

**UNIVERSIDADE NOVE DE JULHO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA**

YVES SILVA TELES MATOS

**EFEITO DOS ANÁLOGOS DA INSULINA GLARGINA E NPH SOBRE O
CRESCIMENTO DE TUMOR PANCREÁTICO HUMANO EM MODELO MURINO
DE DIABETES MELITO**

**SÃO PAULO
2017**

YVES SILVA TELES MATOS

**EFEITO DOS ANÁLOGOS DA INSULINA GLARGINA E NPH SOBRE O
CRESCIMENTO DE TUMOR PANCREÁTICO HUMANO EM MODELO MURINO
DE DIABETES MELITO**

Dissertação de mestrado apresentada à
Universidade Nove de Julho para obtenção
do título de Mestre em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Humberto Dellê

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Giannella
Neto

**SÃO PAULO
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA

Matos, Yves Silva Teles.

Efeito dos análogos da insulina glargina e nph sobre o crescimento de tumor pancreático humano em modelo murino de diabetes melito. / Yves Silva Teles Matos. 2017.

56 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Nove de Julho - UNINOVE, São Paulo, 2017.

Orientador (a): Prof. Dr. Humberto Dellê.

1. Diabetes. 2. Câncer de pâncreas. 3. Insulina. 4. Análogos da insulina. 5. Glargina. 6. Crescimento tumoral.

I. Dellê, Humberto.

II. Título.

CDU 616

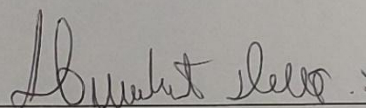
São Paulo, 07 de junho de 2017.

TERMO DE APROVAÇÃO

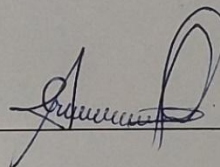
Aluno (a): **YVES SILVA TELES MATOS**

Título da Dissertação: **EFEITO DOS ANÁLOGOS DA INSULINA GLARGINA E NPH SOBRE O CRESCIMENTO DE TUMOR PANCREÁTICO HUMANO EM MODELO MURINO DE DIABETES MELITO**

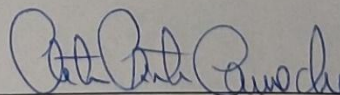
Presidente: PROF. DR. HUMBERTO DELLÊ



Membro: PROFA. DRA, MARISA PASSARELLI



Membro: PROF. DR. CLÉBER PINTO CAMACHO



AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por sua criação incrivelmente complexa, funcional e maravilhosa. Por cuidar de mim de todas maneiras possíveis e inimagináveis. Por me fortalecer, por me dar saúde e me mostrar o melhor caminho.

Agradeço ao Professor Daniel Giannella Neto (*in memoriam*) pela idealização do projeto, exemplo, confiança, atenção e pelo seu tempo. Ao Professor Humberto Dellê, pelos conhecimentos, respeito, admiração, broncas, exemplo, os quais contribuíram imensamente à minha formação, serei sempre grato e levarei teu exemplo de orientador e cientista por toda minha vida. Ao Professor Ricardo Giorgi que generosamente forneceu as células utilizadas neste estudo. Ao Professor Ubiratan Fabres Machado, pela recepção científica em seu laboratório, foi valiosíssima para a continuidade deste estudo. Agradeço aos Professores do Programa de Mestrado em Medicina e aqueles que passaram por minha vida e que em diversos aspectos contribuíram para que eu me espelhasse e desejasse seguir a mesma carreira, especialmente à Professora Eliza Pacheco por fazer eu me apaixonar pela Bioquímica. Agradeço à Universidade Nove de Julho – UNINOVE, por ter sido minha segunda casa nesses últimos 6 anos, fornecendo condições para minha formação.

Agradeço aos meus pais, pelo amor, carinho, advertências, conselhos, apoio, criação e por sempre, incondicionalmente, acreditarem em mim. Sem vocês eu não seria o homem que sou. Ao Ewerton, pela “mente e coração”. Ao Igor pela amizade de berço. À Tia Vanuza, a primeira que influenciou para eu ir para área da saúde. Agradeço aos amigos que a Ciência me deu: Cristina, Giovanni, Rodrigo, Luiz, Diego, Camila, Angela, Kaline, Jonas, Janaína, Alana, pelo apoio intelectual, técnico e pessoal. O momento “café” foi imprescindível. Meu Muito Obrigado.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

- Leonardo da Vinci

“Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho mais certo de vencer é tentar mais uma vez.”

- Thomas Edison

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Insulina e IGF (<i>insulin-like growth fator</i>)	15
1.2 Receptor de Insulina/IGF	16
1.3 Via PI3K/AKT	17
1.4 Via RAS/RAF/MEK/ERK	18
1.5 Análogos da insulina e câncer de pâncreas	19
2 OBJETIVO	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1 Cultura celular	22
3.2 Animais	22
3.3 Indução de diabetes por estreptozotocina (EZT)	22
3.4 Inoculação de células de câncer de pâncreas em camundongos nude	23
3.5 Extração de RNA	24
3.6 RT-PCR em tempo real	24
3.7 Western Blot	25
3.8 Imuno-histoquímica	26
3.8.1 Desparafinização para imuno-histoquímica	26
3.8.2 Técnica para recuperação antigênica	27
3.8.3 Técnica de imunohistoquímica	27
3.9 Análise estatística	28
4 RESULTADOS	29
4.1 Evolução ponderal	31
4.2 Evolução glicêmica	31
4.3 Sobrevida durante o protocolo experimental	33
4.4 Volume tumoral	33
4.5 Análise da proliferação celular	34
4.6 Expressão de receptor de IGF-I e de receptores de insulina	36
4.7 Expressão de VEGF-A	37
4.8 Correlação entre VEGF-A e tamanho do tumor	38
4.9 Análise de vias de sinalização ativadas por insulina	39
5 DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÃO	48
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. EVOLUÇÃO PONDERAL DOS ANIMAIS DURANTE O PROTOCOLO EXPERIMENTAL ...	31
FIGURA 2. EVOLUÇÃO GLICÊMICA DURANTE O PROTOCOLO EXPERIMENTAL	32
FIGURA 3. SOBREVIVÊNCIA DOS ANIMAIS DURANTE PROTOCOLO EXPERIMENTAL	33
FIGURA 4. PESO CORPÓREO E VOLUME TUMORAL	34
FIGURA 5. COLORAÇÃO HEMATOXILINA & EOSINA E IMUNOHISTOQUÍMICA PARA PCNA.....	35
FIGURA 6. PCR EM TEMPO REAL PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CICLINA D1	36
FIGURA 7. PCR EM TEMPO REAL PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE IGF-IR, DE IR-A E IR-B. ..	37
FIGURA 8. PCR EM TEMPO REAL PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE VEGF-A	38
FIGURA 9. CORRELAÇÃO ENTRE EXPRESSÃO DE VEGF-A E TAMANHO TUMORAL	38
FIGURA 10. WESTERN BLOT PARA VIAS DE SINALIZAÇÃO RELACIONADAS À ATIVAÇÃO INSULÍNICA	39

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. PRIMERS UTILIZADOS PARA RT-PCR EM TEMPO REAL	25
TABELA 2. ACOMPANHAMENTO DOS ANIMAIS DURANTE PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS

4E-BP1 - eIF4E-binding protein-1
ATCC - American Type Culture Collection
AKT – Proteína quinase B
AKT-P - Proteína quinase B fosforilada
cDNA - DNA complementar
DAB - Diaminobenzidina
DNA - Ácido Desoxinucleico
DM – Diabetes melito
ERK - Extracellular-signal-regulated kinases
EZT - Estreptozotocina
FDA - Food and Drug Administration
FoxO - Forkhead box “Other”
GDP - Guanosine diphosphate
GLUT - Transportador de glicose
GH - Growth Hormone
GEFs - Guanine nucleotide exchange factors
GLAR - Insulina Glargina
Grb2 - Growth factor receptorbound protein 2
GSK3 β - Glicogênio sintase cinase 3 β
GTP - Guanosina trifosfato
HIF1 α - Hypoxia-inducible fator-1 α
IGF - Insulin-like growth fator
IGFBP - Insulin like growth factor binding protein
IGF-IR - Receptor de IGF-I
IR - Receptor de insulina
IR-A - Receptor de insulina do tipo A
IR-B - Receptor de insulina do tipo B
IRS - substratos do receptor de insulina
MEK - Mitogen-activated protein kinase

mTOR - Raptor–mammalian target of rapamycin
mTOR-P - Phospho raptor–mammalian target of rapamycin
NPH - Neutral Protamine Hagedorn
PBS - Tampão Fosfato-Salino
PCNA - Proliferating cell nuclear antigen
PDK-1 - Phosphoinositide-dependent kinase-1
PI3K - Fosfatidilinositol-3-cinase
PIP2 - Fosfatidilinositol-(4,5) bisfosfato
PIP3 - Fosfatidilinositol-(3, 4, 5) trisfosfato
PCR - Reação de Cadeia de Polimerase
qRT-PCR - PCR quantitativo em tempo real
RNA - Ribonucleic Acid
RPMI - Roswell Park Memorial Institute
S6K - Ribosomal S6 kinase
SH - Src homology
SHC - Src homology collagen
SHPS-1 - Protein tyrosine phosphatase substrate-1
TBS - Solução salina tris-tamponada
VEGF - Vascular endothelial growth factor

RESUMO

O Diabetes Melito (DM) e o câncer estão entre as doenças mais comuns da população humana mundial. A administração de análogos da insulina de ação prolongada tem sido utilizada no tratamento da hiperglicemia presente no DM e os efeitos hipoglicemiantes são provenientes da ligação com receptores de insulina/*insulin-like growth fator* (IGF) e respostas intracelulares relacionadas ao metabolismo celular. Alguns estudos sugerem que insulina de ação prolongada, como a Glargina, pode aumentar o risco de câncer. Entretanto, até o presente momento os estudos que demonstram mecanismos intracelulares do câncer de pâncreas em resposta a este análogo são inconclusivos. O objetivo deste estudo foi analisar o efeito da Glargina sobre o crescimento de células de câncer de pâncreas humano em camundongo nude diabético. Além disso, avaliar a proliferação celular, expressão de VEGF e expressão das vias PI3K/AKT, mTOR e ciclina D1. Para tanto, foi utilizada a linhagem de câncer de pâncreas ductal humano BxPC-3, inoculada por via subcutânea em camundongos fêmeas balb/c nude diabéticos induzidos por estreptozotocina. Após indução do DM e inoculação das células, os animais foram tratados com Glargina (grupo GLAR) ou insulina neutral protamine Hagedorn (NPH), ambas na dose de 1U/dia, por 28 dias. Resultados: Ao final do protocolo, verificamos que não houve diferença no ganho de peso entre os 2 grupos (peso no último dia 21,1±1,9g no NPH e 21,8±1,4g no GLAR, p=0,99). Os animais de ambos os grupos apresentaram controle glicêmico semelhante, o que também não alterou a sobrevivência dos animais. Com relação ao crescimento tumoral, não houve diferença entre os grupos (1,23 ± 1,70 mm³/dia/g no grupo NPH vs 0,68±0,86 mm³/dia/g no grupo GLAR; p=0,92), e isso se comprova pela análise da proliferação por PCNA e ciclina D1, não havendo diferença na expressão de ciclina D1 entre os grupos (expressão relativa de 1,03 ± 0,08 no grupo NPH e 1,21 ± 0,19 no grupo GLAR; p=0,40). Não houve diferença na expressão de VEGF-A e não houve correlação significativa com tamanho tumoral (NPH: R=-0,035, p=0,96; GLAR: R=0,285, p=0,55). Além disso, os tratamentos induziram igualmente a expressão dos receptores de insulina tipo A (expressão relativa de 2,18 ± 2,47 no NPH e 1,26 ± 1,20 no GLAR, p=0,79) e tipo B (expressão relativa de 1,02 ± 0,21 no NPH e 1,40 ± 0,51 no GLAR, p=0,08) e de IGF-I (expressão relativa de 1,02 ± 0,23 no NPH e 0,98 ± 0,21 no GLAR, p=0,67), assim como, induziram semelhantemente as vias relacionadas com o metabolismo e crescimento celular, avaliadas por Western Blot para as vias AKT e mTOR. Concluímos que, no modelo estudado, não houve diferença entre as insulinas Glargina e NPH em relação ao crescimento tumoral, proliferação celular, expressão de receptores insulínicos e de IGF-I e ativação das vias de sinalização AKT e mTOR.

Palavras-chave: Diabetes, Câncer de Pâncreas, Insulina, Análogos da Insulina, Glargina, Crescimento tumoral

SUMMARY

Diabetes Mellitus (DM) and cancer are among the most common diseases of the human population worldwide. Administration of long-acting insulin analogues has been used in the treatment of hyperglycemia present in DM and the hypoglycemic effects occur from binding to insulin/insulin-like growth factor (IGF) receptors and intracellular responses related to cellular metabolism. Some studies suggest that long-acting insulin, such as Glargine, may increase the risk of cancer. However, currently, studies are inconclusive in demonstrating intracellular mechanisms of pancreatic cancer in response to this analogue. The aim of this study was to analyze the effect of Glargine on the human pancreatic cancer cells growth in nude diabetic mice. In addition, to evaluate cell proliferation, the expression of VEGF and PI3K/AKT, mTOR and cyclin D1 pathways. Thus, the human pancreatic ductal adenocarcinoma cell line BxPC-3 was inoculated subcutaneously in streptozotocin-induced balb/c female diabetic mice. After DM induction and inoculation of the cells, the animals were treated with GLAR (GLAR group) or neutral insulin protamine Hagedorn (NPH group), both at 1U/day for 28 days. Results: At the end of the protocol, we verified that there was no difference in weight gain between groups (weight at the last day $21.1 \pm 1.9\text{g}$ in NPH and $21.8 \pm 1.4\text{g}$ in GLAR, $p=0.99$). The animals in both groups presented a similar glycemic control, which did not alter the survival of the animals between groups. Regarding tumor growth, there was no difference between groups ($1.23 \pm 1.70 \text{ mm}^3/\text{day/g}$ in NPH vs $0.68 \pm 0.86 \text{ mm}^3/\text{day/g}$ in GLAR, $p=0.92$), and it is confirmed through the proliferation analysis by PCNA and cyclin D1, with no difference in cyclin D1 expression between groups (relative expression of 1.03 ± 0.08 in NPH and 1.21 ± 0.19 in GLAR, $p=0.40$). There was no difference in VEGF-A expression and there was no significant correlation with tumor size (NPH: $R=-0.035$, $p=0.96$; GLAR: $R=0.285$, $p=0.55$). In addition, the treatments induced similarly the expression of the type A insulin receptor (relative expression of 2.18 ± 2.47 in NPH and 1.26 ± 1.20 in GLAR, $p=0.79$) and type B (relative expression of 1.02 ± 0.21 in NPH and 1.40 ± 0.51 in GLAR, $p=0.08$) and IGF-I receptor (relative expression of 1.02 ± 0.23 in NPH and 0.98 ± 0.21 in GLAR, $p=0.67$), as well as equally induced the pathways related to metabolism and cell growth, evaluated by Western Blot for AKT and mTOR pathways. We conclude that, in this studied model, there was no difference between Glargina and NPH insulins regarding tumor growth, cell proliferation, expression of insulin and IGF-I receptors as well as activation of AKT and mTOR signaling pathways.

Keywords: Diabetes, Pancreatic Cancer, Insulin, Insulin analogs, Glargina, Tumor growth

1 INTRODUÇÃO

O diabetes melito (DM) e o câncer estão entre as doenças mais comuns da população mundial (SCAPPATICCIO et al., 2017). Conforme dados do último relatório da *International Diabetes Federation*, o DM afeta aproximadamente 415 milhões de pessoas no mundo e causa cerca de 5 milhões de mortes. No Brasil, há cerca de 14,3 milhões de pessoas diabéticas, destacando-se como um dos países com maior número de portadores do distúrbio (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015).

Há um risco elevado de incidência e mortalidade por câncer em pessoas com DM (GIOVANNUCCI et al., 2010; SCAPPATICCIO et al., 2017), e esse risco é maior em pessoas com DM do tipo 2 (HARDING et al., 2015; SATIJA et al., 2015). O DM tipo 1 é caracterizado por uma destruição autoimune às células β pancreáticas produtoras de insulina. Já no DM tipo 2, pode haver deficiência na secreção ou resistência insulínica. Em ambos os tipos, a hiperglicemia se faz presente, levando às complicações tardias como retinopatia, neuropatia, nefropatia e complicações cardiovasculares (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2016).

Em relação ao câncer, estima-se que em 2017, mais de 1,6 bilhões de novos casos de câncer serão diagnosticados e 600 mil pessoas morrerão dessa doença nos EUA (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017). Neste quadro, estima-se que mais de 53 mil pessoas desenvolverão câncer de pâncreas e aproximadamente 43 mil pessoas morrerão, sendo a 4ª causa de morte por câncer. A neoplasia pancreática mais comum é do tipo adenocarcinoma ductal que devido à falta ou ausência de sintomas específicos e diagnóstico tardio de tumores, frequentemente com

metástases, colabora com a baixíssima taxa de sobrevivência de 5% acima de 5 anos (KLEEFF et al., 2016; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017).

A literatura sugere que a insulinoterapia, utilizada no tratamento da hiperglicemia, pode aumentar o risco de câncer (GIOVANNUCCI et al., 2010; JOOST, 2014). Após aprovação do uso da Glargina, um análogo da insulina de ação prolongada, alguns estudos indicaram o aumento do risco de câncer (COLHOUN, 2009; CURRIE; POOLE; GALE, 2009; HEMKENS et al., 2009; JONASSON et al., 2009), entretanto, isso foi refutado pela *Food and Drug Administration* - FDA em 2009, pelo fato desses estudos apresentarem resultados inconclusivos em virtude das limitações metodológicas. Desde 2009, diversos estudos sugeriram a relação da Glargina em promover câncer ou aumentar seu risco (CHANG et al., 2011; KARLSTAD et al., 2013; MAYER; CHANTELAU, 2010; QIN et al., 2015; SUISSA et al., 2011), enquanto que outros estudos demonstraram que a Glargina não provoca aumento de risco (BLIN et al., 2012; BORDELEAU et al., 2014; DU et al., 2012; FAGOT et al., 2013; HABEL et al., 2013; LIM et al., 2014; LIND et al., 2012; LIU et al., 2011; LJUNG et al., 2011; MORDEN et al., 2011; MÜLLER; WEIDINGER; FÜHRER, 2010; PEETERS et al., 2016; ROSENSTOCK et al., 2009; RUITER et al., 2012; STÜRMER et al., 2013; TANG et al., 2012).

Embora diversos estudos já tenham analisado os efeitos do tratamento com a insulina Glargina, tais resultados são inconclusivos. Especificamente em relação ao câncer de pâncreas, até o momento não há estudos *in vivo* que demonstrem o efeito do tratamento com a insulina Glargina.

1.1 Insulina e IGF (*insulin-like growth factor*)

A insulina é um hormônio proteico produzido pelas células β pancreáticas, composto por duas cadeias de aminoácidos conectadas por ligações dissulfetos. Sua síntese é iniciada com a tradução do RNA da insulina por ribossomos ligados ao retículo endoplasmático para a formação do pré-pró-hormônio, cujo peso molecular é 11,5 kD, que será clivado para formar a pró-insulina. Esta última é clivada no Complexo de Golgi para formação da insulina (WILCOX, 2005). O principal estímulo para a secreção de insulina é a glicose. A glicose entra na célula β por uma proteína de membrana transportadora de glicose (GLUT), e quando a concentração de glicose está elevada no sangue haverá um grande influxo de glicose na célula β , especialmente através do GLUT2, altamente expressa pela célula, levando à liberação da insulina (HEIMBERG et al., 1993).

O fator de crescimento insulina-símile (IGF, do inglês *insulin-like growth factor*) possui homologia com a insulina de 50%. É produzido e secretado pelo fígado em duas formas IGF-I e IGF-II, mediante estímulo do hormônio de crescimento (GH). O IGF é encontrado em altas concentrações no sangue ligado à 6 tipos de proteínas carregadoras de IGF (*insulin like growth factor binding proteins* - IGFBPs), também produzidas pelo fígado. Após ação de proteases, ocorre degradação das IGFBPs, permitindo assim a ligação de IGF ao seu receptor na célula alvo (BRAHMKHATRI; PRASANNA; ATREYA, 2015).

1.2 Receptor de Insulina/IGF

Para a insulina e IGF realizarem seus efeitos nas células alvo é necessária a ligação com seus receptores específicos.

O receptor de insulina (IR, do inglês *insulin receptor*) é composto por duas subunidades α extracelulares (sítio de ligação) e duas subunidades β transmembranas, mantidas unidas por ligações dissulfetos (BELFIORE et al., 2009; DE MEYTS, 2008). O IR pode ser produzido em duas formas: IR-A e IR-B. O IR-B é considerado o típico alvo para a insulina em tecidos como o muscular e o hepático. O IR-A é expresso constitutivamente, porém é predominantemente expresso em células do sistema nervoso e em células hematopoéticas, podendo ser ativado não somente pela insulina, mas também por IGF-II (BELFIORE et al., 2009). O IR-A também é altamente expresso em células cancerígenas, além de desempenhar um importante papel na proliferação de células cancerígenas em resposta à insulina e seus análogos (JANSSEN; VAREWIJCK, 2014).

O receptor de IGF-I (IGF-IR) é semelhante ao IR por possuir 2 cadeias α e 2 cadeias β ligadas por pontes dissulfetos, bem como domínios tirosina cinase na porção citoplasmática da cadeia β . Há também o IGF-IIR, porém difere do IGF-IR por ser um receptor monomérico e por não possuir atividade de sinalização equivalente. Portanto, assim como na resposta intracelular promovida pela insulina, a resposta gerada por IGF-IR ocorrerá de maneira semelhante (BRAHMKHATRI; PRASANNA; ATREYA, 2015).

A ligação da insulina e IGF ao sítio de ligação no receptor promove uma mudança conformacional do receptor, que estimula a atividade da tirosina cinase presente na região citoplasmática da porção β do receptor (BELFIORE et al., 2009;

DE MEYTS, 2008). Essa tirosino-cinase ativa promoverá respostas intracelulares pela fosforilação de diversas proteínas, como por exemplo, substratos do receptor de insulina (IRS-1, 2, 3 e 4 - do inglês, *insulin receptor substrates*) e *Src homology (SH)/collagen (SHC)* (BELFIORE et al., 2009; MARUYAMA, 2014). Por essas proteínas, são iniciadas duas vias de sinalização intracelulares: 1) via da *phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)*, *protein kinase B (AKT)* e *raptor–mammalian target of rapamycin (mTOR)*, atuante no controle metabólico e crescimento celular; e 2) via RAS/RAF/MEK/ERK, mediando efeitos mitogênicos (BELFIORE et al., 2009). O IGF-IR possui também a capacidade de fosforilar o domínio SH2 da *protein tyrosine phosphatase substrate-1 (SHPS-1)*, que juntamente com agregação de SHC, leva à ativação alternativa dessas vias em condições de hiperglicemia (JANSSEN; VAREWIJCK, 2014).

1.3 Via PI3K/AKT

Em resposta à fosforilação de proteínas, como por exemplo IRS-1, a subunidade p85 e a catalítica p110 fosforilam a *phosphatidylinositol-(4,5) bisphosphate (PIP2)*, gerando a *phosphatidylinositol-(3, 4, 5)-trisphosphate (PIP3)* (GEWINNER et al., 2009). A PIP3 recruta AKT para a membrana plasmática onde será fosforilada e ativada pela *phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1)* e mTOR (HUBBARD; MOODY; MURALI, 2014).

A AKT ativa regulará enzimas como a *glycogen synthase kinase 3 β* (GSK3 β), participará de eventos como a translocação do transportador de glicose (GLUT-4) à membrana plasmática e, ao fosforilar o Bcl-2, inibirá processos pró-apoptóticos (BELFIORE et al., 2009; MANNING; CANTLEY, 2007). A AKT fosforila também

proteínas *forkhead box "Other"* (FoxO1, 3 e 4), que fisiologicamente participam na regulação do metabolismo inibindo a proliferação celular, promovendo apoptose e aumentando a resistência ao estresse oxidativo. Havendo resposta intracelular pela ativação do receptor, ocorrerá a supressão transcricional das proteínas FoxO pela fosforilação gerada por AKT e, dessa forma, as proteínas FoxO serão degradadas (BARTHEL; SCHMOLL; UNTERMAN, 2005).

A ativação da PI3K/AKT regula também a via mTOR que induz angiogênese mediante produção de *hypoxia-inducible fator-1 α* (HIF1 α) e, posteriormente, o *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (MANNING; CANTLEY, 2007), no qual já foi relacionado com câncer de pâncreas (COSTACHE et al., 2015; MARSCHALL et al., 2000; TANG et al., 2006). A via mTOR, mediante PI3K/AKT, regulará, também, a *ribosomal S6 kinases* (S6K1 e 2) e a *eIF4E-binding protein-1* (4E-BP1), que são proteínas que participam da síntese proteica, ou seja, ocorrerá a regulação do crescimento e metabolismo celular (MA; BLENIS, 2009).

1.4 Via RAS/RAF/MEK/ERK

RAS são proteínas GTPases de membrana, cuja atividade é controlada por fosforilação ou desfosforilação. Quando há autofosforilação do IR/IGF-IR, o *growth factor receptorbound protein 2* (Grb2) liga-se à proteínas IRS fosforiladas e, juntamente com *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) e SHC, permitirá que o RAS troque de GDP para GTP, induzindo respostas intracelulares, como por exemplo, ativação da via PI3K/AKT, recrutamento e ativação por fosforilação de RAF. RAF ativará *Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase 1,2* (MEK1/2) pela fosforilação, que por sua vez irá fosforilar a *Extracellular-signal-regulated kinases 1,2*

(ERK1/2). Sendo assim, esta via participará da regulação da apoptose (BELFIORE et al., 2009; KNIGHT; IRVING, 2014; MANNING; CANTLEY, 2007; MCCUBREY et al., 2007).

1.5 Análogos da insulina e câncer de pâncreas

A administração de insulina tem sido utilizada no controle glicêmico desde seu advento no tratamento do DM. No DM1, é necessário o uso de insulina devido sua ausência causada pela destruição das células beta. Já no DM2 a concentração de insulina se mantém elevada como um mecanismo compensatório em resposta à resistência periférica insulínica, porém com o passar dos anos as células beta chegam à exaustão, diminuindo a quantidade de insulina secretada e assim tornando necessária a administração de insulina exógena (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2016). A princípio, insulina de ação rápida foi utilizada no tratamento do DM, entretanto não se obtinha um controle glicêmico adequado. Neste contexto surgiram insulinas de ação prolongada, como a Glargina, que apresenta modificações na cadeia A e B da molécula da insulina humana, o que permite sua precipitação quando injetada subcutaneamente, resultando na absorção e ação prolongada e conseqüentemente um melhor controle glicêmico (HOME; ASHWELL, 2001).

Entretanto, estudos levantaram questões sobre o potencial carcinogênico e mitogênico da insulina Glargina, relacionando este efeito com a alta afinidade pelo receptor de IGF-I. Foi mostrado na literatura que a insulina Glargina, assim como um dos subprodutos (M1) provenientes de sua degradação após sua administração subcutânea, possui alta capacidade de ativação dos IR-A/B e IGF-IR (JANSSEN;

VAREWIJCK, 2014; PIERRE-EUGENE et al., 2012), cujo receptores desempenham papel importante no crescimento e proliferação de células cancerígenas (BRAHMKHATRI; PRASANNA; ATREYA, 2015; JANSSEN; VAREWIJCK, 2014; KATO et al., 2015; SUBRAMANI et al., 2014). Sabe-se que estes análogos da insulina, quando injetados subcutaneamente, ao atingirem a corrente sanguínea, apresentam uma concentração basal acima da fisiológica, e embora a literatura mostre potente ativação mitogênica mediante utilização dos análogos, o efeito biológico produzido por estes análogos ainda não foi totalmente elucidado (GIOVANNUCCI et al., 2010; JANSSEN; VAREWIJCK, 2014).

2 OBJETIVO

Avaliar o efeito do análogo da insulina de ação prolongada Glargina em comparação com NPH em modelo de câncer de pâncreas ductal humano desenvolvido em camundongo nude diabético, avaliando-se:

- Crescimento tumoral;
- Expressão dos receptores insulínicos;
- Ativação das vias PI3K/AKT e mTOR.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura celular

Foi utilizada a linhagem de câncer de pâncreas ductal humano BxPC-3, adquiridas comercialmente pela American Type Culture Collection (ATCC) e doadas pelo Dr. Ricardo Rodrigues Giorgi. As células foram mantidas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Vitrocell, Campinas, Brasil) contendo 10% de soro fetal bovino, 1% de Penicilina/Estreptomicina e 1% Hepes, sob condições adequadas em estufa com temperatura de 37°C e CO₂ a 5%.

3.2 Animais

Os procedimentos realizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Nove de Julho (CEUA), parecer número AN0020.2016.

Foram utilizados 34 camundongos fêmeas da linhagem balb/c nude com idade aproximada entre 8-12 semanas. Os animais foram fornecidos pelo biotério central da Universidade Nove de Julho (UNINOVE), unidade Vergueiro, e ficaram mantidos em condições especiais em ambiente controlado, alocados em mini-isoladores com água, ração e maravalha estéreis (autoclavados). Toda manipulação foi feita em fluxo laminar.

3.3 Indução de diabetes por estreptozotocina (EZT)

Os animais foram tornados diabéticos através de uma única injeção intraperitoneal de EZT (Sigma, St. Louis, EUA) na dose de 200 mg/kg dissolvida em tampão citrato (ácido cítrico 5 mM e citrato trissódico hidratado 5 mM, pH 6,0; todos reagentes da Sigma, St. Louis, EUA). Foi administrado um volume de 1 mL da

solução de EZT (200 mg/mL) para cada kg de peso animal, sob jejum por 16h. A confirmação do diabetes foi feita pela verificação da glicemia por fotometria (Accu-Chek Advantage, Roche Laboratories, Alemanha), pela coleta de amostras de sangue, obtidas por meio de pequeno corte na extremidade caudal do animal, e depositadas em fita glicêmica. Apenas os animais que apresentaram glicemia não-jejum acima de 300 mg/dL em duas análises em dias consecutivos foram considerados diabéticos e seguiram para a inoculação das células de câncer de pâncreas e administração dos análogos da insulina.

3.4 Inoculação de células de câncer de pâncreas em camundongos nude

Após a confirmação do DM, ocorreu a inoculação subcutânea na região lombar com 5×10^6 células BxPC-3, suspensas em 100 μ L de PBS. Concomitantemente, iniciou-se o tratamento com os análogos da insulina que foram injetados por via subcutânea na dose de 1U/dia, sendo administrada 1/3 da dose no período da manhã e 2/3 da dose no período da tarde. A partir disto, o volume do tumor, glicemia e peso dos animais foram verificados duas vezes por semana por um período de 28 dias. O tumor foi medido por paquímetro, onde seu volume foi calculado da seguinte maneira: comprimento x largura x altura x 0,523 (TOMAYKO; REYNOLDS, 1989).

Os animais inoculados foram divididos nos seguintes grupos:

- Grupo GLAR: animais diabéticos recebendo Glargina;
- Grupo NPH: animais diabéticos recebendo NPH;

Os animais foram analisados diariamente por sinais de dor, estresse e sofrimento, ou seja, foram avaliados: postura do corpo, hiper ou hipoatividade, perda de peso excessiva, conforme estudo publicado (ULLMAN-CULLERÉ; FOLTZ, 1999).

Apresentando algum destes sinais, o animal foi eutanasiado com overdose anestésica (três vezes a dose anestésica habitual: 300 mg/kg de cetamina (Ketamin-S, Cristália) e 30 mg/kg de xilazina (Ronpun, Bayer, Alemanha).

Ao término do protocolo, os animais foram submetidos à óbito, como previamente descrito, aproximadamente às 17h, e o sangue e o tecido tumoral foram coletados e armazenados em -80°C ou em formalina para futuras análises. O óbito dos animais foi confirmado pela retirada do tecido cardíaco e, após coleta dos tecidos de interesse, os animais foram acondicionados em sacos plásticos brancos específicos para descarte de material biológico, permanecendo em freezer -20°C até retirada pelo serviço especializado da Universidade Nove de Julho.

3.5 Extração de RNA

Para a extração de RNA total foi utilizado o método do Trizol, seguindo-se as recomendações do fabricante (Invitrogen, CA, USA). A quantidade e pureza de RNA foi medida usando o espectrofotômetro NanoDrop 2000C (Thermo-científica, Wilmington, EUA). A síntese de cDNA foi realizada utilizando 2000ng de RNA total de acordo com o protocolo de Transcriptase Reversa M-MLV (Promega, Madison, EUA).

3.6 RT-PCR em tempo real

A RT-qPCR foi realizada utilizando o kit SYBR Green (Invitrogen, Califórnia, EUA), utilizando o seguinte perfil de ciclo: 10min a 95° C, seguido de 40 ciclos de 15seg a 95° C para desnaturação, 20seg a 60° C para o anelamento, e 10seg a 72° C para extensão. O equipamento utilizado foi o 7500™ Real-Time PCR System

(Applied Biosystems, Califórnia EUA). A expressão gênica foi determinada como em (BARBOSA et al., 2015).

Os primers utilizados neste estudo estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Primers utilizados para RT-PCR em tempo real

Gene	Primer forward (5'-3')	Primer Reverse (5'-3')
TBP humano	TTCGGAGAGTTCTGGGATTGTA	TGGACTGTTCTTCACTCTTGGC
Ciclina D1	ATGCCAACCTCCTCAACGAC	GGCTCTTTTTTCACGGGCTCC
IGF-IR	TGGTGGAGAACGACCATATCC	CGATTAAGTGAAGAGGAGTTCTGA
IR-A	TTTTCGTCCCCAGGCCATC	GTCACATTCCCAACATCGCC
IR-B	CCCCAGAAAAACCTCTTCAGG	GTCACATTCCCAACATCGCC
VEGF-A	AGGAGGAGGGCAGAATCATCA	CTCGATTGGATGGCAGTAGCT

3.7 Western Blot

O tecido tumoral foi homogeneizado em RIPA *Lysis buffer* (Santa Cruz, CA, USA), acrescido de inibidor de protease (Complete TM-Without EDTA, Roche Diagnostics, Penzberg, Germany). Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 16.000 G à 4°C por 10 min e o sobrenadante foi coletado e armazenado à -20°C. As amostras foram quantificadas pelo método de Bradford e 50µg de proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida-SDS à concentração de 7 ou 10%. Após corrida de eletroforese, a transferência das proteínas em membrana de nitrocelulose 2 µm (Amershan Pharmacia Biotech, Piscataway, EUA) foi realizada em aparato semiúmido (Bio-Rad, Burlingame, EUA). Para a imunodeteção, as membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado (Nestlé Brasil LTDA, São Paulo, Brasil) em TBST (10 mM tris-HCl pH=7,5, 150 mM NaCl e 0,1 %Tween 20)

por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação e, após esse período, incubadas “overnight” com anticorpo primário, também sob agitação. Posteriormente, foram lavadas três vezes por 10 min com TBST e incubadas com anticorpo conjugado à peroxidase anti-camundongo (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA) ou anti-coelho (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA), na diluição 1:5000, durante 1 hora sob agitação. As membranas foram então lavadas 3x por 10 min com TBST e destinadas à revelação com ECL (Amershan Pharmacia Biotech, Piscataway, EUA).

Para detecção das bandas foi utilizado o programa Image Lab versão 5.2.1 e o Equipamento Chemi Doc MP, ambos desenvolvidos e fabricados pela Biorad, seguindo as instruções do fabricante. A análise densitométrica da expressão das bandas foi realizada usando o Image J do NIH versão 1.51j (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

3.8 Imuno-histoquímica

3.8.1 Desparafinização para imuno-histoquímica

O tecido tumoral foi emblocado em parafina, as lâminas foram confeccionadas e posteriormente passaram por um processo de desparafinização. Após 30 min em estufa a 60°C, as lâminas foram imersas em xilol durante 9 min, por 3x. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 5 min (2x), em etanol 96% por 3 min (2x) e em água destilada.

Finalizado o processo de desparafinização, as lâminas foram hidratadas em solução salina tris-tamponada (TBS, pH 7,4).

3.8.2 Técnica para recuperação antigênica

A técnica do micro-ondas foi utilizada para aumentar a recuperação antigênica, uma vez que durante o processo de parafinização pode ocorrer o “mascaramento” de antígenos no tecido, dificultando assim sua detecção. As lâminas foram imersas em tampão citrato (2,1 g de ácido cítrico mono hidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha) dissolvidos em água destilada para 1.000 mL, pH 6,0) e levadas ao forno micro-ondas (Sanyo, São Paulo, Brasil) com potência de 2.400 W durante 15 min. As lâminas foram então resfriadas à temperatura ambiente por 20 min e então lavadas com água destilada para a retirada do tampão citrato, permanecendo posteriormente em TBS.

3.8.3 Técnica de imunohistoquímica

Após a desparafinização e exposição antigênica, as lâminas foram lavadas com TBS por 5 min. Posteriormente, foram bloqueadas com solução de avidina D (Vector, Burlingame, EUA) durante 15 min, sendo posteriormente lavadas com TBS durante 5 min. Em seguida, as lâminas foram incubadas com uma solução de biotina (Vector, Burlingame, EUA) durante 15 min e posteriormente lavadas com TBS por 5 min. As lâminas foram então incubadas em leite Molico 6% em TBS, durante 15 min e, após a retirada do excesso do leite, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário específicos durante a noite a 4°C. No dia seguinte, os cortes foram lavados em TBS por 5 min e incubados com anticorpo biotinilado anti-rato, (Dako, Carpinteria, EUA) por 15 min. Após lavagem com TBS, para completar a reação, os cortes foram incubados com o complexo estreptavidina-fosfatase alcalina (1/50 em TBS) (Dako, Carpinteria, EUA) por 20 min, lavados novamente com TBS e destinados à revelação.

As lâminas foram lavadas em TBS por 5 min e incubadas com os reagentes do kit LSAB-System-AP (Dako, Carpinteria, EUA). A revelação foi realizada com Permanent-RED (K064011, Dako, Carpinteria, EUA) diluído 1:50 em Liquid Permanent Red Substrate Buffer (K064030, Dako, Carpinteria, EUA).

As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer (Merck, Darmstadt, Alemanha) durante 7 min e lavadas em água corrente. As lâminas foram então montadas com glicergel (Merck, Darmstadt, Alemanha).

3.9 Análise estatística

Para o estudo experimental, foi realizado teste de normalidade Shapiro-Wilk para todas as variáveis e os dados foram representados em média $\pm$ desvio padrão. Para a comparação entre os grupos, foi utilizado o teste t-Student não pareado para amostras paramétricas ou Mann Whitney para não paramétricas, e Two-way ANOVA com pós teste Tukey. O gráfico de Kaplan-Meier foi utilizado para a análise da sobrevida que foi comparada via teste Log-Rank. Foram testadas correlações das variáveis pelo coeficiente de Spearman. A significância estatística foi considerada a partir do $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o GraphPad Prism versão 6 para MacOS (Graphpad Software, La Jolla, EUA).

4 RESULTADOS

Foram utilizados 34 camundongos fêmeas da linhagem balb/c nude para a indução do DM por EZT. Destes, 30 animais (15 animais em cada grupo), discriminados na Tabela 2, apresentaram glicemia acima de 300 mg/dl e, portanto, seguiram para inoculação das células BxPC-3 e administração das insulinas.

Durante o protocolo experimental, 14 animais do grupo NPH e 12 do grupo GLAR apresentaram crescimento tumoral. Todos os animais do grupo GLAR completaram o protocolo, entretanto, no grupo NPH, apenas 9 animais finalizaram-no.

Tabela 2. Acompanhamento dos animais durante protocolo experimental

Grupos	Caso	Protocolo cumprido (dias/%)	Metabolismo			Tumor			
			Último peso (g)	Normoglicemia*	Hipoglicemia**	Detectável	Volume (mm ³)	Volume/dia (mm ³ /dia)	Volume/dia/peso (mm ³ /dia/g)
NPH	59,2	28 (100%)	19,2	Não	Não	Sim	28	1,01	0,05
	59,3	28 (100%)	17,7	Não	Não	Sim	19	0,67	0,04
	59,4	23 (82%)	14,3	Não	Não	Sim	13	0,55	0,04
	59,6	20 (71%)	16,6	Não	Não	Sim	18	0,92	0,06
	62,1	28 (100%)	22,7	Não	Não	Sim	67	2,39	0,11
	62,3	28 (100%)	19,7	Não	Não	Sim	29	1,05	0,05
	62,4	28 (100%)	22,1	Sim	Não	Sim	52	1,87	0,09
	62,5	28 (100%)	23,1	Sim	Não	Não	-	-	-
	65,0	28 (100%)	21,9	Não	Não	Sim	220	7,86	0,36
	65,1	25 (89%)	19,8	Não	Não	Sim	403	16,12	0,81
	65,4	28 (100%)	22,1	Não	Não	Sim	483	17,25	0,78
	64,0	23 (82%)	24,6	Sim	Não	Sim	1739	75,61	3,07
	64,1	25 (89%)	25,2	Sim	Sim	Sim	1461	58,44	2,32
	64,3	25 (89%)	25,2	Sim	Sim	Sim	2531	101,24	4,02
	64,4	27 (96%)	23,0	Sim	Sim	Sim	3361	124,48	5,41
Média		26,1	21,1				745	29,25	1,23
DP		2,4	3,1				1054	41,00	1,70
GLAR	60,1	28 (100%)	21,8	Sim	Sim	Sim	75	2,69	0,12
	60,2	28 (100%)	23,2	Sim	Sim	Sim	26	0,92	0,04
	60,4	28 (100%)	23,7	Sim	Sim	Sim	377	13,45	0,57
	60,5	28 (100%)	19,3	Sim	Sim	Sim	29	1,05	0,05
	60,6	28 (100%)	22,0	Sim	Sim	Sim	81	2,88	0,13
	63,0	28 (100%)	20,5	Sim	Sim	Sim	42	1,51	0,07
	63,1	28 (100%)	21,1	Sim	Sim	Não	-	-	-
	63,2	28 (100%)	21,6	Sim	Sim	Não	-	-	-
	66,0	25 (89%)	20,6	Sim	Sim	Sim	127	5,08	0,25
	66,1	23 (82%)	23,2	Sim	Sim	Sim	979	42,57	1,84
	66,3	25 (89%)	23,4	Sim	Sim	Sim	1565	62,60	2,68
	66,4	25 (89%)	21,7	Sim	Sim	Sim	714	28,56	1,32
	66,6	20 (71%)	20,3	Sim	Sim	Sim	408	20,40	1,01
	65-10	28 (100%)	22,9	Sim	Não	Sim	29	1,04	0,05
	65-11	17 (61%)	21,9	Sim	Não	Não			
Média		25,8	21,8				371	15,23	0,68
DP		3,4	1,3				487	20,02	0,86

* = apresentou ao menos 1 normoglicemia nas últimas três aferições pré-óbito.

** = apresentou ao menos 1 hipoglicemia nas últimas três aferições pré-óbito.

DP = desvio padrão.

4.1 Evolução ponderal

A Figura 1 demonstra a evolução ponderal dos animais no período estudado. Foi possível observar que o tratamento com as insulinas não alterou significativamente o peso dos animais (peso no último dia $21,1 \pm 1,9$ g no NPH e $21,8 \pm 1,4$ g no GLAR, $p=0,99$).

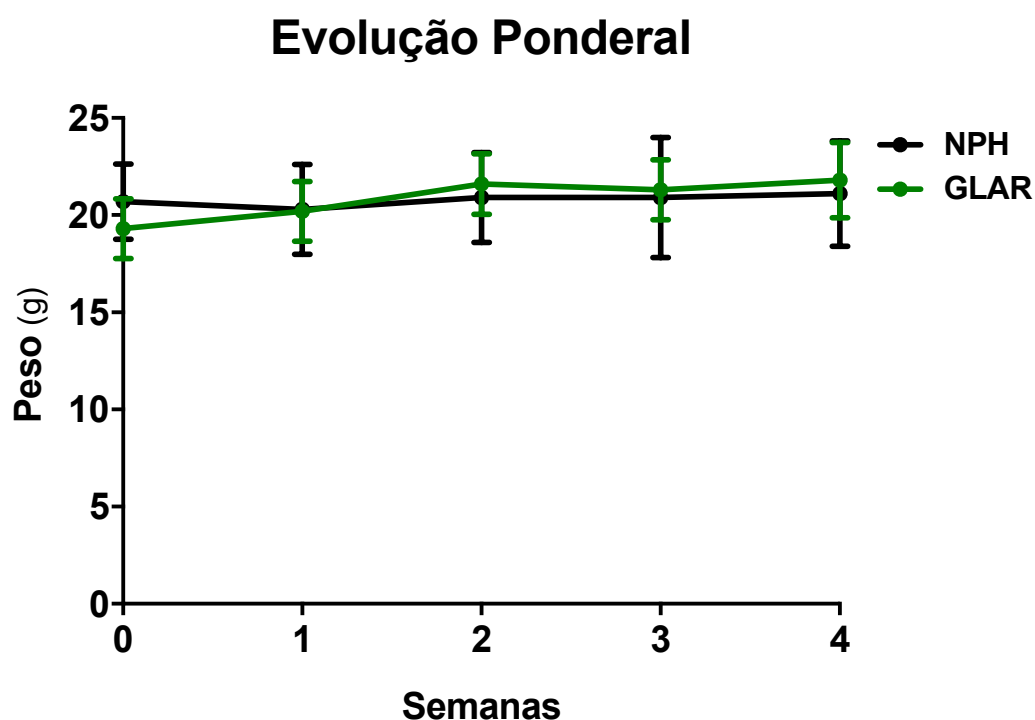


Figura 1. Evolução ponderal dos animais durante o protocolo experimental.

4.2 Evolução glicêmica

Na Figura 2, é possível observar a evolução glicêmica dos animais durante o protocolo experimental. A indução do diabetes por EZT (Pré-EZT) foi realizada com sucesso, onde os animais apresentaram glicemia acima de 300mg/dL após 5 dias da indução. A administração de insulina, na dose de 1U para ambas os tipos de insulina, foi realizada nos horários matutino (8h) e vespertino (17h), ou seja, a dose foi

fracionada, sendo administrada 1/3 da dose na manhã e 2/3 da dose à tarde. A princípio, a glicemia era verificada às 17h antes da administração da insulina (representando 3/4 de todo protocolo experimental - Semanas de 0 a 3 - Figura 2), entretanto, obtinha-se apenas hiperglicemia, não mostrando efeito hipoglicemiante das insulinas. Portanto, na última semana (Semanas de 3 a 4 - Figura 2), a glicemia foi verificada no período matutino após administração das insulinas. Não houve diferença das glicemias entre grupos ao longo do protocolo experimental ($p > 0,05$ para semanas de 0 a 3). Ao término do protocolo, os animais do grupo GLAR apresentaram a glicemia menor do que os animais do grupo NPH, entretanto, sem diferença significativa (glicemia última semana $248,2 \pm 121,27$ mg/dL no NPH e $108,6 \pm 105,10$ mg/dL no GLAR; $p = 0,34$).

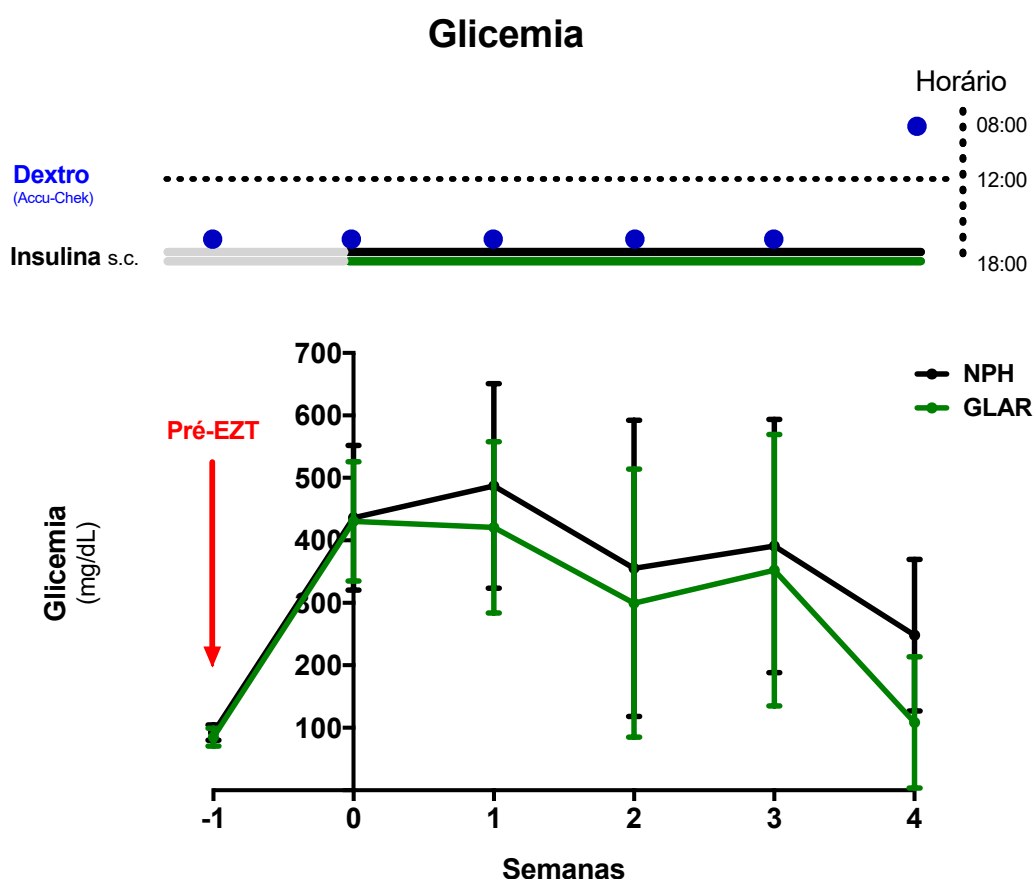


Figura 2. Evolução glicêmica durante o protocolo experimental. A glicemia foi verificada antes da injeção de EZT (Pré-EZT) e semanalmente após a indução ao DM. A ilustração Dextro (Accu-Chek) representa o horário em que a glicemia foi avaliada.

4.3 Sobrevida durante o protocolo experimental

A sobrevida dos animais está ilustrada na Figura 3. Do grupo NPH, 7 animais foram a óbito (47%), enquanto no grupo GLAR, 6 foram a óbito (40%). Como podemos observar, não houve diferença entre os tratamentos ($p=0,80$).

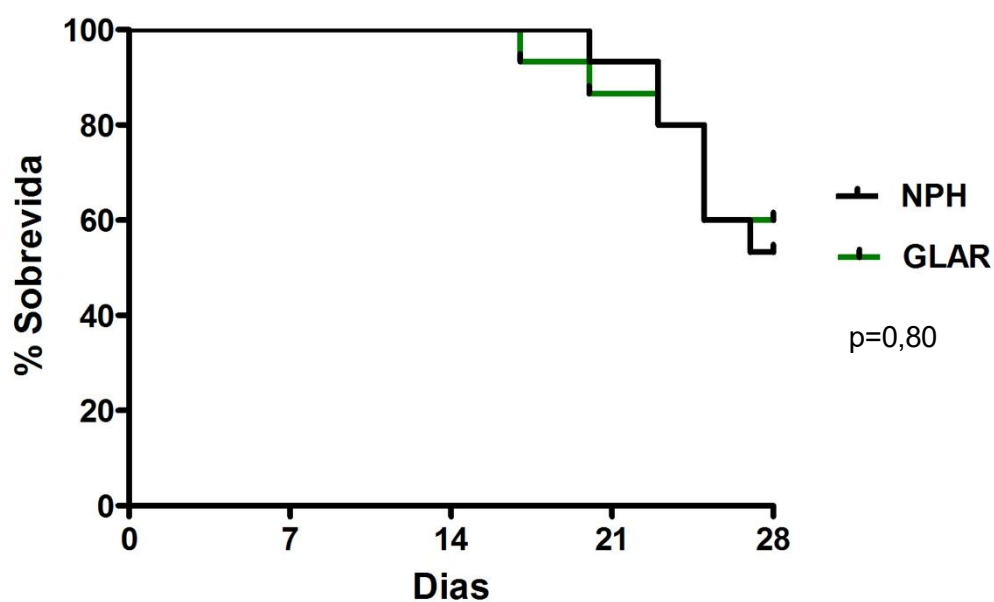


Figura 3. Sobrevida dos animais durante protocolo experimental. O gráfico Kaplan Meier demonstra que não houve diferença entre os grupos.

4.4 Volume tumoral

Com relação ao volume tumoral, não houve diferença entre os grupos ($1,23 \pm 1,70 \text{ mm}^3/\text{dia/g}$ no grupo NPH vs $0,68 \pm 0,86 \text{ mm}^3/\text{dia/g}$ no grupo GLAR; $p=0,92$). Podemos observar uma elevada variância (Tabela 2 e Figura 4).

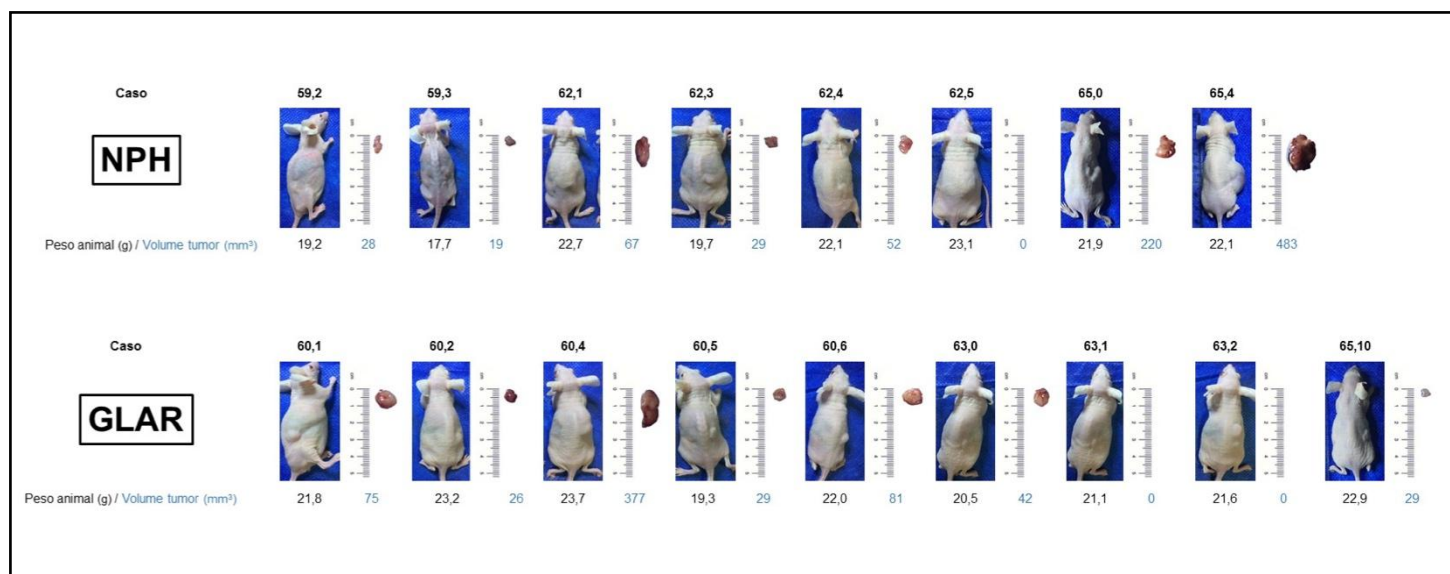


Figura 4. Peso corpóreo e volume tumoral dos animais que alcançaram o término do protocolo.

4.5 Análise da proliferação celular

A análise da proliferação de células BxPC3 foi realizada por meio de imunohistoquímica para PCNA e por PCR em tempo real para ciclina D1.

Pela análise qualitativa da imunohistoquímica, não houve diferença de atividade mitótica entre os grupos NPH e GLAR (Figura 5). Esse achado foi confirmado pela análise quantitativa da expressão de ciclina D1, demonstrando que não houve diferença entre os grupos (expressão relativa de $1,03 \pm 0,08$ no grupo NPH e $1,21 \pm 0,19$ no grupo GLAR; $p=0,40$) (Figura 6).

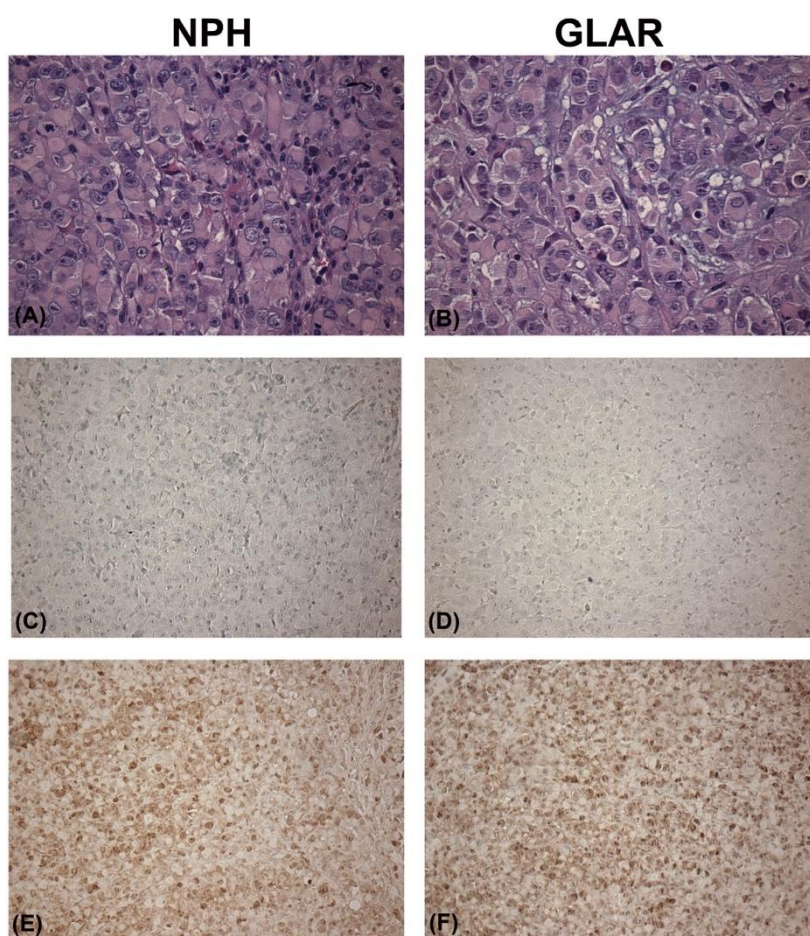


Figura 5. Coloração hematoxilina & eosina do tecido tumoral em magnificação de 400X (A e B, grupo NPH e GLAR, respectivamente). Controle negativo do método de imunohistoquímica em magnificação de 100X, onde o anticorpo primário anti-PCNA foi omitido (C e D, grupo NPH e GLAR, respectivamente). Imunohistoquímica para PCNA em células BxPC-3 (E e F, grupo NPH e GLAR, respectivamente) em magnificação de 100X, onde observamos os núcleos das células corados em marrom, representando a positividade para PCNA.

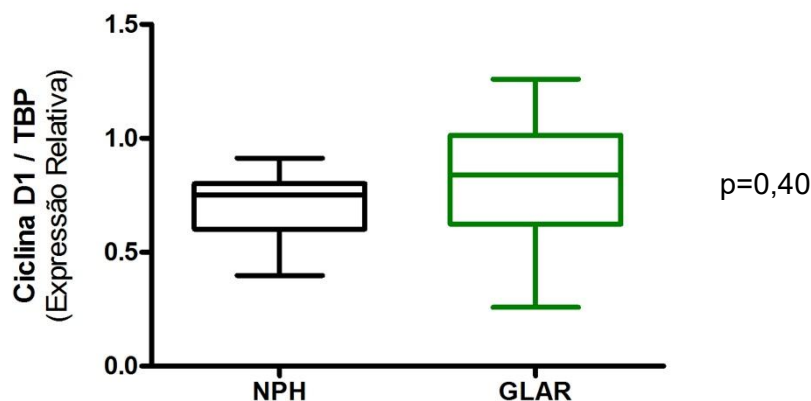


Figura 6. PCR em tempo real para análise da expressão de ciclina D1 em tumor de BxPC3. Grupo NPH (n=8) e grupo GLAR (n=7).

4.6 Expressão de receptor de IGF-I e de receptores de insulina

Para a verificação do efeito do tratamento com os 2 tipos de insulina sobre o receptor de IGF-I e sobre os receptores de insulina, foi verificada a expressão de IGF-IR e dos receptores de insulina IR-A e IR-B. Conforme analisado em PCR em tempo real, podemos observar que não houve diferença da expressão de IGF-IR (expressão relativa de $1,02 \pm 0,23$ no NPH e $0,98 \pm 0,21$ no GLAR; $p=0,67$), de IR-A (expressão relativa de $2,18 \pm 2,47$ no NPH e $1,26 \pm 1,20$ no GLAR; $p=0,79$) e de IR-B (expressão relativa de $1,02 \pm 0,21$ no NPH e $1,40 \pm 0,51$ no GLAR; $p=0,08$) (Figura 7).

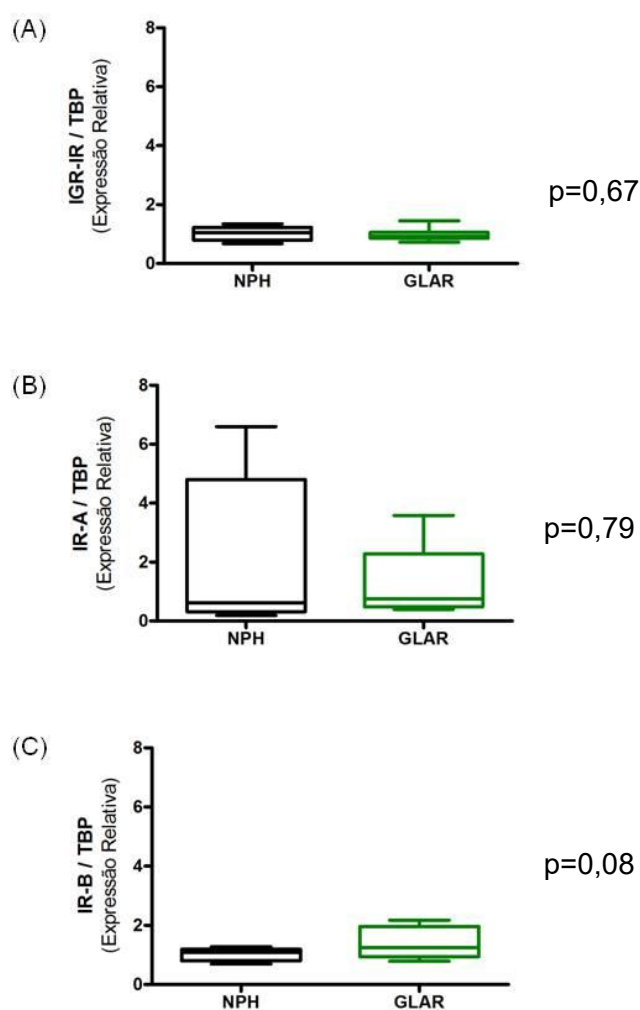


Figura 7. PCR em tempo real para análise da expressão de IGF-IR (A), de IR-A (B) e IR-B (C) em tumor de células BxPC3 após 28 dias de tratamento com as insulinas NPH e GLAR. n=8 cada grupo.

4.7 Expressão de VEGF-A

A expressão de VEGF-A também foi analisada. Conforme demonstrado na Figura 8, não houve diferença na expressão de VEGF-A entre os grupos analisados (Expressão relativa de $1,02 \pm 0,18$ no NPH e $1,25 \pm 0,43$ no GLAR; $p=0,21$).

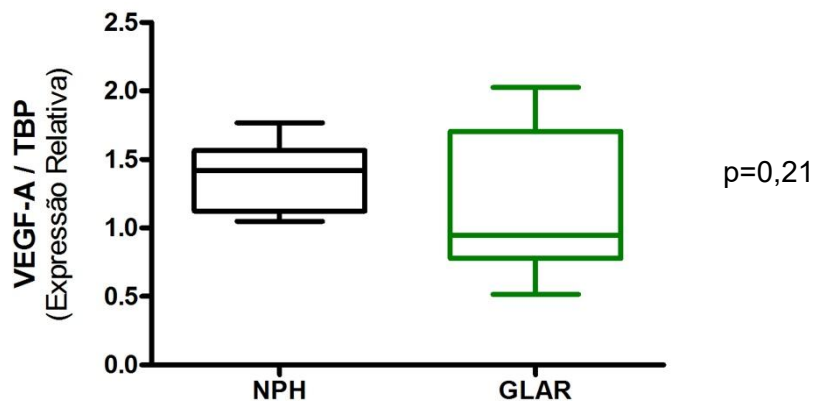


Figura 8. PCR em tempo real para análise da expressão de VEGF-A em tumor de células BxPC3 após 28 dias de tratamento com as insulinas. Grupo NPH (n=8) e grupo GLAR (n=7).

4.8 Correlação entre VEGF-A e tamanho do tumor

Foi realizada correlação entre a expressão de VEGF-A e medida dos tumores obtidos na última análise antes da eutanásia. Não houve correlação estatisticamente significativa no grupo tratado com NPH ($R=-0,035$, $p=0,96$) e Glargina ($R=0,285$, $p=0,55$), como ilustrado na Figura 9.

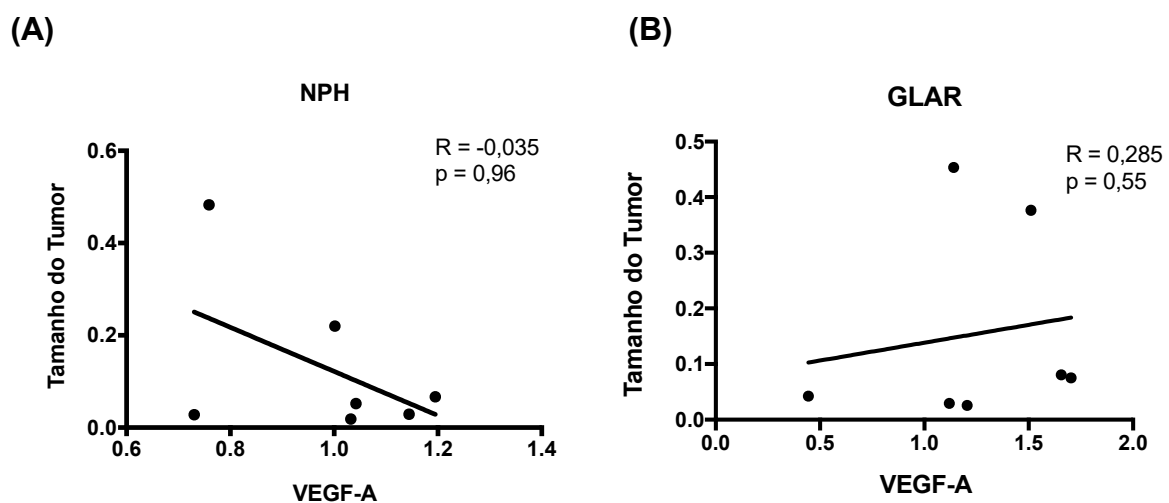


Figura 9. Correlação entre expressão de VEGF-A e tamanho tumoral. Grupo NPH (A) e grupo GLAR (B).

4.9 Análise de vias de sinalização ativadas por insulina

Foi realizado Western Blot para analisar o efeito dos tratamentos insulínicos sobre as vias relacionadas com o metabolismo e crescimento celular. Para isso, foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-AKT, anti-AKT-P, anti-mTOR, anti-mTOR-P e anti-IRS-1. Como podemos observar na Figura 10, não houve diferença na ativação das vias entre os tratamentos avaliados.

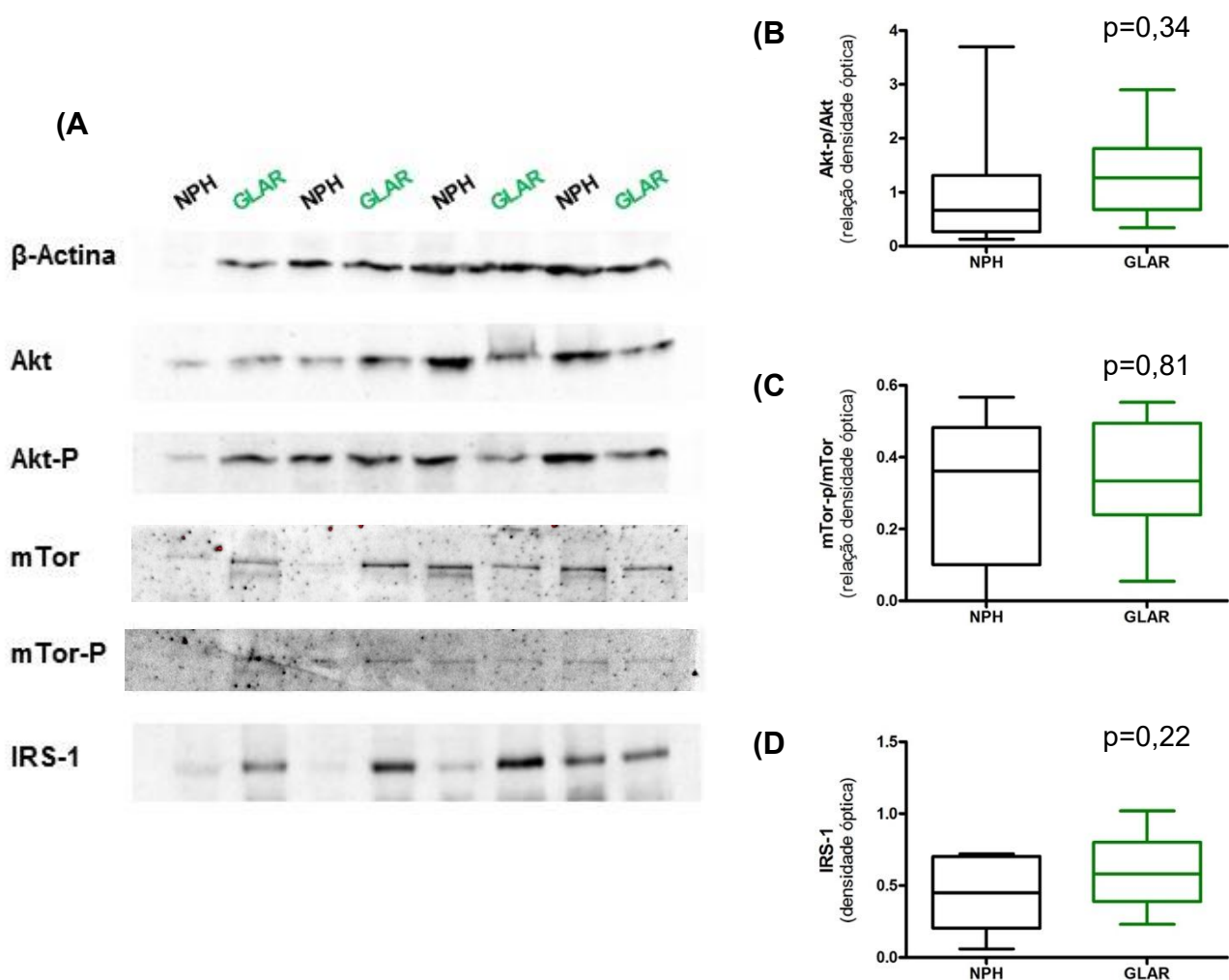


Figura 10. Western blot para vias de sinalização relacionadas à ativação insulínica. Representação de bandas referentes às vias de sinalização de 4 amostras de cada grupo (NPH e GLAR) (A). Análise semiquantitativa da via Akt (B), mTor (C) e IRS-1 (D). Grupo NPH (n=8) e grupo GLAR (n=6).

5 DISCUSSÃO

A literatura sugere que medicamentos utilizados no tratamento da hiperglicemia presente em portadores do DM, como por exemplo a insulina Glargina, um análogo da insulina humana, podem aumentar o risco de câncer. O efeito hipoglicemiante da insulina e seus análogos ocorre mediante ligação com receptores de insulina e IGF, que são receptores importantes devido ao potencial mitogênico, os quais são utilizados por células cancerígenas para crescimento e proliferação. No presente estudo, avaliamos o efeito da Glargina sobre o desenvolvimento de tumor de pâncreas ductal humano, a fim compará-la com a insulina convencional NPH, e ficou demonstrado que no modelo estudado, os análogos da insulina

A fim de mimetizar a hiperglicemia, foi utilizado um modelo de DM amplamente utilizado na literatura, onde utiliza-se EZT para destruição das células beta produtoras de insulina (DEEDS et al., 2011; GRAHAM et al., 2011). Graham e colaboradores mostraram que o tempo para os animais apresentarem glicemia acima de 300 mg/dL varia entre camundongos balb/c nude oriundos de diferentes laboratórios (GRAHAM et al., 2011), porém, mostrou que 96% dos animais apresentaram hiperglicemia entre os dias 4 e 5 após injeção com EZT, o que corrobora os dados do presente estudo onde os animais apresentaram hiperglicemia a partir de 5 dias. Após confirmação do diabetes pela hiperglicemia, ocorreu a inoculação das células BxPC3 e administração das insulinas, que foram administradas diariamente por 28 dias na dose de 1U/kg, fracionada nos horários matutino (8h) e vespertino (17h), administrada 1/3 da dose pela manhã e 2/3 da dose à tarde. A escolha pelo fracionamento ocorreu após protocolo piloto, onde a insulina Glargina era administrada na dose de 1U/kg, apenas uma vez ao dia, no horário das 17h (dados não apresentados). Durante o protocolo

piloto, alguns animais foram encontrados mortos ao amanhecer ou em hipoglicemia, o que nos levou a fracionar a dose, permitindo a sobrevivência dos animais. Esta dose utilizada diariamente está de acordo com a literatura, onde animais balb/c nude induzidos diabéticos por EZT receberam doses que variavam 0,1 à 1,2 U/kg/dia em um protocolo de 30 dias (GRAHAM et al., 2011).

Durante o protocolo experimental, entre as semanas 0 e 3, a glicemia foi verificada às 17h antes da administração da insulina, entretanto, obtinha-se apenas hiperglicemia, não mostrando o efeito hipoglicemiante das insulinas. Portanto, na última semana, a glicemia foi verificada no período matutino após administração das insulinas, onde ficou evidenciado o tratamento insulínico através da normoglicemia obtida, mesmo não analisando glicemia de jejum ou hemoglobina glicada (HbA1c). Observamos que a evolução glicêmica foi semelhante em ambos os grupos, embora os animais do grupo Glargina apresentassem glicemia inferior, não significativa, em comparação ao grupo NPH. A literatura demonstrou que o tratamento com Glargina promove efeito igual ou melhor sobre o controle glicêmico (BAZZANO et al., 2008; GARG et al., 2004; LAUBNER et al., 2014; LIU et al., 2016; ROSENSTOCK et al., 2001, 2005; SALEMYR; BANG; ÖRTQVIST, 2011) em relação a NPH, o que corrobora os nossos dados. Entretanto, embora exista grande variância nos nossos dados de glicemia, é possível observar semelhança com os dados de Graham e colaboradores, onde a variância entre as glicemias também foi alta (GRAHAM et al., 2011).

Um estudo foi realizado acompanhando-se pacientes diabéticos tratados com Glargina por 8 anos e mostrou que nesses pacientes houve melhora no controle metabólico (DĄBROWSKI, 2014), além disso, já foi demonstrado na Literatura que a taxa de mortalidade apresentou-se expressivamente menor em pacientes com melhor

controle glicêmico (VAN DEN BERGHE et al., 2001), entretanto, no presente estudo, não houve diferença estatística em relação à taxa de mortalidade. Nossos resultados também demonstram que 100% dos animais do grupo GLAR apresentaram ao menos 1 normoglicemia nas últimas três aferições antes do óbito, contra 40% dos animais no grupo NPH, sugerindo um melhor controle glicêmico no grupo GLAR, embora não significativo. Um estudo recente, analisou o risco de câncer em pacientes que fazem uso de insulina exógena, incluindo a Glargina, e revelou que 63% dos cânceres de pâncreas são diagnosticados no primeiro ano do tratamento insulínico (BUT et al., 2017). Este estudo também sugeriu que o controle glicêmico inadequado, promovido pelo uso de insulinas de ação rápida comumente utilizadas previamente à insulina Glargina, pode estar associado à incidência de câncer, pois comparando o tratamento a longo prazo da Glargina com insulina humana, houve diminuição do risco de câncer para aqueles tratados com Glargina, como também demonstra Ioacara e colaboradores (IOACARA et al., 2014). Sendo assim, a variação da glicemia encontrada no presente estudo poderia ter interferido no crescimento tumoral já que a Glargina promove um melhor controle glicêmico, o que refletiria nos tumores menores dos animais do grupo Glargina, embora sem significância estatística. Além disso, o controle metabólico permitiu que 53% dos animais do grupo NPH e 60% do grupo GLAR sobrevivessem por 28 dias. O estudo de Graham mostrou sobrevivência de 17%, 13% e 92% para animais adquiridos de laboratórios diferentes submetidos à indução por EZT e tratamento com Glargina (GRAHAM et al., 2011).

O acompanhamento da evolução ponderal mostrou que comparando os grupos não houve diferença de ganho de peso. Sendo assim, evidenciamos dados da literatura onde o tratamento com a insulina Glargina em humanos promoveu aumento

de peso de maneira semelhante ao tratamento com NPH (RIDDLE; ROSENSTOCK; GERICH, 2003; YKI-JÄRVINEN et al., 2000).

O tipo de câncer de pâncreas mais comum é o adenocarcinoma ductal, oriundo da parte exócrina do pâncreas, desenvolvendo-se nos ductos que transportam enzimas digestivas ao duodeno (KLEEFF et al., 2016). Embora relacionou-se *in vitro* a insulina com proliferação de células de adenocarcinoma ductal pancreático (DING et al., 2000), até o presente momento, não há na literatura estudo que demonstre o crescimento de células deste tipo de neoplasia com o tratamento com ambas insulinas. Outro estudo *in vitro* utilizando outras linhagens tumorais mostrou que a insulina Glargina, assim como os metabólitos gerados após sua inoculação, estimulou as células cancerígenas de maneira semelhante a insulina humana (SCIACCA et al., 2014). Comparando os resultados deste estudo com os nossos dados, observamos similaridade em relação a proliferação celular já que os tratamentos com NPH ou GLAR não gerou diferença no crescimento dos tumores.

A literatura já mostrou que em tumores de mama e pulmão, a expressão de IGF-IR está relacionada com a expressão de ciclina D1 (JONES et al., 2008). A relação entre IR com ciclina D1 também já foi demonstrada na literatura, pois ao silenciar o gene do IR em células de câncer de pâncreas, houve diminuição da expressão de ciclina D1 (KOLB et al., 2007). Observando as análises da proliferação por PCR em tempo real para ciclina D1 e imunohistoquímica para PCNA, concluímos que o efeito das insulinas sobre a proliferação das células BxPC-3 é semelhante. Ciclina D1 possui importante impacto na regulação da proliferação celular e já foi relacionada diversas vezes com a proliferação de células de câncer de pâncreas (BACHMANN et al., 2015; DEHARVENGT et al., 2010; KORNMANN; ARBER; KORC, 1998), onde sua expressão exacerbada indica um pior prognóstico (GANSAUGE et

al., 1997; KORNMAN et al., 1998), assim como para a expressão de PCNA (YUE et al., 2003). Um estudo in vitro demonstrou que, comparando o efeito das insulinas sobre a proliferação células de cânceres de próstata, mama e pulmão, a resposta é similar (SCIACCA et al., 2014). Em nosso estudo, observamos que as insulinas atuam semelhantemente, não havendo diferença entre os grupos quanto à proliferação celular.

Não encontramos diferença na expressão dos receptores de insulina e IGF-I, ou seja, ambas insulinas estimularam a expressão gênica desses receptores de maneira semelhante. Em um estudo com células de câncer de mama, foi mostrado que estímulo com insulina humana ou Glargina promove ativação semelhante do IR e IGF-IR, assim como proliferação celular mediante tratamento com as insulinas (OTHMAN et al., 2017). Um outro estudo utilizando insulina regular humana e Glargina, realizado em células de câncer de pâncreas, também mostrou que a proliferação, a apoptose, assim como a expressão dos receptores de insulina e IGF-I e IRS-2, apresentou-se semelhante mediante estímulo com ambas as insulinas, indicando que o tratamento com essas insulinas é seguro para pacientes com câncer de pâncreas (ERBEL et al., 2008).

Ao serem ativados, os receptores de insulina e IGF-I fosforilam o IRS-1, que por sua vez ativa as vias PI3K/AKT (BELFIORE et al., 2009). Um estudo demonstrou que células de câncer de pâncreas apresentam IRS-1 altamente expresso quando comparado com tecido pancreático normal (BERGMANN et al., 1996), sugerindo que IRS-1 favorece o excessivo crescimento de células cancerígenas mediante ativação das vias PI3K/AKT. Em nosso estudo, a expressão proteica de IRS-1 em tumores de células BxPC-3 foi semelhante para ambos os tratamentos com as insulinas.

A insulina atua na inibição da apoptose, crescimento e proliferação celular através da ativação dos receptores de insulina e IGF-I, e consequentemente as vias PI3K/AKT/mTOR e Ras/Raf/MEK/ERK (BELFIORE et al., 2009). Alguns constituintes dessas vias foram analisados neste estudo com o intuito de verificar a resposta intracelular após o tratamento com as insulinas. Observamos que as insulinas NPH e Glargina, ativaram semelhantemente as vias, conforme demonstrado pelo Western blot para AKT e mTOR. Uma resposta semelhante foi demonstrada em estudos em cânceres de mama (TENG et al., 2011), bexiga (LIU et al., 2011) e tireoide (MÜLLER; WEIDINGER; FÜHRER, 2010). Os dados observados para AKT e mTOR corroboram os dados de Ciclina D1, pois as vias PI3K/AKT/mTOR e Ras/Raf/MEK/ERK já foram descritas na literatura por sua relação com a indução de Ciclina D1 (AKTAS; CAI; COOPER, 1997; AMANATULLAH et al., 2001; CHANG et al., 2003; KERKHOFF; RAPP, 1997; LIANG; SLINGERLAND, 2003; WEBER et al., 1997; WINSTON et al., 1996). Em vista disto, concluímos que os tratamentos com as insulinas induzem similarmente essas vias de sinalização que, consequentemente, influencia o ciclo celular e proliferação, como observados por Ciclina D1 e PCNA.

Pela ativação PI3K/AKT/mTOR, promove a expressão de VEGF, que participa na angiogênese (MANNING; CANTLEY, 2007). Já foi demonstrado na literatura a relação entre VEGF e câncer pancreático ductal, onde ficou evidenciado a alta expressão de VEGF neste tecido tumoral (LIANG et al., 2010; SIVAPRASAD et al., 2013; TANG et al., 2006), além de se correlacionar positivamente com o tamanho do tumor (HOGENDORF et al., 2014). Entretanto, no presente estudo, correlacionando os dados da expressão gênica de VEGF-A e tamanho tumoral, não houve correlação significativa em ambos os grupos. A relação entre os tratamentos com as insulinas e VEGF foi analisada em nosso estudo através da expressão gênica de VEGF-A,

revelando que não houve diferença entre os tratamentos com as insulinas. Este resultado corrobora o estudo de Oikonomou e colaboradores (OIKONOMOU et al., 2014) que analisou o efeito do tratamento com as insulinas NPH e Glargina sobre células progenitoras endoteliais, que são células participam na reparação endotelial e angiogênese (TAKAYUKI ASAHARA, TOYOAKI MUROHARA, ALISON SULLIVAN, 1997). Foi demonstrado que o tratamento com as insulinas agiu de maneira semelhante sobre as células progenitoras endoteliais, não havendo diferenças entre os tratamentos (OIKONOMOU et al., 2014).

Algumas limitações do estudo podem ser consideradas. Primeiramente, o modelo de DM utilizado neste estudo, o DM do tipo 1, não reflete o ambiente inflamatório presente no paciente diabético do tipo 2, que por si, poderia influenciar na dinâmica tratamento insulínico e crescimento tumoral. Segundo, não houve um grupo diabético sem tratamento insulínico (grupo SHAM) para avaliarmos o efeito exclusivamente da hiperglicemia sobre a linhagem celular utilizada neste estudo, em visto que em estudo piloto realizado previamente os animais não sobreviveram durante 28 dias devido à hiperglicemia (dados não apresentados). Terceiro, durante o protocolo experimental, a glicemia não foi avaliada nos animais em jejum ou por dosagem de HbA1c, como recomendam a *American Diabetes Association* (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2016) e Sociedade Brasileira de Diabetes (DIABETES, 2016) para avaliação da glicemia em humanos. Entretanto, o presente estudo baseou-se em outros estudos em modelo de DM em roedores e nas duas sociedades acima citadas que também sugerem avaliação da glicemia ao acaso, considerando o indivíduo diabético aquele que apresentar glicemia acima de 200mg/dL. Finalmente, em relação aos animais, foi utilizado apenas fêmeas neste

estudo devido às limitações técnicas, entretanto isso não invalida o estudo pois o tipo de câncer estudado acomete indivíduos do sexo masculino e feminino.

Os resultados apresentados pelo presente estudo corroboram o comunicado de segurança apresentado pela FDA e outros estudos em relação à segurança e risco de câncer ao utilizar a insulina Glargina para tratamento do DM. Os resultados obtidos pelo acompanhamento dos animais como crescimento tumoral, peso e glicemia, demonstram equivalência entre os tratamentos com as insulinas, e isso se aplica aos dados obtidos pela análise da expressão dos receptores de insulina e IGF e vias de sinalizações, especialmente aquelas relacionadas com proliferação celular, ativadas pela insulina.

6 CONCLUSÃO

No modelo estudado, não houve diferença entre a insulina Glargina e a insulina NPH tratando-se de crescimento tumoral, proliferação celular, expressão de receptores insulínicos e ativação das vias de sinalização AKT e mTOR.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKTAS, H.; CAI, H.; COOPER, G. M. Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1. **Molecular and cellular biology**, v. 17, n. 7, p. 3850–7, 1997.

AMANATULLAH, D. F. et al. Ras regulation of cyclin D1 promoter. **Methods in enzymology**, v. 333, p. 116–27, 2001.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. **Diabetes Care**, v. 39, n. Supplement 1, p. S13–S22, jan. 2016.

BACHMANN, K. et al. Cyclin D1 is a strong prognostic factor for survival in pancreatic cancer: Analysis of CD G870A polymorphism, FISH and immunohistochemistry. **Journal of Surgical Oncology**, v. 111, n. 3, p. 316–323, 2015.

BARBOSA, R. et al. 1-Methyl-D-Tryptophan Potentiates TGF- β - Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in T24 Human Bladder Cancer Cells. p. 1–16, 2015.

BARTHEL, A.; SCHMOLL, D.; UNTERMAN, T. G. FoxO proteins in insulin action and metabolism. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n. 4, p. 183–189, 2005.

BAZZANO, L. A. et al. Safety and efficacy of glargine compared with NPH insulin for the treatment of Type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Diabetic Medicine**, v. 25, n. 8, p. 924–932, ago. 2008.

BELFIORE, A. et al. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 6, p. 586–623, 2009.

BERGMANN, U. et al. Increased expression of insulin receptor substrate-1 in human pancreatic cancer. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 220, n. 3, p. 886–90, 1996.

BLIN, P. et al. Insulin glargine and risk of cancer: A cohort study in the French National Healthcare Insurance Database. **Diabetologia**, v. 55, n. 3, p. 644–653, 2012.

BORDELEAU, L. et al. The association of basal insulin glargine and/or n-3 fatty acids with incident cancers in patients with dysglycemia. **Diabetes Care**, v. 37, n. 5, p. 1360–1366, 2014.

BRAHMKHATRI, V. P.; PRASANNA, C.; ATREYA, H. S. Insulin-like growth factor system in cancer: Novel targeted therapies. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

BUT, A. et al. Cancer risk among insulin users: comparing analogues with human insulin in the CARING five-country cohort study. **Diabetologia**, 2017.

CHANG, C.-H. et al. Cancer risk associated with insulin glargine among adult type 2 diabetes patients--a nationwide cohort study. **PloS one**, v. 6, n. 6, p. e21368, 2011.

CHANG, F. et al. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. **Leukemia**, v. 17, n. 3, p. 590–603, 2003.

COLHOUN, H. M. Use of insulin glargine and cancer incidence in Scotland: A study from the Scottish Diabetes Research Network Epidemiology Group. **Diabetologia**, v. 52, n. 9, p. 1755–1765, 2009.

COSTACHE, M. I. et al. VEGF expression in pancreatic cancer and other malignancies: a review of the literature. **Romanian Journal Of Internal Medicine**, v. 53, n. 3, p. 1–10, 2015.

CURRIE, C. J.; POOLE, C. D.; GALE, E. A. M. The influence of glucose-lowering therapies on cancer risk in type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 52, n. 9, p. 1766–1777, 2009.

DĄBROWSKI, M. The outcome of care in people with type 1 diabetes after switching to insulin glargine-based regimens in a real-life setting: a long-term observational study. **International Journal of Clinical Practice**, v. 68, n. 8, p. 1020–1028, ago. 2014.

DE MEYTS, P. The insulin receptor: a prototype for dimeric, allosteric membrane receptors? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 33, n. 8, p. 376–384, 2008.

DEEDS, M. C. et al. Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. **Laboratory Animals**, v. 45, n. 3, p. 131–140, jul. 2011.

DEHARVENGT, S. J. et al. Intratumoral delivery of shRNA targeting cyclin D1 attenuates pancreatic cancer growth. **Cancer Gene Therapy**, v. 17, n. 5, p. 325–333, 23 maio 2010.

DIABETES, S. B. DE. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016)**. São Paulo: AC FARMACÉUTICA LTDA, 2016. v. 5

DING, X. Z. et al. Physiological concentrations of insulin augment pancreatic cancer cell proliferation and glucose utilization by activating MAP kinase, PI3 kinase and enhancing GLUT-1 expression. **Pancreas**, v. 21, n. 3, p. 310–20, out. 2000.

DU, X. et al. Insulin glargine and risk of cancer: a meta-analysis. **The International Journal of Biological Markers**, v. 27, n. 3, p. 241–246, 8 out. 2012.

ERBEL, S. et al. Proliferation of Colo-357 Pancreatic Carcinoma Cells and Survival of Patients With Pancreatic Carcinoma Are Not Altered by Insulin Glargine. **Diabetes Care**, v. 31, n. 6, p. 1105–1111, 1 jun. 2008.

FAGOT, J. P. et al. Does insulin glargine increase the risk of cancer compared with other basal insulins? A French nationwide cohort study based on national administrative databases. **Diabetes Care**, v. 36, n. 2, p. 294–301, 2013.

GANSAUGE, S. et al. Overexpression of cyclin D1 in human pancreatic carcinoma is associated with poor prognosis. **Cancer Res**, v. 57, n. 9, p. 1634–1637, 1997.

GARG, S. K. et al. Reduced severe hypoglycemia with insulin glargine in intensively treated adults with type 1 diabetes. **Diabetes Technol Ther**, v. 6, n. 5, p. 589–595, 2004.

GEWINNER, C. et al. Evidence that Inositol Polyphosphate 4-Phosphatase Type II Is a Tumor Suppressor that Inhibits PI3K Signaling. **Cancer Cell**, v. 16, n. 2, p. 115–125, ago. 2009.

GIOVANNUCCI, E. et al. Diabetes and cancer: A consensus report. **Diabetes Care**, v. 33, n. 7, p. 1674–1685, 2010.

GRAHAM, M. L. et al. The streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: Differences between animals from different sources. **Comparative Medicine**, v. 61, n. 4, p. 356–360, 2011.

HABEL, L. A. et al. Cohort study of insulin glargine and risk of breast, prostate, and colorectal cancer among patients with diabetes. **Diabetes care**, v. 36, n. 12, p. 3953–60, 1 dez. 2013.

HARDING, J. L. et al. Cancer risk among people with type 1 and type 2 diabetes: Disentangling true associations, detection bias, and reverse causation. **Diabetes Care**, v. 38, n. 2, p. 264–270, 2015.

HEIMBERG, H. et al. Heterogeneity in glucose sensitivity among pancreatic beta-cells is correlated to differences in glucose phosphorylation rather than glucose transport. **The EMBO journal**, v. 12, n. 7, p. 2873–9, 1993.

HEMKENS, L. G. et al. Risk of malignancies in patients with diabetes treated with human insulin or insulin analogues: A cohort study. **Diabetologia**, v. 52, n. 9, p. 1732–1744, 2009.

HOGENDORF, P. et al. Pancreatic head carcinoma and vascular endothelial growth factor (VEGF-A) concentration in portal blood: its association with cancer grade, tumor size and probably poor prognosis. **Archives of Medical Science**, v. 2, n. 2, p. 288–293, 2014.

HOME, P. D.; ASHWELL, S. G. Insulin glargine: the first clinically useful extended-action insulin analogue. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 2, n. 11, p. 1891–1902, 24 nov. 2001.

HUBBARD, P. A.; MOODY, C.; MURALI, R. Allosteric modulation of Ras and the PI3K/AKT/mTOR pathway: Emerging therapeutic opportunities. **Frontiers in**

Physiology, v. 5, n. Nov, p. 1–7, 2014.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas - Seventh Edition**. [s.l: s.n.].

IOACARA, S. et al. Cancer Specific Mortality in Insulin-Treated Type 2 Diabetes Patients. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e93132, 25 mar. 2014.

JANSSEN, J. A. M. J. L.; VAREWIJCK, A. J. Insulin analogs and cancer: A note of caution. **Frontiers in Endocrinology**, v. 5, n. MAY, p. 1–8, 2014.

JONASSON, J. M. et al. Insulin glargine use and short-term incidence of malignancies-a population-based follow-up study in Sweden. **Diabetologia**, v. 52, n. 9, p. 1745–1754, 2009.

JONES, R. A et al. Characterization of a Novel Primary Mammary Tumor Cell Line Reveals that Cyclin D1 Is Regulated by the Type I Insulin-Like Growth Factor Receptor. **Molecular Cancer Research**, v. 6, n. 5, p. 819–828, 1 maio 2008.

JOOST, H.-G. Diabetes and cancer: Epidemiology and potential mechanisms. **Diabetes and Vascular Disease Research**, v. 11, n. 6, p. 390–394, nov. 2014.

KARLSTAD, O. et al. Use of insulin and insulin analogs and risk of cancer - systematic review and meta-analysis of observational studies. **Current drug safety**, v. 8, n. 5, p. 333–348, 2013.

KATO, H. et al. Metformin inhibits the proliferation of human prostate cancer PC-3 cells via the downregulation of insulin-like growth factor 1 receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 461, n. 1, p. 115–121, 2015.

KERKHOFF, E.; RAPP, U. R. Induction of cell proliferation in quiescent NIH 3T3 cells by oncogenic c-Raf-1. **Molecular and cellular biology**, v. 17, n. 5, p. 2576–86, 1997.
KLEEFF, J. et al. Pancreatic cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, n. April, p. 16022, 21 abr. 2016.

KNIGHT, T.; IRVING, J. A. E. Ras/Raf/MEK/ERK Pathway Activation in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Therapeutic Targeting. **Frontiers in oncology**, v. 4, n. June, p. 160, 2014.

KOLB, S. et al. HMGA1 controls transcription of insulin receptor to regulate cyclin D1 translation in pancreatic cancer cells. **Cancer Research**, v. 67, n. 10, p. 4679–4686, 2007.

KORNMAN, M. et al. Increased cyclin D1 in human pancreatic cancer is associated with decreased postoperative survival. **Oncology**, v. 55, n. 4, p. 363–369, 1998.

KORNMAN, M.; ARBER, N.; KORC, M. Inhibition of basal and mitogen-stimulated pancreatic cancer cell growth by cyclin D1 antisense is associated with loss of tumorigenicity and potentiation of cytotoxicity to cisplatin. **Journal of Clinical**

Investigation, v. 101, n. 2, p. 344–352, 1998.

LAUBNER, K. et al. Daily insulin doses and injection frequencies of neutral protamine hagedorn (NPH) insulin, insulin detemir and insulin glargine in type 1 and type 2 diabetes: A multicenter analysis of 51964 patients from the German/Austrian DPV-wiss database. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 30, n. 5, p. 395–404, 2014.

LIANG, J.; SLINGERLAND, J. M. Multiple Roles of the PI3K/PKB (Akt) Pathway in Cell Cycle Progression. **Cell Cycle**, v. 2, n. 4, p. 336–342, 2003.

LIANG, Q. L. et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factor and connexin43 for predicting pancreatic cancer clinicopathologic parameters. **Medical Oncology**, v. 27, n. 4, p. 1164–1170, 2010.

LIM, S. et al. Electronic medical record cancer incidence over six years comparing new users of glargine with new users of NPH insulin. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 5–12, 2014.

LIND, M. et al. The relationship between the exposure time of insulin glargine and risk of breast and prostate cancer: An observational study of the time-dependent effects of antidiabetic treatments in patients with diabetes. **Primary Care Diabetes**, v. 6, n. 1, p. 53–59, 2012.

LIU, M. et al. A randomised, open-label study of insulin glargine or neutral protamine Hagedorn insulin in Chinese paediatric patients with type 1 diabetes mellitus. **BMC Endocrine Disorders**, v. 16, n. 1, p. 67, 2016.

LIU, S. et al. High dose human insulin and insulin glargine promote T24 bladder cancer cell proliferation via PI3K-independent activation of Akt. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 91, n. 2, p. 177–182, 2011.

LJUNG, R. et al. Insulin glargine use and short-term incidence of malignancies ? a three-year population-based observation. **Acta Oncologica**, v. 50, n. 5, p. 685–693, 21 jun. 2011.

MA, X. M.; BLENIS, J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 10, n. 5, p. 307–18, 2 maio 2009.
MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1261–1274, 2007.

MARSCHALL, Z. VON et al. De novo expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer: Evidence for an autocrine mitogenic loop. **Gastroenterology**, v. 119, n. 5, p. 1358–1372, nov. 2000.

MARUYAMA, I. N. Mechanisms of activation of receptor tyrosine kinases: monomers or dimers. **Cells**, v. 3, n. 2, p. 304–30, 2014.

MAYER, D.; CHANTELAU, E. Treatment with insulin glargine (Lantus) increases the

proliferative potency of the serum of patients with type-1 diabetes: a pilot study on MCF-7 breast cancer cells. **Archives of physiology and biochemistry**, v. 116, n. 2, p. 73–8, 2010.

MCCUBREY, J. A. et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1773, n. 8, p. 1263–1284, ago. 2007.

MORDEN, N. E. et al. Further exploration of the relationship between insulin glargine and incident cancer: A retrospective cohort study of older medicare patients. **Diabetes Care**, v. 34, n. 9, p. 1965–1971, 2011.

MÜLLER, K.; WEIDINGER, C.; FÜHRER, D. Insulin glargine and insulin have identical effects on proliferation and phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signalling in rat thyrocytes and human follicular thyroid cancer cells. **Diabetologia**, v. 53, n. 5, p. 1001–1003, 2010.

OIKONOMOU, D. et al. Influence of insulin and glargine on outgrowth and number of circulating endothelial progenitor cells in type 2 diabetes patients: a partially double-blind, randomized, three-arm unicenter study. **Cardiovascular diabetology**, v. 13, n. 1, p. 137, 2014.

OTHMAN, E. M. et al. IR and IGF-1R expression affects insulin induced proliferation and DNA damage. **Toxicology in Vitro**, v. 39, n. December, p. 68–74, 2017.

PEETERS, P. J. H. L. et al. Insulin glargine use and breast cancer risk: Associations with cumulative exposure. **Acta oncologica (Stockholm, Sweden)**, v. 55, n. 7, p. 851–8, 2016.

PIERRE-EUGENE, C. et al. Effect of insulin analogues on insulin/IGF1 hybrid receptors: Increased activation by glargine but not by its metabolites M1 and M2. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012.

QIN, J. et al. Glargine Promotes Human Colorectal Cancer Cell Proliferation via Upregulation of miR-95. **Hormone and Metabolic Research**, v. 47, n. 11, p. 861–865, 11 fev. 2015.

RIDDLE, M.; ROSENSTOCK, J.; GERICH, J. The Treat-to-Target Trial. **Diabetes Care**, v. 26, n. 11, p. 3080–3086, 2003.

ROSENSTOCK, J. et al. Basal insulin therapy in type 2 diabetes: 28-week comparison of insulin glargine (HOE 901) and NPH insulin. **Diabetes care**, v. 24, n. 4, p. 631–6, abr. 2001.

ROSENSTOCK, J. et al. Reduced Hypoglycemia Risk With Insulin Glargine: A meta-analysis comparing insulin glargine with human NPH insulin in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 28, n. 4, p. 950–955, 1 abr. 2005.

ROSENSTOCK, J. et al. Similar risk of malignancy with insulin glargine and neutral

protamine Hagedorn (NPH) insulin in patients with type 2 diabetes: Findings from a 5 year randomised, open-label study. **Diabetologia**, v. 52, n. 9, p. 1971–1973, 2009.

RUITER, R. et al. Risk of cancer in patients on insulin glargine and other insulin analogues in comparison with those on human insulin: Results from a large population-based follow-up study. **Diabetologia**, v. 55, n. 1, p. 51–62, 2012.

SALEMYR, J.; BANG, P.; ÖRTQVIST, E. Lower HbA1c after 1 year, in children with type 1 diabetes treated with insulin glargine vs. NPH insulin from diagnosis: A retrospective study. **Pediatric Diabetes**, v. 12, n. 5, p. 501–505, 2011.

SATIJA, A. et al. Type 2 diabetes and risk of cancer. **BMJ**, v. 350, n. jan02 1, p. g7707–g7707, 2 jan. 2015.

SCAPPATICCIO, L. et al. Insights into the relationships between diabetes, prediabetes, and cancer. **Endocrine**, v. 56, n. 2, p. 231–239, 31 maio 2017.

SCIACCA, L. et al. Biological Effects of Insulin and Its Analogs on Cancer Cells With Different Insulin Family Receptor Expression. **Journal of Cellular Physiology**, v. 229, n. 11, p. 1817–1821, 2014.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7–30, jan. 2017.

SIVAPRASAD, S. et al. Association of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene polymorphism and increased serum VEGF concentration with pancreatic adenocarcinoma. **Pancreatology**, v. 13, n. 3, p. 267–272, maio 2013.

STÜRMER, T. et al. Cancer incidence among those initiating insulin therapy with glargine versus human NPH insulin. **Diabetes Care**, v. 36, n. 11, p. 3517–3525, 2013.
SUBRAMANI, R. et al. Targeting insulin-like growth factor 1 receptor inhibits pancreatic cancer growth and metastasis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, 2014.

SUISSA, S. et al. Long-term effects of insulin glargine on the risk of breast cancer. **Diabetologia**, v. 54, n. 9, p. 2254–2262, 2011.

TAKAYUKI ASAHARA, TOYOAKI MUROHARA, ALISON SULLIVAN. Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis: PMID: 9020076. **Science**, v. 275, n. 5302, p. 964–7, 1997.

TANG, R.-F. et al. Expression of vascular endothelial growth factors A and C in human pancreatic cancer. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 12, n. 2, p. 280–6, 2006.

TANG, X. et al. Insulin Glargine and Cancer Risk in Patients with Diabetes: A Meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.

TENG, J.-A. et al. Glargine Promotes Proliferation of Breast Adenocarcinoma Cell Line MCF-7 via AKT Activation. **Hormone and Metabolic Research**, v. 43, n. 8, p. 519–523, 19 jul. 2011.

TOMAYKO, M. M.; REYNOLDS, C. P. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 24, n. 3, p. 148–154, 1989.

ULLMAN-CULLERÉ, M. H.; FOLTZ, C. J. Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice. **Laboratory animal science**, v. 49, n. 3, p. 319–23, jun. 1999.

VAN DEN BERGHE, G. et al. Intensive Insulin Therapy in Critically Ill Patients. **New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 19, p. 1359–1367, 8 nov. 2001.

WEBER, J. D. et al. Sustained activation of extracellular-signal-regulated kinase 1 (ERK1) is required for the continued expression of cyclin D1 in G1 phase. **The Biochemical journal**, v. 326 (Pt 1, p. 61–8, 1997.

WILCOX, G. Insulin and insulin resistance. **The Clinical biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists**, v. 26, n. 2, p. 19–39, 2005.

WINSTON, J. T. et al. Regulation of the cell cycle machinery by oncogenic ras. **Oncogene**, v. 12, n. 1, p. 127–34, 4 jan. 1996.

YKI-JÄRVINEN, H. et al. Less nocturnal hypoglycemia and better post-dinner glucose control with bedtime insulin glargine compared with bedtime NPH insulin during insulin combination therapy in type 2 diabetes. HOE 901/3002 Study Group. **Diabetes care**, v. 23, n. 8, p. 1130–6, ago. 2000.

YUE, H. et al. Expression of p57kip2, Rb protein and PCNA and their relationships with clinicopathology in human pancreatic cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 9, n. 2, p. 377–380, 2003.