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

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 qual 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 adipocytes 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.

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:

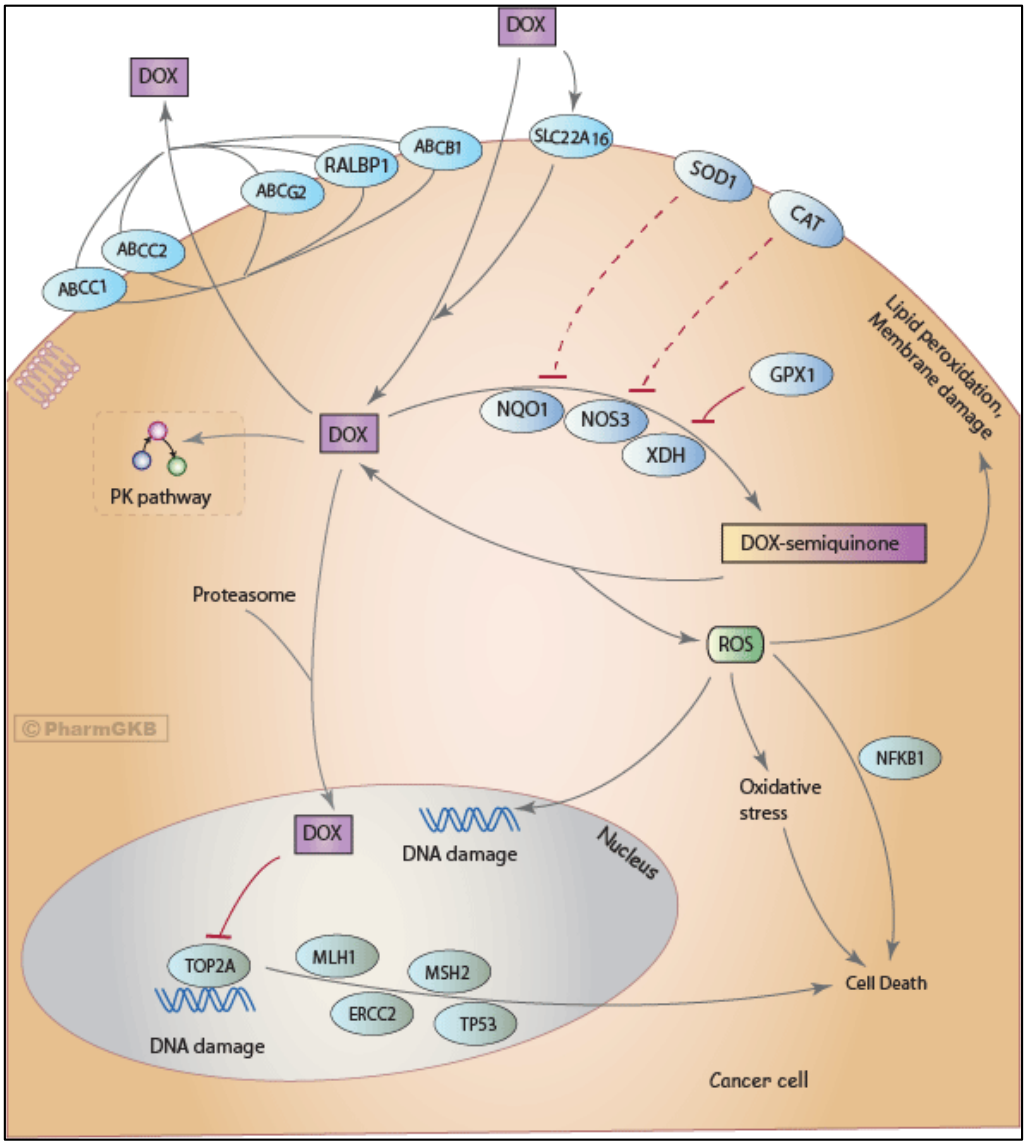

Figura 1 - Vias de ação da doxorrubicina (Thorn et al., 2010).

Além disso, como a cardiotoxidade já é um efeito amplamente estudado, sabe-se que a doxorrubicina nos cardiomiócitos pode se ligar ao ferro, gerando uma molécula conjugada com ferro (Fe^{2+}) que pode ser reduzida formando ion férrico (Fe^{3+}) 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_2O_2, 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^2 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).

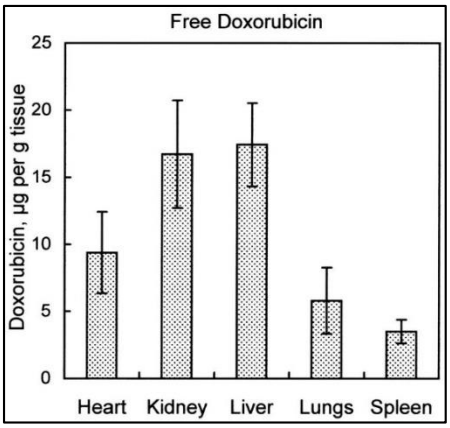

Figura 2 - Biodistribuição da doxorrubicina (Longmuir et al., 2009)

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:

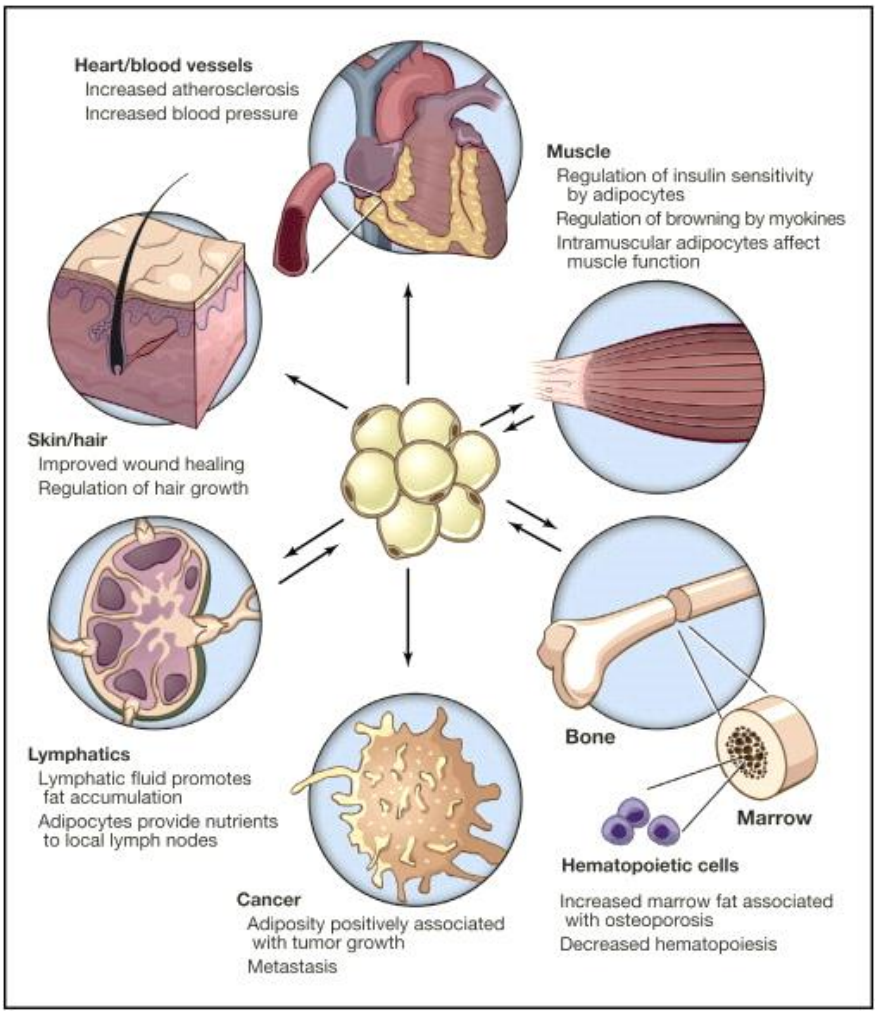

Figura 3 - Relação do tecido adiposo com outros tecidos. (Rosen; Spielgman, 2014)

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 pré-adipócitos, 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-β e -δ (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-γ e C/EBP-α, iniciando então a diferenciação terminal. O SREBP1c é um importante regulador do PGC1-α (co-ativador um alfa do receptor ativo do PPAR-γ) 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).

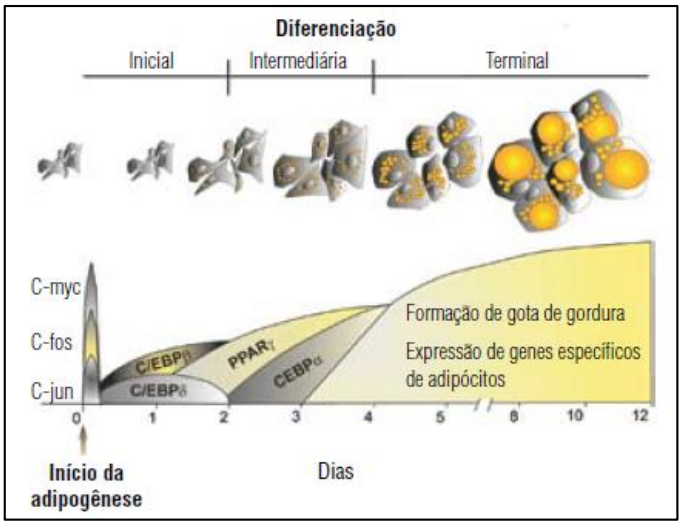

Figura 4 - Diferenciação dos adipócitos e os fatores de transcrição representados cronologicamente (Queiroz et al., 2009).

Conforme podemos verificar na figura 4 acima, durante a adipogênese, o C/EBP-β e -δ precedem a indução do PPAR-γ 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-γ 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).

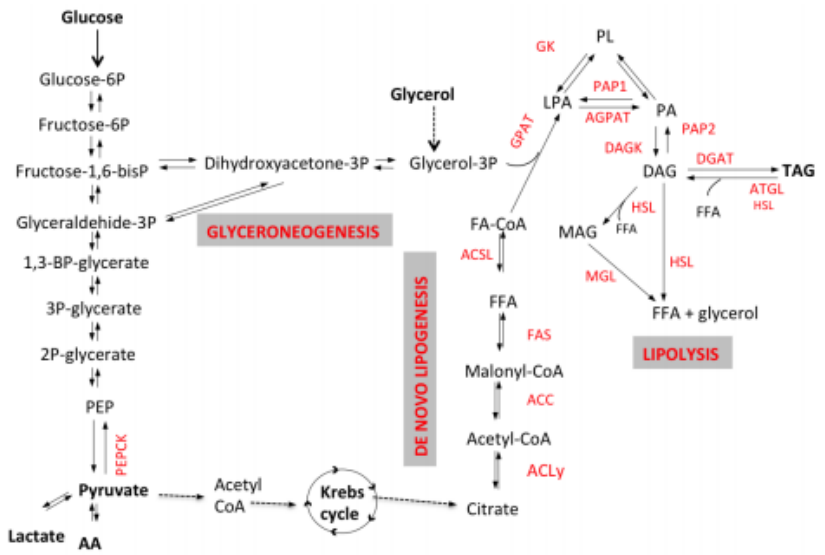

Figura 5 - Representação das vias lipolíticas e lipogênicas (Saponaro et al., 2015)

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. A 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).

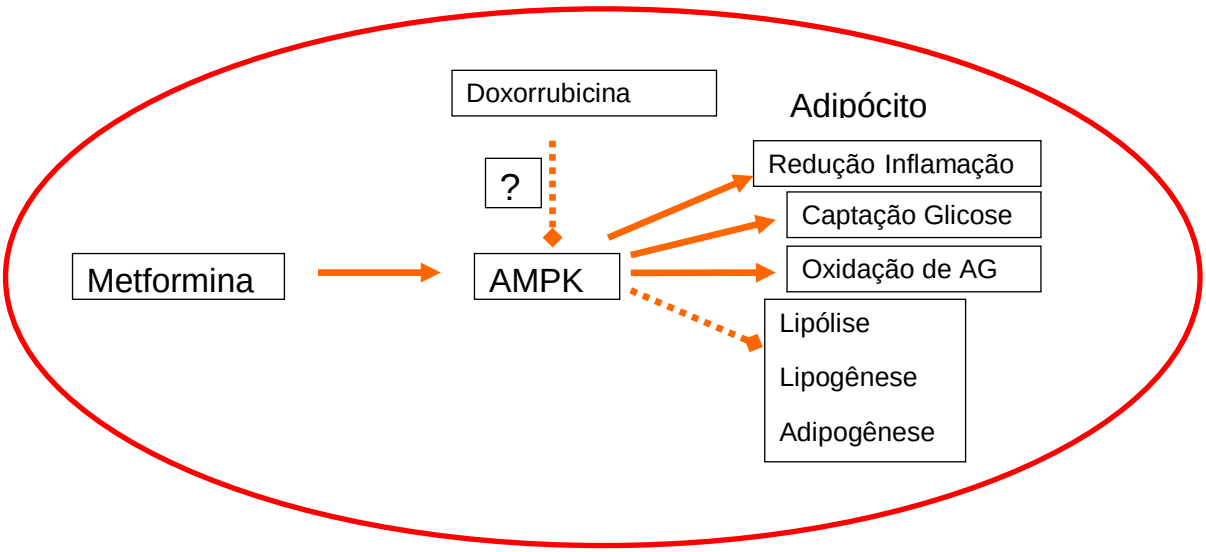

Figura 6 - Os possíveis efeitos da associação da doxorrubicina sobre as vias de captação de glicose, adipogênese e lipólise.

ativação ***inibição***

2 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]. Avaliable 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 cancer-associated 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 element-binding 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 doxorubicin-induced 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 PPARγ 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 PPARγ 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-β 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 adipose-derived 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 Pro-inflammatory 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]. Avaliable 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.