foram lavadas novamente e submetidas à incubação com o segundo anticorpo anti-IgG conjugado com peroxidase, por 1-2 horas, em solução basal acrescida de 3% de leite desnatado à temperatura ambiente. Após nova sessão de lavagens, as

membranas foram incubadas com o substrato para peroxidase (kit ECL) por 1 min e imediatamente colocadas no foto-documentador por períodos variáveis de tempo, de 1 a 20 min. As intensidades das bandas auto-radiografias foram quantificadas por densitometria óptica, pelo programa Scion Image (Frederick, MD, EUA).

# 7.12 Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando GraphPad Prism statistics software package versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão da média (DPM). Foram analisados por ANOVA one-way e two-way seguido pelo pós-teste de Bonferroni. O valor de P<0,05 foi considerado estatisticamente significante.

### 8 RESULTADOS – PARTE 2

### Caracterização do modelo experimental

Redução na massa dos depósitos adiposos: o tratamento com injeções de doxorrubicina em doses fracionadas (2,5 mg/kg de peso a cada 72 horas) por 2 semanas e gavagens diárias de metformina (300 mg/Kg) não alteraram parâmetros como peso corporal e consumo alimentar dos animais (figura 17 A e B), bem como o peso dos tecidos musculares (sóleo e gastrocnêmio), fígado e tecido adiposo marrom (figura 18A-D). Porém, ao avaliar os depósitos adiposos, a doxorrubicina promoveu a redução da massa dos tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal. Além disso, a metformina não foi capaz de proteger essa perda de massa adiposa (figura 2E-H).



Figura 17 - Peso corporal (A) e consumo alimentar (B): os animais receberam injeções i.p. de cloridrato de doxorrubicina (grupo DOXO, n = 12) ou solução salina (grupo CTRL, n = 12) e gavagens diárias de metformina (grupo DOXO + MET, n = 12) ou solução PBS, além do grupo com restrição alimentar (grupo PF, n = 12) durante 2 semanas. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão (n=12). Os grupos foram comparados usando anova de uma via seguida do pósteste de Bonferroni.



Figura 18 - Peso do sóleo (A), gastrocnêmio (B), fígado (C), tecido adiposos (t.a.) marrom (D), t.a. epididimal (E), t. a. retroperitoneal (F), t. a mesentérico (G) e t.a. subcutâneo (H): os animais receberam injeções i.p. de cloridrato de doxorrubicina (grupo DOXO) ou sol. salina (grupo CTRL) e gavagens diárias de metformina (grupo DOXO + MET) ou sol. PBS, além do grupo com restrição alimentar (grupo PF) durante 2 semanas. Valores expressos em média  $\pm$ desvio padrão (n=12). Os grupos foram comparados usando anova de uma via seguida do pósteste de Bonferroni, sendo \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

Alterações plasmáticas: entre os parâmetros plasmáticos analisados, foi verificado que a doxorrubicina promoveu redução somente na glicemia (figura 19A) quando comparado com o grupo controle. Já o tratamento concomitante com metformina não promoveu alterações em nenhum dos parâmetros analisados (figura 19A-E). É importante ressaltar que a endotoxemia e os ácidos graxos livres não foram alterados por nenhum dos tratamentos (figura 19D e E).



Figura 19 - Dosagem de glicose (A), lactato enzimático (B), triacilgicerol (C), LPS (endotoxemia) (D), ácidos graxos livres (E) e adiponectinemia (F): os animais foram tratados durante 2 semanas com de cloridrato de doxorrubicina (grupo DOXO, n = 7) ou solução salina (grupo CTRL, n = 7) e gavagens diárias de metformina (grupo DOXO + MET, n = 6) ou solução PBS, além do grupo com restrição alimentar (grupo PF, n = 7). Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão (n=6-7). Os grupos foram comparados usando anova de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni, sendo \*p<0,05 e \*p<0,01.

### Efeitos na glicemia e captação de glicose

Nos testes de tolerância à insulina realizados *in vivo*, o tratamento com doxorrubicina promoveu apenas elevação da glicemia após 10 e 15 minutos de aplicação da insulina (figura 20A) decorrente do tratamento com a doxorrubicina, sem prejuízos na constante de decaimento (figura 20B). Novamente, quando associado com a metformina não promoveu efeitos na resposta glicêmica. E para avaliar a gliconeogênese, os animais foram submetidos ao teste de tolerância ao piruvato, porém também não houveram alterações entre os grupos estudados (figura 21A e B).

Inclusive, foi avaliada a captação de glicose *ex vivo* em adipócitos extraídos do tecido adiposo subcutâneo. Então, os adipócitos primários apresentaram redução na captação de glicose quando incubados com insulina por 30 minutos (figura 22B), mas em condição basal não foi verificada modificações entre os grupos estudados (figura 22A). Após estimulo de insulina, a metformina não promoveu efeitos inibitórios nessa captação da glicose reduzida.



Figura 20 - Curva do teste de tolerância à insulina (A) e constante de decaimento- KITT (B): os animais foram tratados com de cloridrato de doxorrubicina (grupo DOXO, n = 5) ou solução salina (grupo CTRL, n = 5) e com gavagens diárias de metformina (grupo DOXO + MET, n = 5) ou solução PBS, além do grupo com restrição alimentar (grupo PF, n = 5). Os animais receberam injeções i.p. de 0,5 UI/ Kg de solução de insulina após 24 horas da aplicação de cloridrato de doxorrubicina. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão (n=6-7). Os grupos foram comparados usando anova de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni, sendo a:\*\*p<0,001 CTRL versus DOXO. b:\*\*p<0,001 CTRL versus DOXO + MET. c:\*\*p<0,001 PF versus DOXO. d:\*\*p<0,001 PF versus DOXO + MET.



Figura 21 - Teste de tolerância ao piruvato (A) e constante de decaimento – KITT (B): os animais foram tratados com de cloridrato de doxorrubicina (grupo DOXO, n = 5) ou solução salina (grupo CTRL, n = 5) e com gavagens diárias de metformina (grupo DOXO + MET, n = 5) ou solução PBS, além do grupo com restrição alimentar (grupo PF, n = 4). Os animais receberam injeções i.p. de 2 g de piruvato de sódio/Kg de solução de insulina após 24 horas da aplicação de cloridrato de doxorrubicina. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Os grupos foram comparados usando anova de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni.



Figura 22 - Captação de 2-DG glicose em adipócitos extraídos do tecido adiposo subcutâneo basal (A) e com estímulo de insulina (100nMol) (B): os animais foram tratados com cloridrato de doxorrubicina (grupo DOXO) ou solução salina (grupo CTRL) e com gavagens diárias de metformina (grupo DOXO + MET) ou solução PBS, além do grupo com restrição alimentar (grupo PF) n = 4-5. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Os grupos foram comparados usando anova de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni, sendo \*p<0,05.

### Parâmetros histológicos do tecido adiposo subcutâneo:

Ainda que o tecido adiposo subcutâneo não tenha apresentado redução na sua massa, a doxorrubicina alterou a sua morfologia, como pode ser observado na coloração por HE (figura 23A). O medicamento quimioterápico reduziu a área (figura 23B), o diâmetro (figura 23C) e o perímetro (figura 23D) dos adipócitos, processos que não foram revertidos pela metformina. Inclusive, nos cortes histológicos pode ser observado aumento de colágeno, fibrose e maior infiltrado celular. E quando associado com metformina, sugerimos que há menor presença de fibrose quando corados em Picro Sirius Red, porém análises mais cautelosas devem ainda ser realizadas.

Α



DX\*NET

07

CTRL

¢<sup>¢</sup>

DX\*NET

07

Figura 23 - Histologia - coloração de hematoxilina e eosina (HE) e Picro Sirius Red (A) do tecido adiposo subcutâneo com avaliação da área (B), diâmetro (C) e perímetro (D): os animais foram tratados com de cloridrato de doxorrubicina (grupo DOXO) ou solução salina (grupo CTRL) e com gavagens diárias de metformina (grupo DOXO + MET) ou solução PBS, além do grupo com restrição alimentar (grupo PF). N = 3. Fotos obtidas por microcopia ótica na resolução de 40 x. Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão (n=3). Os grupos foram comparados usando anova de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni, sendo \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001. Seta amarela indica presença da fibrose e as setas pretas mostra o adipócito.

ę٤

CTR1

DX\*NET

07

CTR1

ę٤

#### Avaliação de adipocinas e quimiocinas

Além disso, o agente quimioterápico mesmo em doses menores provocou menor concentração de adiponectina e leptina, apesar de não ter alterado o consumo alimentar. A adiponectina no tecido adiposo subcutâneo (figura 24A) e circulante (figura 24B) foi menor nos animais tratados com doxorrubicina quando comparados com o grupo em restrição alimentar. Ainda, a metformina foi capaz de impedir essa redução somente no tecido adiposo subcutâneo. Já a leptina circulante também foi reduzida nos grupos DOXO e DOXO + MET quando comparados com os animais controles (figura 24C), ou seja, sem efeitos do tratamento concomitante.



Figura 24 - Dosagem de adiponectina no tecido adiposo subcutâneo (A), adiponectina no soro (B) e leptina no soro (C): os animais foram tratados durante 2 semanas com de cloridrato de doxorrubicina (grupo DOXO, n = 7) ou solução salina (grupo CTRL, n = 7) e gavagens diárias de metformina (grupo DOXO + MET, n = 6) ou solução PBS, além do grupo com restrição alimentar (grupo PF, n = 7). Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Os grupos foram comparados usando anova de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni, sendo \*p<0,05 e \*\*p<0,01.

Após visualizar as alterações nas imagens histológicas do tecido dos animais tratados com doxorrubicina e verificar que a metformina não foi protetora, foi analisado o conteúdo de quimiocinas que possuem funções de ativação e/ou quimioatração de células do sistema imune. Porém, a concentração de MCP-1, interferon-γ, IL-4, IL-8 e IL-12 não apresentaram diferença entre os grupos no depósito subcutâneo, demonstrando que os tratamentos não alteraram a produção de citocinas (figura 25A-E).



Figura 25 - Concentração de MCP-1(A), interferon- $\gamma$  (B), IL-4 (C), IL-8(D), IL-12(E) e no tecido adiposo subcutâneo: os animais foram tratados com cloridrato de doxorrubicina (grupo DOXO) ou solução salina (grupo CTRL) e com gavagens diárias de metformina (grupo DOXO + MET) ou solução PBS, além do grupo com restrição alimentar (grupo PF). N = 4. Valores expressos em média ± desvio padrão. Os grupos foram comparados usando anova de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni, sendo \*p<0,05 e \*\*p<0,01.

## Análise da expressão gênica

Ainda, foram avaliados efeitos do tratamento na expressão de genes envolvidos em processos fisiológicos importantes para a homeostasia do tecido adiposo. O tratamento da doxorrubicina provocou redução na expressão gênica de FAS (figura 26A), enzima essencial para o processo da lipogênese e um gene alvo do PPAR-γ. Além disso, o fator de transcrição da via da adipogênese CEBP-α (figura 26D) também apresentou o conteúdo de mRNA reduzido. Ambos os efeitos não foram revertidos pelo tratamento adjuvante. No entanto, mesmo doses menores de doxorrubicina alteram os genes relacionados com a lipogênese e adipogênese.

Em relação a expressão de ACC (figura 26B), SREBP (figura 26C) e Caspase-3 (figura 26E) não apresentaram diferenças entre os grupos.



Figura 26 - Expressão gênica de ácido graxo sintase (FAS) (A), Acetil CoA Carboxilase (ACC) (B), proteína ligadora do elemento regulatório de esteróis 1c (SREBP) (C), proteínas ligantes do amplificador CCAAT alpha (C/EBP) (D) e caspase 3 (E): os animais foram tratados com de cloridrato de doxorrubicina (grupo DOXO, n = 5) ou solução salina (grupo CTRL, n = 5) e com gavagens diárias de metformina (grupo DOXO + MET, n = 5) ou solução PBS, além do grupo com restrição alimentar (grupo PF, n = 5). Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão.

## Avaliação de expressão proteica

Visto as alterações de captação de glicose induzida pelo tratamento quimioterápico, foram analisadas a expressão de proteínas no tecido adiposo subcutâneo, porém não foi verificada alterações no conteúdo total de adiponectina, AKT total e AMPK fosforilada.



Figura 27- Expressão proteica de adiponectina, AKT total, GAPDH, AMPK fosforilada (p-AMPK): os animais foram tratados com de cloridrato de doxorrubicina (grupo DOXO) ou solução salina (grupo CTRL) e com gavagens diárias de metformina (grupo DOXO + MET) ou solução PBS, além do grupo com restrição alimentar (grupo PF).

# 9 DISCUSSÃO – PARTE 2

O tratamento com doses fracionadas de doxorrubicina não apresentou letalidade durante as 2 semanas de tratamento, ao contrário do que vemos com dose única (15 mg/kg) que a média de sobrevida é de 96 horas. Sendo assim, podemos afirmar que o uso da doxorrubicina, em doses baixas, é mais segura, pois não promove efeitos colaterais comumente encontrados quando são utilizadas doses altas, como por exemplo, resistência à insulina, hiperglicemia, redução (Lima et al., 2016).

Durante o protocolo experimental de duas semanas, os animais não apresentaram redução de peso corporal e do consumo alimentar. Apesar disso, a doxorrubicina promoveu redução significativa dos depósitos adiposos retroperitoneal e epididimal e a alimentação pareada (grupo PF) demonstrou aumento na massa desses órgãos (figura 18), sendo considerado que seria uma adaptação ao menor consumo alimentar (Arner; Spalding, 2010). Esses efeitos não foram revertidos pela metformina.

O grupo *pair-feeding* que consumiu a mesmo valor energético total que os grupos que receberam doxorrubicina, nos permitem excluir a possibilidade desses efeitos resultarem da ingestão alimentar, pois a ingestão no grupo doxorrubicina tende a ser reduzida (figura 17).

Como visto no nosso estudo inicial supracitado, a AMPK teve uma diminuição acentuada da expressão proteica de AMPK no resíduo de fosforilação thr172A, além de hiperglicemia e hiperinsulinemia (Lima et al., 2016). Inclusive Ghauthier et al., (2009) demonstraram que existe uma forte relação entre a diminuição da atividade da AMPK no tecido adiposo e a resistência à insulina em sujeitos obesos.

A metformina é amplamente conhecida como um fármaco potente para diminuição da intolerância à insulina e à glicose (Jenkins et al., 2013), além disso, este fármaco é capaz de aumentar a atividade da AMPK no tecido adiposo branco e em linhagem secundária de adipócito (3T3L1), por induzir a fosforilação desta no seu resíduo thr172 (Yang et al., 2013). No entanto, nesse modelo de doses fracionadas de doxorrubicina, o tratamento não apresentou uma diminuição da fosforilação da AMPK no resíduo thr 172, e tampouco a metformina foi efetiva em modular a sua fosforilação. Apesar de esse resultado ser contraditório com os achados da literatura que mostram uma modulação positiva da AMPK pelo tratamento com metformina no tecido adiposo branco, podemos explicar pela dose, já que Yang et al., (2013) utilizaram doses diárias de 400 mg/kg de peso, enquanto nós usamos 300 mg/kg, e também o possível tempo

de sacrifício após a última dose, já que nós realizamos a eutanásia do animal 24 horas após a última dose.

Interessantemente a adição de metformina na ração de animais envelhecidos não foi suficiente para resgatar ou atenuar a diminuição da expressão da AMPK fosforilada no resíduo thr172A (Mennes et al., 2014), mostrando que certas alterações provenientes do processo de envelhecimento podem afetar a sensibilidade do tecido adiposo ao tratamento com metformina.

Como já visto no primeiro procedimento experimental deste trabalho, a adiponectina foi diminuída no soro de camundongos tratados com doxorrubicina, apresentando um perfil bastante semelhante na expressão proteica de adiponectina no tecido adiposo subcutâneo (Figura 24). A adiponectina é um hormônio que atua como um importante sensibilizador à insulina (Halleux et al., 2001; Maeda et al., 2001; Nishizawa et al., 2002). Essa redução da adiponectina pode estar relacionada com algumas alterações apresentadas no teste de intolerância á insulina. Após 10 e 15 minutos da aplicação de insulina (0,5 UI/Kg), os grupos tratados com o quimioterápico apresentaram glicemia elevada (figura 20), demonstrando um efeito agudo da droga que possivelmente pode alterar a captação e a utilização da glicose pelas células; e novamente a metformina não foi capaz de reverter esse quadro.

Interessantemente muitos estudos vêm demonstrando que o tratamento com metformina induz um aumento da adiponectinemia em sujeitos obesos não diabéticos, em mulheres com síndrome do ovário policístico e em pacientes que apresentam o quadro de diabetes tipo 2 (Garcia et al., 2014; Kong et al., 2015; Su et al., 2016).

Essa diminuição da expressão proteica de adiponectina no tecido adiposo subcutâneo, junto com a diminuição da concentração sérica pode ser causado pela profunda inibição do PPAR-γ pela doxorrubicina, apesar de não termos realizado a expressão dessa proteína nesse modelo. Arunachalam et al., (2013) mostraram que a doxorrubicina leva a inibição desse fator de transcrição, como foi também visto no nosso primeiro protocolo.

O PPAR-γ, além de ser responsável pelo controle transcricional da adiponectina, controla a expressão de GLUT-4 na célula adiposa (Halleux et al., 2001, Maeda et al., 2001, Nishizawa et al., 2002). Portanto mesmo em doses fracionadas de doxorrubicina as alterações verificadas no teste de tolerância à insulina e na captação de glicose pelos adipócitos primários do tecido adiposo subcutâneo (figura 22) podem estar relacionadas com a expressão reduzida de PPAR-γ, que possui então papel chave na homeostase glicêmica (Liao et al., 2007). Corroborando com os dados de

captação de glicose e a curva glicêmica desses animais, foi visto o aumento da glicemia dos animais tratados com doxorrubicina, mesmo no grupo com tratamento adjuvante de metformina (figura 19).

Outro mecanismo que pode estar causando a depleção da adiponectina circulante e sua produção no tecido adiposo é a perda de adipócitos causado pela doxorrubicina, já que os animais tratados com esse quimioterápico apresentam uma profunda diminuição no número, área, perímetro e diâmetro do adipócito. Com isso, a perda de adipócitos pode diminuir a quantidade de céluals capazes de produzir a adiponectina, assim como fica evidenciado também com a leptina (figura 24). A concentração de leptina também é associada ao tamanho do adipócito, ou seja, células adiposas menores produzem menos leptina (Della-Fera et al., 2001).

Os adipócitos observados nas colorações de H&E possuem redução do diâmetro, perímetro e área quando tratados com doxorrubicina além de apresentar fibrose conforme pode ser visualizado pela coloração de Picro Sirius (figura 23). Já no grupo com tratamento adjuvante, pode ser sugerido uma atenuação da fibrose porém, para confirmação desse dado, ainda são necessárias outras análises e aumento do número de animais.

A fibrose no tecido adiposo é definida pelo acúmulo de proteínas da matriz extracelular. Diversas doenças podem levar à presença de fibrose e eventualmente a disfunções e inclusive a morte celular. A matriz extracelular rica em fibrilas de colágeno e fibronectina são necessárias para manter a arquitetura fisiológica do tecido adiposo e para diferenciação dos adipócitos (Divoux; Clément, 2011).

O intenso remodelamento da matriz extracelular no tecido adiposo, na literatura, é associado ao ganho de peso e também à perda brusca de peso corporal. Indivíduos obesos pós-cirurgia bariátrica com rápida perda de peso, também apresentam aumento da expressão de mais de 200 genes relacionados com a composição da matriz extracelular e também a redução dos genes relacionados a inflamação (Clement et al., 2004).

Interessantemente foi possível observar que a metformina foi capaz de atenuar o processo de fibrose, na literatura está bem claro que este fármaco é capaz de induzir a diminuição da fibrose em diferentes tecidos associados a algumas morbidades. Camundongos submetidos a obstrução uretral, apresentam uma grande fibrose renal provocada principalmente pela ativação de ERK e TGF-β (quinase regulada por sinal extracelular e fator de crescimento de transformação beta), mas a metformina é capaz de inibir esse processo fibrinolítico (Shen et al., 2016). Corroborando com esses

achados, a metformina é capaz de inibir a produção de TGF-β por mecanismo controlado pela AMPK em fibroblastos renais, diminuindo assim a produção de colágeno (Lu et al., 2015). Por fim, a metformina também é capaz de inibir a fibrose pulmonar induzida por gefitinib em animais (Li et al., 2015).

Além da regulação do processo de fibrose essas proteínas secretadas na matriz extracelular podem modular a função celular através de interações com receptores, proteases e hormônios. Dentre essas proteínas, a proteína secretada de natureza ácida rica em cisteína denominada SPARC, ao ser inibida, reduz a adipogênese e a expressão de PPAR- $\gamma$ , C/EBP- $\alpha$  e C/EBP- $\beta$  (Divoux; Clément, 2010; Mi et al., 2006). No entanto, neste modelo experimental a doxorrubicina não alterou os genes adipogênicos, porém reduziu FAS, enzima determinante do processo lipogênico (figura 26).

A lipogênese é importante para a manutenção do tecido adiposo, no entanto, com redução da FAS e da captação de glicose pelos adipócitos, faz com que haja menor quantidade de substratos para as células manterem essa via anabólica em evidência (Brunengraber et al., 2003).

Em contraste ao aumento da fibrose e infiltrados no tecido adiposo subcutâneo, não houve alteração do perfil inflamatório em nenhum dos grupos avaliados. O fator qumioatraente de macrófagos (MCP-1) não apresentou diferença entre os grupos estudados neste depósito adiposo, bem como IL-4, IL-8 e IL-12 (respectivamente interleucinas, 4, 8 e 12) e interferon-γ (figura 25). Essas quimiocinas são secretadas pelas células do sistema imunitário e tem funções de quimiotração de outros tipos celulares. Enquanto o interferon-γ é capaz de ativar células fagocitárias como macrófagos e células dendríticas, a IL-8 é quimioatrativo de neutrófilos. Já a IL-12 estimula a quimioatração e diferenciação de linfócitos e a IL-4 é clássica de linfócitos T auxiliadores (Redpath et al., 2015; Sun et al., 2015). No entanto, neste depósito adiposo não houve efeitos decorrentes do uso da doxorrubicina e do tratamento concomitante.

Portanto, os resultados deste segundo modelo experimental sugerem um impacto grande na homeostase do tecido adiposo mesmo com o uso de doses fracionadas de doxorrubicina. A metformina não foi capaz de atenuar os prejuízos causados pelo quimioterápico, a não ser a diminuição do processo de fibrose deste tecido. Sendo assim, outras estratégias devem ser consideradas para que a quimioterapia não promova sintomas associadas a disfunção do tecido adiposo,
buscando outras terapias que não prejudiquem a qualidade de vida dos pacientes em tratamento contra o câncer.

## 10 CONCLUSÃO

Os efeitos indesejados da quimioterapia podem ser desencadeados pelas profundas alterações na homeostasia do tecido adiposo branco, pois o prejuízo das funções endócrinas e metabólicas deste tecido leva a redução na qualidade de vida dos pacientes.

O tratamento com doses menores de 2,5 mg/kg fracionadas a cada 72 horas por 2 semanas, é capaz de modificar funções metabólicas no depósito subcutâneo. Esse tratamento fracionado é mais seguro do que utilizar doses mais elevadas, quanto aos aspectos metabólicos do tecido adiposo. Porém, os efeitos tóxicos são semelhantes ao tratamento agudo com alta dose de doxorrubicina de 15 mg/kg. Além disso, os efeitos do tratamento com a metformina são muito pontuais e não reverteu a maioria dos efeitos colaterais provocados pelo agente quimioterápico.

Visto os prejuízos provocados pelo tratamento com doxorrubicina no tecido adiposo, novas estratégias adjuvantes ao tratamento quimioterápico devem ser pesquisadas, a fim de diminuir os efeitos colaterais e também impulsionar o entendimento da ação das drogas quimioterápicas sobre este tecido. O tecido adiposo tem uma importante interação com diversos outros órgãos através de suas funções endócrinas que são essenciais ao metabolismo. Porém, apesar de ser um tecido metabolicamente importante, não é alvo de estudos sobre a toxicidade de agentes quimioterápicos.

Para concluir, os resultados coletivamente demonstram que a doxorrubicina gera um alto impacto sobre a homeostasia do tecido adiposo branco, nas funções endócrinas e metabólicas, de maneira que o tratamento com a metformina não reverteu esses efeitos deletérios.

## **REFERÊNCIAS\***

Agostini M, Schoenmakers E, Mitchell C, et al. Non-DNA binding, dominant-negative, human PPARgamma mutations cause lipodystrophic insulin resistance. Cell Metab. 2006;4(4):303-11.

Al-Shabanah OA, El-Kashef HA, Badary OA, et al. Effect of streptozotocin induced hyperglycaemia on intravenous pharmacokinetics and acute cardiotoxicity of doxorubicin in rats. Pharmacol Res. 2000;41(1):31-7.

Argiles JM, Busquets S, Stemmler B, Lopez-Soriano FJ. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. Nat Rev Cancer. 2014;14(11):754-62.

Arner P, Spalding KL. Fat cell turnover in humans. Biochem Biophys Res Commun 2010;396:101–4.

Arozal W, Suyatna FD, Juniantito V, et al. The Effects of Mangiferin (Mangiferaindica L) in Doxorubicin-induced Cardiotoxicity in Rats. Drug Res (Stuttg). 2015;65(11):574-80

Arunachalam S1, Kim SY, Kim MS et al. Adriamycin inhibits adipogenesis through the modulation of PPARgamma and restoration of adriamycin-mediated inhibition of adipogenesis by PPARgamma over-expression. Toxicol Mech Methods. 2012;22(7): 540-6.

Arunachalam S, Tirupathi Pichiah PB, Achiraman S. Doxorubicin treatment inhibits PPARgamma and may induce lipotoxicity by mimicking a type 2 diabetes-like condition in rodent models." FEBS Lett. 2013;587(2):105-10.

Ayla S, Seckin I, Tanriverdi G, et al. Doxorubicin induced nephrotoxicity: protective effect of nicotinamide. Int J Cell Biol 2011; 2011:390238.

Asensio-López MC, Lax A, Pascual-Figal DA, et al. Metformin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity: involvement of the adiponectin cardiac system. Free Radic Biol Med. 2011;51(10):1861-71.

Belakhlef A, Jani C, Church C, et al. Fat necrosis mimicking B-cell lymphoma: a PET/CT and FDG study. Clin Nucl Med. 2008;33(4):271-2

Benjamin RS, Wiernik PH, Bachur NR.Adriamycin chemotherapy--efficacy, safety, and pharmacologic basis of an intermittent single high-dosage schedule. Cancer. 1974;33(1): 19-27.

Bing C, Trayhurn P. New insights into adipose tissue atrophy in cancer cachexia. Proc Nutr Soc. 2009;68(4):385-92.

\*De acordo com:

International Comitee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\_requirements.html

Bing C. Lipid mobilization in cachexia: mechanisms and mediators. Curr Opin Support Palliat Care. 2011;5(4):356-60.

Brunengraber DZ, McCabe BJ, Kasumov T, et al. Influence of diet on the modeling of adipose tissue triglycerides during growth. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2003;285(4):E917-25.

Chang YL, Lee HJ, Liu ST, et al. Different roles of p53 in the regulation of DNA damage caused by 1,2-heteroannelated anthraquinones and doxorubicin. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2011;43:1720–8

Chaves VE, Frasson D, Martins-Santos ME, et al. Glyceroneogenesis is reduced and glucose uptake is increased in adipose tissue from cafeteria diet-fed rats independently of tissue sympathetic innervation. J. Nutr. 2006;136, 2475–80

Clement K, Viguerie N, Poitou C, et al. Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. Faseb J 2004;18:1657–69.

Czech M.P., Tencerova M., Pedersen D.J. et al. Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage. Diabetologia. 2013;56(5):949-64.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate- phenol- chloroform extraction. Anal.Biochem. 1987;162(1):156-9.

Daval M, Diot-Dupuy F, Bazin R, Anti-lipolytic Action of AMP-activated Protein Kinase in Rodent Adipocytes". J Biol Chem. 2005;280(26):25250-7.

Daval M1, Ferré P, Foufelle F. AMPK, an active player in the control of metabolism. J Soc Biol. 2006;200(1):99-105.

Das SK, Eder S, Schauer S, et al. Adipose triglyceride lipase contributes to cancerassociated cachexia. Science. 2011;333(6039):233-8.

Della-Fera MA, Qian H, Baile CA. Adipocyte apoptosis in the regulation of body fat mass by leptin. Diabetes Obes. Metab. 2001;3:299-310

Di Marco A, Gaetani M, Scarpinato B.. Adriamycin (NSC-123,127): a new antibiotic with antitumor activity. Cancer Chemother Rep. 1969;53(1):33-7.

Divoux A, Clément K.Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue. Obesity reviews. 2011;12(5), e494–e503

El-Sheikh AA, Morsy MA, Mahmoud MM, et al. Protective mechanisms of coenzyme-Q10 may involve up-regulation of testicular P-glycoprotein in doxorubicin-induced toxicity. Environ ToxicolPharmacol. 2014;37(2):772-81.

Fang J, Nakamura H, Iyer AK. Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy. J Drug Target. 2007;15(7-8):475-86.

Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI et al. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism]. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2006;50(2):216-29.

Frøsig C, Pehmøller C, Birk JB, et al. Exercise-induced TBC1D1 Ser237 phosphorylation and 14-3-3 protein binding capacity in human skeletal muscle. J. Physiol. 2010;588:4539–48

Foretz M, Viollet B. Regulation of hepatic metabolism by AMPK." J Hepatol 2011; 54(4):827-9.

García García JA, Lara Padilla E, Alvarez Hernández E, et al. Metformin increases serum concentration of high molecular weight (HMW-adiponectin) in nondiabetic obese subjects. Gac Med Mex. 2014;150(4):324-33.

Gauthier MS, Mott M, Gokce N, et al. Decreased AMP-activated protein kinase activity is associated with markers of inflammation and infiltration of immune cells in visceral and subcutaneous adipose tissue, and with whole-body insulin resistance in obese patients. Obesity. 2009;17:s93.

Gorselink M, Vaessen SF, van der Flier LG, et al. Mass-dependent decline of skeletal muscle function in cancer cachexia. 2006; Muscle Nerve 33(5):691-3.

Gratia S, Kay L, Potenza L, Seffouh A, Novel-Chaté V, Schnebelen C, Sestili P, Schlattner U, Tokarska-Schlattner M. Inhibition of AMPK signalling by doxorubicin: at the crossroads of the cardiac responses toenergetic, oxidative, and genotoxic stress. Cardiovasc Res. 2012;95(3):290-9.

Gustafson B, Smith U. Regulation of white adipogenesis and its relation to ectopic fat accumulation and cardiovascular risk. Atherosclerosis. 2015;241(1):27-35.

Hadad S, Iwamoto T, Jordan L et al. Evidence for biological effects of metformin in operable breast cancer: a pre-operative, window-of-opportunity, randomized trial. Breast Cancer Res Treat. 2011;128(3):783-94.

Hajjaji N, Couet C, Besson P et al. DHA effect on chemotherapy-induced body weight loss: an exploratory study in a rodent model of mammary tumors." Nutr Cancer. 2012; 64(7):1000-7.

Halabi S, Ou SS, Vogelzang NJ et al. Inverse correlation between body mass index and clinical outcomes in men with advanced castration-recurrent prostate cancer. Cancer. 2007;110(7):1478-84.

Halleux CM, Takahashi M., Delporte ML et al. Secretion of adiponectin and regulation of apM1 gene expression in human visceral adipose tissue. Biochem Biophys Res Commun. 2001; 288, 1102–7.

Hardie, DG, Ross FA, Hawley SA."AMP-activated protein kinase: a target for drugs both ancient and modern. Chem Biol. 2012;19(10): 1222-36.

Hawley SA, Ross FA, Chevtzoff C et al. (2010). "Use of cells expressing gamma subunit variants to identify diverse mechanisms of AMPK activation." Cell Metab 11(6): 554-65.

Hesse E, Taubmann G. Die Wirkung des Big anids und seiner I)erivate auf den Zuckerstoffwechsel. Archiv fur Experimentelle Pathologie und Pharmakologie. 1929; 290-308.

Horton JD, Shimomura I, Ikemoto S, et al. Overexpression of sterol regulatory elementbinding protein-1a in mouse adipose tissue produces adipocyte hypertrophy, increased fatty acid secretion, and fatty liver. J Biol Chem. 2003; 278:36652–60

Hosono K, Endo H, Takahashi H et al. Metformin suppresses colorectal aberrant crypt foci in a short-term clinical trial. Cancer Prev Res (Phila). 2010; 3(9): 1077-83.

Hyvonen MT, Spalding KL. Maintenance of white adipose tissue in man. Int J Biochem Cell Biol. 2014;56:123-32.

Inca – Instituto Nacional do Câncer [internet]. Rio de Janeiro: o que é?; 2015a [cited 2015 dec 4]. Avaliable from: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee

Inca – Instituto Nacional do Câncer [internet]. Rio de Janeiro: Quimioterapia; 2015b [cited 2015 dec 4]. Avaliable from: http://www.inca.gov.br/conteudo\_view.asp?ID=101

Kazama K, Okada M, Yamawaki H. Adipocytokine, omentin inhibits doxorubicininduced H9c2 cardiomyoblasts apoptosis through the inhibition of mitochondrial reactive oxygen species. Biochem Biophys Res Commun. 2015;457(4):602-7.

Kelishomi RB, Ejtemaeemehr S, Tavangar SM, et al. Morphine is protective against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rat. Toxicology. 2008;243(1-2):96-104.

Ko C, Chaudhry S. The need for a multidisciplinary approach to cancer care."J Surg Res. 2002;105(1):53-7.

Kobashigawa LC, Xu YC, Padbury JF et al. Metformin protects cardiomyocyte from doxorubicin induced cytotoxicity through an AMP-activated protein kinase dependent signaling pathway:an in vitro study. Plos One. 2014;15;9(8):e104888.

Kong W, Niu X, Zeng T, et al. Impact of treatment with metformin on adipocytokines in patients with polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. Plos One. 2015;10(10):e0140565.

Koutnikova H, Cock T-A, Watanabe M, et al. Compensation by the muscle limits the metabolic consequences of lipodystrophy in PPAR $\gamma$  hypomorphic mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(24):14457–62

Kwom H, Pessin JE. Adipokines mediate inflamation and insulin resistance." Front Endocrinol 2013;4:71.

Janani C, Ranjitha Kumari BD. PPAR gamma gene--a review. Diabetes Metab Syndr. 2015;9(1):46-50.

Jenkins Y, Sun TQ, Markovtsov V, et al. AMPK activation through mitochondrial regulation results in increased substrate oxidation and improved metabolic parameters in models of diabetes. PLoS One. 2013;8(12):e81870.

Jin Y, McFie PJ, Banman SL, et al. Diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2) and monoacylglycerol acyltransferase-2 (MGAT2) interact to promote triacylglycerol synthesis. J Biol Chem. 2014;289(41):28237-48.

Jones JR, Barrick C, Kim KA, et al. Deletion of PPAR $\gamma$  in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(17):6207-12.

Junqueira LCU, Carneiro J. Histologia Básica. 11ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. 524 p.

Laemmli UK.Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227(5259): 680-85.

Lai HC, Yeh YC, Ting CT, et al. (2010). "Doxycycline suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and cellular apoptosis in mouse hearts." Eur J Pharmacol. 2010;644(1-3):176-87

Landman GW, Kleefstra N, van Hateren KJ et al. (2010). "Metformin associated with lower cancer mortality in type 2 diabetes: ZODIAC-16." Diabetes Care 33(2): 322-6.

Lehrke M, Lazar MA. The many faces of PPARgamma. Cell. 2005;123(6):993-9.

Li HL, Xiao L, Wang C, et al. Epigenetic regulation of adipocyte differentiation and adipogenesis. J Zhejiang (Biomed & Biotechnol) 2010;11(10):784-91

Li L, Huang W, Li K, et al. Metformin attenuates gefitinib-induced exacerbation of pulmonary fibrosis by inhibition of TGF- $\beta$  signaling pathway. Oncotarget. 2015;6(41):43605-19.

Liao W, Nguyen MT, Yoshizaki T, et al. Suppression of PPAR-gamma attenuates insulin-stimulated glucose uptake by affecting both GLUT1 and GLUT4 in 3T3L1 adipocytes. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 2007;293:E219–E27

Lieffers JR, Mourtzakis M, Hall KD et al. A viscerally driven cachexia syndrome in patients with advanced colorectal cancer: contributions of organ and tumor mass to whole-body energy demands. Am J Clin Nutr. 2009;89(4):1173-9.

Lima EAL, Yamashida AS, Pimentel GD, et al. Doxorrubicin caused severe hyperglycemia and insulin resistance, mediated by inhibition in AMPk signaling in skeletal muscle. J Cachexia Sarcopenia Muscle. [In press].

Lipshultz SE, Cochran TR, Franco VI et al. Treatment-related cardiotoxicity in survivors of childhood cancer.Nat Rev Clin Oncol. 2013;10(12):697-710.

Longmuir A., Sherry MH, Janie LB, et al. Liposomal delivery of doxorubicin to hepatocytes in vivo by targeting heparan sulfate. Int J Pharm. 2009;382(1-2): 222–33.

Lu J, Shi J, Li M, Gui B, et al. Activation of AMPK by metformin inhibits TGF-β-induced collagen production in mouse renal fibroblasts. Life Sci. 2015;127:59-65.

Maeda, N., Takahashi, M., Funahashi, T. et al. PARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. Diabetes. 2001;50:2094–99

Mantzoros CS, Magkos F, Brinkoetter M, et al. Leptin in human physiology and pathophysiology. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2011;301(4):E567-E84.

Maruyama S, Shibata R, Ohashi K, et al. Adiponectin ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity through Akt protein-dependent mechanism. J Biol Chem. 2011;286(37):32790-800.

Masoodi M, Kuda O, Rossmeisl M, et al. Lipid signaling in adipose tissue: Connecting inflammation & metabolism. Biochim Biophys Acta. 2015;1851(4):503-18.

Mennes E, Dungan CM, Frendo-Cumbo S, et al.Aging-associated reductions in lipolytic and mitochondrial proteins in mouse adipose tissue are not rescued by metformin treatment. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2014;69(9):1060-8.

Mi Z, Guo H, Wai PY, et al. Integrin-linked kinase regulates osteopontin-dependent MMP-2 and uPA expression to convey metastatic function in murine mammary epithelial cancer cells. Carcinogenesis 2006;27:1134–45.

Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, et al. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity." Pharmacol Rev. 2004;56(2):185-229.

Moon HS, Chamberland JP, Diakopoulos KN, et al. Leptin and amylin act in an additive manner to activate overlapping signaling pathways in peripheral tissues: in vitro and ex vivo studies in humans. Diabetes Care. 2011;34:132–8.

Murdolo, G, Bartolini D, Tortoioli C, et al. Lipokines and oxysterols: Novel adiposederived lipid hormones linking adipose dysfunction and insulin resistance." Free Radic Biol Med. 2013;16 (65C):811-20.

Niraula S, Dowling RJ,Ennis M et al.Metformin in early breast cancer: a prospective window of opportunity neoadjuvant study. Breast Cancer Res Treat. 2012; 135(3): 821-30.

Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K et al. Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. Diabetes. 2002;51:2734–41.

Ntambi JM, Kim YC. Adipocyte differentiation and gene expression." J Nutr. 2000;130(12):3122S-6S.

Nye CK, Hanson RW, Kalhan SC. Glyceroneogenesis is the dominant pathway for triglyceride glycerol synthesis in vivo in the rat. J Biol Chem. 2008;283(41):27565-74.

Oakhill, J. S., R. Steel, Chen ZP et al. AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. Science. 2011;332(6036):1433-5.

Obregon MJ. Adipose tissues and thyroid hormones. Front Physiol. 2014;5:479.

Orci L, Cook WS, Ravazzola M, et al. Rapid transformation of white adipocytes into fat oxidizing machines. Proc Natl Acad Sci. 2004;101:2058-63.

Panjrath GS, Patel V, Valdiviezo CI, et al. Potentiation of Doxorubicin cardiotoxicity by iron loading in a. rodent model. J Am Coll Cardiol. 2007; 49:2457–64.

Pichiah PB, Sankarganesh A, Kalaiselvi S, et al.Adriamycin induced spermatogenesis defect is due to the reduction in epididymal adipose tissue mass: a possible hypothesis. Med Hypotheses. 2012;78(2):218-20.

Queiroz JCF, Vale MICA, Curi R et al. Controle da adipogênese por ácidos graxos. Arq Bras Endocrinol Metab. 2009;53:582-94.

Rao, VA. Iron Chelators with Topoisomerase-Inhibitory Activity and Their Anticancer Applications. Antioxid Redox Signal. 2013; 18(8): 930–55.

Redpath SA1, Heieis G1, Perona-Wright G2. Spatial regulation of IL-4 signalling in vivo. Cytokine. 2015;75(1):51-6.

Richardson DS, Johnson SA. Anthracyclines in haematology: preclinical studies, toxicity and delivery systems. Blood Rev. 1997;11(4):201-23.

Rochette L, Guenancia C, Gudjoncik A, et al. Anthracyclines/ trastuzumab: new aspects of cardiotoxicity and molecular mechanisms. Trends Pharmacol Sci. 2015;36(6):326-48.

Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis." Nature. 2006;444(7121): 847-53.

Rosen ED, Spiegelman BM. What We Talk About When We Talk About Fat. Cell. 2014; Cell. 2014;156(1-2):20-44.

Rossmeisl M, Jikava ZM, Kuda O et al. Metabollic effects of n-3 PUFA as phospolipids are superior to triglycerides in mice fed a high fat diet possible role of endocanabinoids. PLoS One. 2012;7(6):e38834.

Saad MJ, Carvalho CR, Thirone AC et al. Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. J Biol Chem. 1996; 271(36): 22100-4.

Saponaro C, Gaggini M, Carli F, et al. The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis: A Critical Point in Metabolic Homeostasis. Nutrients. 2015; 7(11):9453-74.

Schondorf T, Musholt PB, Hohberg C, et al. The fixed combination of pioglitazone and metformin improves biomarkers of platelet function and chronic inflammation in type 2 diabetes patients: results from the PIOfix study. J Diabetes Sci Technol. 2011;5(2):426-32.

Shapiro AL, Vinuela E, Maizel JV Jr. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. BiochemBiophys Res Commun. 1967; 28(5): 815-20.

Shehzad A, Iqbal W, Shehzad O et al. Adiponectin: regulation of its production and its role in human diseases. Hormones (Athens). 2012;11(1):8-20.

Shen Y, Miao N, Xu J, et al. Metformin prevents renal fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction and inhibits ang II-induced ECM production in renal fibroblasts. Int J Mol Sci. 2016;17(2).pii.146

Sheu SH, Kaya T, Waxman DJ, et al. Exploring the binding site structure of the PPAR gamma ligand-binding domain by computational solvent mapping. Biochemistry. 2005;44(4):1193-209.

Shimomura I, Hammer RE, Richardson JA et al. Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy.Genes Dev.1998;12, 3182–94

Shu Y, Sheardown SA, Brown C et al. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. J Clin Invest. 2007; 117(5): 1422-31.

Singla, S., Kumar, N. R., Kaur, J. In vivo Studies on the Protective Effect of Propolis on Doxorubicin-Induced Toxicity in Liver of Male Rats. Toxicol Int. 2014;21(2):191-5.

Sim A., Hardie DG. The low activity of acetyl-CoA carboxylase in basal and glucagon stimulated hepatocytes is due to phosphorylation by the AMP-activated protein kinase and not cyclic AMP – depend protein kinase. FEBS Lett. 1988;233(2):294-8.

Smitika K, Marešová D. Adipose Tissue as an Endocrine Organ: An Update on Proinflammatory and Anti-inflammatory Microenvironment. Prague Med Rep. 2015;116(2):87-111.

Stanford KI, Middelbeek RJ, Townsend KL, et al. A Novel Role for Subcutaneous Adipose Tissue in Exercise-Induced Improvements in Glucose Homeostasis. Diabetes. 2015;64(6):2002-14.

Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in Health and Disease." Physiol Rev. 2009; 89(3): 1025-78.

Stockli J, Fazakerley DJ, James DE. GLUT4 exocytosis. J Cell Sci. 2011;124(Pt 24):4147-59.

Su JR, Lu ZH, Su Y, et al. Relationship of serum adiponectin levels and metformin therapy in patients with type 2 diabetes. Horm Metab Res. 2016. [In press].

Sun L, He C, Nair L, et al. Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease. Cytokine. 2015;75(2):249-55.

Szewczyk-Golec K, Woźniak A, Reiter RJ. Inter-relationships of the chronobiotic, melatonin, with leptin and adiponectin: implications for obesity. J Pineal Res. 2015;59(3):277-91.

Tacar O, Dass CR. Doxorubicin-induced death in tumour cells and cardiomyocytes: is autophagy the key to improving future clinical outcomes? J Pharm Pharmacol. 2013;65(11):1577-89.

Takada I, Makishima M. PPARgamma ligands and their therapeutic applications: a patent review (2008 - 2014). Expert Opin Ther Pat. 2015;25(2):175-91.

Tewey KM, Rowe TC, Yang L, et al. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. Science. 1984;226(4673): 466-8.

Thorn CF, Oshiro C, Marsh S, et al. Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. Pharmacogenet Genomics. 2011;21(7):440-6.

Tomicic MT, Kaina B. Topoisomerase degradation, DSB repair, p53 and IAPS in cancer cell resistance to camptothecin-like topoisomerase I inhibitors. Biochim Biophys Acta. 2013; 1835:11–27

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci. 1979;76(9): 4350-4.

Viollet B, Guigas B, San Garcia N, et al. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. Clin Sci (Lond). 2012;122(6): 253-70.

Weyer C, Funahashi T, Tanaka S, et al. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86(5):1930-5.

Word health organzation [internet]. Cancer, 2015a [cited 2015 dec 4]. Avaliable from: http://www.who.int/cancer/en/

Word health organzation [internet]. Cancer country profiles, 2015b [cited 2015 dec 4]. Available from: http://www.who.int/cancer/country-profiles/bra\_en.pdf

Xu Y, Liu Z, Sun J, et al. Schisandrin B prevents doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity and enhances its anticancer activity in vivo. PLoS One. 2011;6(12):e28335.

Yang S, Lv Q, Luo T et al. Metformin inhibits expression and secretion of PEDF in adipocyte and hepatocyte via promoting AMPK phosphorylation. Mediators Inflamm. 2013; 2013:429207.

Zechner R, Kienesberger PC, Haemmerle G, et al. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. J Lipid Res. 2009;50(1):3-21.

Zolfagharzadeh F, Roshan VD. Pretreatment hepatoprotective effect of regular aerobic training against hepatic toxicity induced by Doxorubicinin rats. Asian Pac J Cancer Prev. 2013;14(5):2931-6.