

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

RENATO VAN WILPE BACH

PAPEL DE GLICOSE E INSULINA NO CRESCIMENTO TUMORAL EM MODELO
BALB/C-4T1 DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO MURINO

PONTA GROSSA
2020

RENATO VAN WILPE BACH

PAPEL DE GLICOSE E INSULINA NO CRESCIMENTO TUMORAL EM MODELO
BALB/C-4T1 DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO MURINO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual de Ponta Grossa, associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Giovani Marino Favero

Coorientador: Prof^a. Dr^a Louise Nicolle Bach Kmetiuk

PONTA GROSSA

2020

B117 Bach, Renato Van Wilpe
Papel de glicose e insulina no crescimento tumoral em Modelo Balb/C-4t1 de Adenocarcinoma Mamário Murino / Renato Van Wilpe Bach. Ponta Grossa, 2020. 54 f.

Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Giovani Marino Favero.

Coorientadora: Profa. Dra. Louise Nicolle Bach Kmetiuk.

1. Neoplasia mamária experimental. 2. Transtornos do metabolismo de glucose. 3. Insulina. 4. Dieta hiperlipídica. I. Favero, Giovani Marino. II. Kmetiuk, Louise Nicolle Bach. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. IV.T.

CDD: 615.321



Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Programa de
Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas
Associação Ampla entre a
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a Universidade Estadual de Ponta



Ponta Grossa, 26 de junho de 2020.

ATA DE EXAME DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCIÊNCIAS APLICADAS À FARMÁCIA NÚMERO 03/2020 DO DOUTORANDO RENATO VAN WILPE BACH REALIZADA NO DIA 26 DE JUNHO DE 2020, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Aos vinte e seis dias de junho de dois mil e vinte, às 10h00min, via videoconferência, na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em sessão pública sob a presidência do Professor Doutor Giovani Marino Favero reuniu-se a Banca Examinadora de exame de defesa de tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas do doutorando Renato Van Wilpe Bach, na linha de pesquisa: Avaliação Clínico-laboratorial de Processos Fisiopatológicos, constituída pelo Professor Doutor Giovani Marino Favero (UEPG/PR) e demais Doutores (membros titulares): Alexander Welker Biondo (UFPR/PR), Leandro Cavalcante Lipinski (UEPG/PR), José Fabiano Costa Justus (UEPG/PR) e Alfredo Benjamin Duarte Silva (UFPR/PR). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem o exame de defesa de tese de Doutorado e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição.

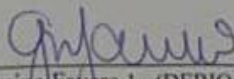
O título do trabalho foi: "PAPEL DA GLICOSE E INSULINA NO CRESCIMENTO TUMORAL EM MODELO BALB/C-4TI DE ADENOCARCINOMA MAMÁRIO MURINO".

Encerrada a defesa, a banca pronunciou-se APROVADO a tese, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. O aluno deverá entregar, no prazo de até 30 dias, a versão definitiva da tese de Doutorado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): _____

Alteração de título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____


Giovani Marino Favero I - (DEBIO - UEPG) Presidente

Pró - Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à Farmácia - Fone (42)
3220-3337 - ppgr@hotmil.com
Av. Carlos Cavalcanti, 4748 - Ponta Grossa - Paraná - Brasil - CEP: 84030-900

Alexander Welker Biondo

Alexander Welker Biondo 2 - (Med. Veterinária - UFPR) – Titular

Leandro Cavalcante Lipinski

Leandro Cavalcante Lipinski 3 - (DEMED - UEPG) – Titular

José Fabiano Costa Justus

José Fabiano Costa Justus 4 - (DEBIO - UEPG) – Titular

Alfredo Benjamin Duarte Silva

Alfredo Benjamin Duarte Silva 5 - (Anatomia e cirurgia - UPPR) – Titular

Dedicado a Mônica, minha esposa e Thomas, meu caçula.
Sem esquecer de Goldie, It II, Brownie e Nenhum, nossos pets.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Giovani Marino Favero, orientador deste trabalho, pela oportunidade, pelas ideias, pelo apoio.

À Prof^a Dra. Louise Nicolle Bach Kmetiuk, minha coorientadora, grande incentivadora, capaz de organizar pensamentos e resultados, sem os quais este trabalho não existiria.

Aos alunos de graduação em Medicina Aryadyne Bueno Rocha Szesz e João Henrique Roceto pelo cuidado extremo com os espécimes, retidão e espírito científico nos procedimentos.

Ao Prof. Dr. Leandro Cavalcante Lipinski, que, pessoalmente e através do Biotério, deu suporte e estrutura para a realização de procedimentos experimentais.

Aos colegas do Biotério da UEPG, exemplares em todos os aspectos. Aos colegas da Área de Anatomia Humana, pela torcida e apoio.

Ao Departamento de Bioquímica da UFPR pelo apoio e disponibilidade em trocar conhecimentos e atuar em equipe.

Aos professores do Departamento de Farmácia e do Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO) e da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

A possibilidade de inovar sempre está aí se alguém está disposto a refletir, a deixar
ir a certeza de onde está parado e a perguntar-se se quer estar onde está.

(Humberto Maturana)

RESUMO

CENÁRIO: Como a maioria dos cânceres de mama humanos têm demonstrado superexpressão de receptores de insulina, níveis de glicose e uso de insulina podem possivelmente afetar os desfechos clínicos do câncer de mama. No entanto, o exato papel de dieta Hiperlipídica (HFD), hiperglicemia e hiperinsulinemia no câncer de mama permanecem pouco claros. **OBJETIVO:** avaliar o papel de dieta hiperlipídica, glicemia e uso de insulina no crescimento tumoral de adenocarcinoma mamário in vivo. **MÉTODO:** Camundongos adultos fêmeas (Rodentia muridae, Mus musculus, Balb-C lineage) foram submetidas a implantação subcutânea de células de adenocarcinoma mamário murino (células da linhagem 4T1), randomizados em quatro grupos. Grupo 1 recebeu somente implantação tumoral (4T1), Grupo 2, implantação tumoral e dieta hiperlipídica (4T1-HFD), Grupo 3, implantação tumoral e insulina (4T1-INS) e Grupo 4, implantação tumoral, dieta hiperlipídica e insulina (4T1-HFD-INS). Medidas e testes laboratoriais foram aferidos nos dias 15 e 30 de experimentação. **RESULTADOS:** este artigo apresenta resultados macroscópicos e laboratoriais. HFD esteve correlacionada com maior volume tumoral ($p=0,0492$), exceto se associada a insulina ($p=0,0168$), mas não a níveis mais altos de glicemia. Grupos que receberam insulina mostraram menor amplitude de crescimento tumoral, mas não houve diferença entre os níveis finais de glicose (no D30) entre os grupos. Os níveis de glicemia não se correlacionaram com maiores volumes tumorais. Invasão tumoral do membro superior homolateral foi comum em todos os grupos (66,7% a 100%), sem diferença entre os grupos ($p=0.9471$). Metástases pulmonares foram mais frequentes em grupos que receberam insulina ($p<0,05$) ou HFD e insulina ($p<0,05$) quando comparados com o grupo 1 (4T1).

Palavras-Chave: Neoplasia Mamária Experimental; Transtornos do Metabolismo de Glucose; Insulina; Dieta Hiperlipídica.

ABSTRACT

BACKGROUND: Once the majority of human breast cancers have shown overexpression of insulin receptors, glucose levels and insulin intake may possibly affect the breast cancer outcomes. However, the exact role high-fat diet, hyperglycemia and hyperinsulinemia in breast cancer outcome remains unclear. Thus, the aim of present study was to evaluate the role of high-fat diet, glycemia and insulin intake on murine breast adenocarcinoma tumor growth in vivo. **METHODS:** Adult female mice (*Rodentia muridae*, *Mus musculus*, Balb-C lineage) were submitted to subcutaneous implantation of murine breast adenocarcinoma cells, divided in four groups. Group 1 received only tumor implantation (4T1 cells), Group 2, tumor implantation and high-fat diet (4T1-HFD), Group 3, tumor implantation and insulin (4T1-INS) and Group 4 tumor implantation and high-fat diet (4T1-HFD-INS). Measurements and laboratory tests were taken at days 15 and 30 of experimentation. **RESULTS:** This paper presents macroscopic findings and laboratory tests. High fat diet is correlated to bigger tumor volume ($p=0.0492$), except if associated to insulin (0.0168), but not to higher glucose serum levels. Groups that received insulin showed smaller tumor growth amplitude, but there was no difference in glucose serum levels between any group at D30. Serum glucose levels were not correlated with higher tumoral volumes. Tumor invasion of upper left limb was incident in all groups (66.7% to 100%), with no difference between groups ($p=0.9471$). Pulmonary metastases were more frequent in groups that received insulin ($p<0.05$) or HFD plus insulin ($p<0.05$) when compared to group 1 (4T1).

Keywords: Experimental Breast neoplasm; Glucose Metabolism Disorders; Insulin; Diet, High-Fat.

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Grupos de Experimentação	23
---	----

LISTA DE TABELAS

TABLE 1 – Experimental Groups	41
TABLE 2 – Tumor volume means and tumor invasion of upper limb in experimental groups herein	41
TABLE 3 – Presence of pulmonar metastases by experimental group	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Balb-C	Camundongos albinos de linhagem <i>in bred</i>
4T1	Linhagem celular de tumor de mama murino, implantável, espontaneamente metastático
HFD	<i>High-Fat Diet</i> , dieta hiperlipídica
INS	Insulina
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
ER	Marcador hormonal positivo para estrogênio
PR	Marcador hormonal positivo para progesterona
TTN	Tumores triplamente negativos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
IGF-1	Fator de crescimento insulina- <i>like</i>
HDL	Lipoproteína de alta densidade
NOD	<i>Non obese diabetic</i> , camundongos diabéticos não-obesos
AE1/AE3	Anticorpo pan-citoqueratina
Citoqueratinas 5/6	Marcador de citoqueratinas de carcinoma mamário
Citoqueratina 34 β E12	Marcador de citoqueratinas de carcinoma mamário
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
GSH/GSSG redox	Taxa entre dosagens séricas de GSH/GSSG
CEUA-UEPG	Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Ponta Grossa
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
Gpower [®]	Programa para cálculo amostral
MS Excel [®] 2007	Software de tabulação de dados (Microsoft)
BioEstat 5.3 [®]	Software livre de análise estatística (IDSM)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVO	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	15
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
4	MÉTODO	22
4.1	LOCAL DO ESTUDO	22
4.2	AMOSTRAS ESTUDADAS	22
4.3	DESENHO DE ESTUDO	22
4.4	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	22
4.5	EXPERIMENTO	23
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
5	RESULTADOS	26
5.1	ARTIGO DE REVISÃO	26
5.2	ARTIGO ORIGINAL	32
6	DISCUSSÃO	42
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
	REFERÊNCIAS	45
	ANEXOS	50
	ANEXO A – Carta de aprovação Comissão de Ética do uso de Animal	50
	ANEXO B – Artigo publicado Revista International Journal of Development Research – IJDR – Open Access	52

1 INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus e câncer são causas comuns de morbidade e mortalidade em nível mundial¹⁻⁸.

Diabetes Mellitus é a doença metabólica crônica mais comum entre humanos⁹; apresenta alta prevalência e incidência especialmente em países industrializados^{3,5,8,10}, com o Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) atingindo 6.5% da população adulta¹⁰. Resulta em complicações agudas e crônicas de alta morbimortalidade^{5,8}, e está relacionada ao desenvolvimento de vários tipos de câncer¹⁰⁻¹².

Há evidência de que o DM2 é fator de risco para vários tipos de câncer¹⁰⁻¹³, incluindo cânceres de pâncreas, fígado, estômago, cólon, reto, próstata, rins, bexiga, endométrio e câncer de mama pós-menopausa¹¹⁻¹⁷.

A mama é o sítio de câncer mais prevalente em mulheres^{2,3,5,10}, e responsável por mais mortes entre elas, na maioria dos países estudados^{3-5,18}. O risco de uma mulher desenvolver câncer de mama ao longo da vida chega a 9,7%⁸ e esta é uma doença cuja incidência tem crescido tanto quanto 5% ao ano em países em desenvolvimento¹⁰.

O câncer de mama é uma doença heterogênea e multifatorial^{3,18}, que envolve fatores de risco genéticos, sociodemográficos, reprodutivos (exposição prolongada a estrógenos)^{1,10}, relacionados ao estilo e vida e à história pessoal de câncer^{1,10,18,19}. Há correlação entre o câncer de mama humano e obesidade^{1,3,8,19-21} e síndrome metabólica^{16,18,19,21-23}, mas estudos prospectivos que tentaram correlacionar câncer de mama e níveis pré-diagnóstico de hiperglicemia foram inconclusivos^{2,3,6,16,18,19,21-23}.

O entendimento dos fatores de risco para o câncer de mama necessita da distinção de suas apresentações clínicas mais comuns: os que possuem marcadores hormonais (ER, estrogênio, PR, progesterona) em sua superfície celular, correspondentes a 70% do total; e os tumores triplamente negativos (TTN), que configuram o restante^{20, 24}.

Esta proporção não é afetada se considerarmos somente mulheres diabéticas⁸, porém mulheres pré-menopausa com DM2 tendem a desenvolver tumores que não expressam receptores hormonais (triplo-negativos)²⁵, basais, associados com mau prognóstico¹², que não possuem terapia específica^{27,8,4,24,25}.

Estudo realizado em 18763 pacientes com diagnóstico recente de câncer de mama ¹⁰ os subdividiu em diabéticos e não-diabéticos. Não houve diferença estatística entre os subtipos de câncer entre os grupos ($p=0.43$) e na análise dos receptores hormonais entre os grupos ($p=0.7$). Pacientes diabéticas apresentaram-se em estágios clínicos mais avançados do câncer de mama (invasão local e/ou metástases) quando comparados a pacientes não-diabéticos ¹⁰.

Vários estudos observacionais ^{4,12,15,19,23,25}, caso-controle ^{10,11}, revisões ^{7,10,13,16,17} e metanálises ^{2,14,17,22,26} apontam que pacientes com DM2, pós-menopausa, apresentam:

- risco aumentado para o desenvolvimento da doença ^{2,10,14,15} ;
- tumores mais avançados ao diagnóstico ^{15,27};
- maior mortalidade/menor sobrevida ^{4,6-8,12,15,26};
- pior qualidade de vida pós-tratamento ^{6-8,27};
- piores desfechos clínicos ^{28,29}.

O estudo do microambiente tumoral se faz essencial para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da doença ³⁰, tendo em vista que muitas das alterações genéticas que levam ao desenvolvimento do câncer afetam diretamente a glicólise e a resposta celular à hipóxia ²². Estes achados corroboram a hipótese de que hiperglicemia e hiperinsulinemia (como consequência de resistência à insulina) tem um papel no desenvolvimento do câncer ²².

Hiperglicemia e hiperinsulinemia são fatores de risco tanto para o DM2 quanto para o câncer ^{4,5,15,19,22,23,31}. Estudos epidemiológicos demonstraram que hiperinsulinemia e hiperglicemia estão relacionados a maior risco de malignização epitelial, incluindo câncer de próstata, mama, rins e fígado ^{5,11,15,20,25}.

Ensaio clínicos têm demonstrado que o risco do câncer de mama é maior em mulheres que apresentam síndrome de resistência à insulina, obesidade, altos níveis de insulina endógena, diabetes e inatividade física ¹⁶⁻²².

Este projeto estuda o efeito de hiperinsulinemia e hiperglicemia sobre o crescimento de uma população de células de adenocarcinoma mamário murino *in vitro*, e *in vivo*, usando um modelo experimental Balb/C-4T1 estabelecido e validado ³²⁻³⁵, com hiperglicemia experimental induzida por dieta hiperproteica hipercalórica ³⁸, visando contribuir para melhor compreensão do tema.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel de glicose e insulina no crescimento tumoral de células de adenocarcinoma mamário em modelo *in vivo*.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Estudar a influência de glicose e insulina na propagação metastática de adenocarcinoma mamário murino para pulmão.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Diabetes mellitus e câncer são causas líderes de morbidade e mortalidade em nível mundial ¹⁻⁸.

Diabetes Mellitus é a doença metabólica crônica mais comum ⁹ e resulta em complicações agudas e crônicas de alta morbimortalidade ^{3,5,8,10}. Sua prevalência varia de 2 a 10% em países industrializados ⁸, e está crescendo ^{3,8,10} pelo envelhecimento da população e influência de fatores dietéticos, sedentarismo e obesidade ¹. A maioria dos pacientes diabéticos (90%) tem o tipo 2, caracterizado por redução na secreção e resistência à insulina, estabelecendo-se tarde na vida adulta ^{1,8}.

O Diabetes Mellitus é uma comorbidade comum entre pacientes com câncer de mama ⁶. Trata-se de uma síndrome, um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos que apresentam em comum a hiperglicemia, resultado de defeitos na ação da insulina, em sua secreção ou em ambas ³⁹.

Mulheres com câncer de mama apresentam taxas maiores de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) que mulheres saudáveis ^{12,15,19,40} - hipótese formulada por Freund já em 1885 (citado por Boyle et al.²). Lipscombe et al. ¹⁵, em um estudo de base populacional, encontraram um pequeno aumento no risco para diabetes entre mulheres com câncer de mama, muito variável no tempo, e dependente das pacientes terem sido submetidas a quimioterapia.

Há evidência de que o DM2 é fator de risco para vários tipos de câncer¹¹⁻¹³, incluindo de pâncreas, fígado, estômago, cólon, reto, próstata, rins, bexiga, endométrio e câncer de mama pós-menopausa ¹¹⁻¹⁷.

O câncer de mama é o segundo mais comum no mundo¹, o mais incidente e de maior mortalidade entre mulheres ^{2,3}, inclusive no Brasil¹. Sua incidência está aumentando globalmente, e é responsável por cerca de 1,4 milhões de casos novos por ano ². O custo global do câncer dobrou entre 1975 e 2000, e prevê-se que dobre de novo até 2030 ². Fatores como o aumento da expectativa de vida, a adoção de hábitos ocidentais e baixas taxas de fertilidade concorrem para transformar o câncer de mama em um problema mundial ².

Para o Brasil, são esperados 66.280 casos novos de câncer de mama para o triênio 2020-2022, com um risco estimado de 56,20 casos a cada 100 mil mulheres, correspondendo a 28,1% dos casos de câncer estimados em mulheres brasileiras em

2016 ⁴¹. O câncer de mama é representativo de uma etapa de transição epidemiológica em andamento no país, com o aumento da incidência de tipos de câncer usualmente associados a elevados índices socioeconômicos (mama, próstata, cólon e reto) ao mesmo tempo em que persistem taxas de incidência elevadas de neoplasias relacionadas à pobreza (colo de útero, pênis, estômago e cavidade oral ¹.

O câncer de mama é uma doença heterogênea e multifatorial ^{3,18}, com fatores de risco genéticos ¹⁶, sociodemográficos (afeta populações de países industrializados) ¹⁶⁻¹⁸, reprodutivos (exposição prolongada a estrógenos) ^{1,10} relacionados ao estilo e vida e à história pessoal de câncer ^{1,10,18}.

Têm sido estudadas as correlações com obesidade ^{1,3,7,8,10,20}, e síndrome metabólica ^{2,20,22}. Estudos prospectivos visando estabelecer uma correlação entre câncer de mama e níveis de glicose sérica pré-diagnóstico têm sido inconclusivos ^{2,3,6,20-22}.

Como visto na introdução, os fatores de risco para o câncer de mama variam de acordo com suas apresentações clínicas mais comuns: os que possuem marcadores hormonais em sua superfície celular; e os tumores triplamente negativos ⁸.

Mulheres pré-menopausa, porém, desenvolvem mais tumores triplo-negativos, basais, associados com mau prognóstico, que não possuem terapia específica, se forem diabéticas ^{8,24}.

A relação entre peso corporal e risco para câncer de mama tem sido bastante estudada ²⁰, porém não há uma explicação biológica clara do papel da hiperglicemia no risco de câncer de mama. Vários mecanismos concorrentes foram propostos, da geração de radicais livres à indução de dano em enzimas reparadoras de ADN ². Uma das dificuldades para a compreensão do papel da obesidade nesta equação é a ausência de aferição da adiposidade nos ensaios clínicos randomizados ². Disfunções metabólicas e inflamação parecem estar relacionadas a diferentes subtipos de câncer de mama, com características específicas (obesidade e/ou adiposidade abdominal localizada, presença ou não de características inflamatórias, presença de síndrome metabólica, apresentação do câncer em relação à menopausa) associadas a diferentes subtipos. Por exemplo, subtipos luminais agressivos são mais comuns em mulheres pré-menopausa com adiposidade abdominal acentuada ¹⁸.

A restrição calórica reduziu o crescimento de tumores e metástases, bem como o número destas em um experimento com o modelo 4T1 ⁴². Outros efeitos foram

a diminuição da proliferação e angiogênese, o aumento da apoptose e da adiponectina nos tumores, além da diminuição dos níveis de insulina, leptina, fator de crescimento insulina-like e do fator de crescimento ligado às proteínas ⁴².

A relação entre síndrome - caracterizada por fatores de risco cardiovasculares como obesidade, hipertensão, dislipidemia, hiperglicemia e estados pró-trombótico e pró-inflamatório – e o desenvolvimento de câncer de mama persiste por ser mais bem explicada ²². Estudos de coorte e metanálises têm demonstrado que a Síndrome Metabólica pode ou não estar ligada ao desenvolvimento de câncer, a existência de múltiplos fatores de risco levam a confusão na interpretação dos estudos clínicos ²⁵.

A hipótese de que pacientes com DM2 apresentam risco aumentado para o câncer tem sido sustentada por estudos observacionais ^{4,12,15,19,23,25}, caso-controle ^{10,11}, revisões ^{7,10,13,16,17} e metanálises ^{2,14,17,22,26}. Este risco, que pode chegar a 27% maior que o de pacientes não diabéticas, tem sido amplamente estudado ^{2,8,10,16}.

Um estudo chinês de base populacional utilizou um escore de risco genético para avaliar a suscetibilidade a DM2, correlacionando-a com os desfechos e a sobrevida livre de doença em pacientes com câncer de mama, encontrando associação positiva entre a suscetibilidade genética a DM2 e mortalidade entre mulheres com câncer de mama com receptores de estrogênio positivos ⁴. Um estudo caso-controle de base populacional, espanhol, não encontrou aumento do risco geral de câncer de mama para pacientes diabéticas, que apresentaram risco aumentado apenas para tumores triplo-negativos, ligados ao uso de insulina e/ou sulfoniureia³.

Outros artigos têm reportado que pacientes com DM2 e câncer de mama têm tumores mais avançados ao diagnóstico ^{27,46}. Diabetes mellitus e o uso/metabolismo de insulina estão associados a prognósticos mais pobres entre pacientes com câncer de mama⁴⁴, e níveis altos de insulina foram relacionados a piores desfechos ^{28,29}.

Pacientes com DM2 e câncer de mama apresentam maior mortalidade/menor sobrevida ^{4,7,8,12,15,26} e pior qualidade de vida pós-tratamento ^{6,8,26,27,39}.

O câncer é entendido, no modelo atual de oncogênese, como produto de mutações ou alterações genéticas celulares, resultado de uma variedade de fatores intrínsecos (hereditariedade, erros aleatórios na replicação de ADN) e extrínsecos (radiação, substâncias químicas, infecções virais) que irão interferir nos mecanismos de diferenciação, proliferação e morte celular ^{22,30}. O microambiente tumoral é onde ocorrem os processos fisiopatológicos de doença³⁰; como visto, muitas das alterações

genéticas que levam à carcinogênese afetam glicólise e a resposta celular à hipóxia²².

A associação entre DM2 e câncer de mama se deve, hipoteticamente, aos efeitos de hiperglicemia e hiperinsulinemia, que são fatores de risco tanto para o DM2 quanto para o câncer^{43,15,19,22,23}, porém há carência de estudos experimentais que investiguem os efeitos de hiperglicemia e hiperinsulinemia no crescimento tumoral *in vitro* e *in vivo*, na presença ou não de diabetes.

Estudos epidemiológicos demonstraram que hiperinsulinemia e hiperglicemia estão relacionados a maior risco de malignização epitelial, incluindo câncer de próstata, mama, rins e fígado^{3,15,20}.

Flores-López et al.³⁹ demonstraram que hiperglicemia e hiperinsulinemia podem promover crescimento tumoral e metastatização. Em seu estudo experimental, a hiperglicemia induziu proliferação, migração e invasão celular, e aumento da expressão de marcadores mesenquimais (vimentina e fibronectina) - efeitos aumentados pela administração simultânea de insulina³⁹. Em coorte com mais de dez mil mulheres com diabetes⁴⁵, contudo, não foi confirmado o aumento do risco de câncer de mama com o uso diário de insulina.

Hiperinsulinemia crônica devido à resistência à insulina parece ter papel fundamental²⁰, através do aumento da biodisponibilidade de fator de crescimento insulina-like (IGF-1) e do estímulo à produção de esteroides ovarianos²². A insulina está envolvida no estágio promocional da tumorigênese e progressão para um fenótipo, promove crescimento tumoral através da promoção da angiogênese⁴⁶ e alterações na conformação de HDL-colesterol⁴⁷ que facilitam a manutenção de um status de estresse oxidativo no meio tumoral.

Dosagens séricas de insulina em pacientes com câncer de mama, pré-tratamento, foram preditivas de mau prognóstico na análise de sobrevida livre de doença, podendo representar um biomarcador útil na estimativa de prognóstico em pacientes não diabéticos com a neoplasia²⁹.

Hiperglicemia está associada ao desenvolvimento de alguns tipos de câncer, notadamente o carcinoma hepatocelular em homens, câncer de pâncreas em ambos os sexos, e câncer colorretal, no qual o crescimento celular está diretamente ligado a hiperinsulinemia e aumento dos níveis de IGF-1²⁰.

Modelos experimentais de câncer de mama remontam há quase um século, e são muito utilizados, a despeito de representarem apenas uma fração da

complexidade do câncer de mama humano ³². O modelo ideal deveria representar a história natural e a histopatologia da neoplasia humana, permitindo a pesquisa de seus mecanismos celulares e moleculares ⁴⁸.

Camundongos Balb/C são utilizados principalmente em pesquisas de câncer e imunologia ^{32,49}. São conhecidos por apresentarem baixa incidência de tumores mamários, por desenvolverem múltiplas neoplasias na senilidade (reticulares, pulmonares e renais), por terem longa vida reprodutiva, serem resistentes à doença aterosclerótica induzida pela dieta, e por produzirem plasmacitomas, parte importante da produção de anticorpos monoclonais ⁴⁹⁻⁵¹. Os parâmetros de referência para algumas dosagens séricas em camundongos Balb-C foram descritos por Almeida et al ⁵⁰.

Células de adenocarcinoma mamário murino 4T1 têm sido utilizadas em inúmeros trabalhos *in vitro* para estudar o efeito de várias drogas ^{34,35,52}. Trata-se de uma linhagem celular altamente invasiva local, espontaneamente metastática para diversos órgãos (pulmões, fígado, osso e cérebro)⁵¹, que apresenta proliferação epitelial difusa, sólida, com abundância de células pleomórficas e elevado índice mitótico⁵¹. O número de mitoses, o índice apoptótico e o número de vasos estão diretamente relacionados com a evolução tumoral e podem ser acessados por análise histopatológica ⁵².

O modelo Balb/C-4T1 é um modelo estabelecido e validado para o estudo do câncer de mama, que apresenta boa analogia com o desenvolvimento do câncer mamário humano ^{33,34,42,46}. É um modelo isogênico, ortotópico (as células podem ser injetadas no próprio tecido mamário do animal), capaz de metastatizar do sítio de inoculação para múltiplos sítios distantes, em particular os pulmões ³³. Nas condições descritas, os tumores primários tornam-se visíveis em torno de sete dias após a inoculação, sendo a mortalidade prevista passados 31 dias da inoculação ^{33,34,42,46}.

Os modelos animais de diabetes têm sido amplamente utilizados nas pesquisas sobre a doença ³⁸, incluindo modelos de diabetes experimental induzido quimicamente (streptozotocina, aloxana) e espontâneo (camundongos NOD – *non obese diabetic*, diabetes induzido por dieta murina rica em gorduras HFD) ³⁶⁻³⁸.

O carcinoma mamário 4T1 caracteriza-se pela proliferação neoplásica de células pleomórficas com alto índice mitótico, em arranjo sólido. Garcia et. al. (2014) avaliaram a expressão imuno-histoquímica de vários marcadores proteicos como receptores hormonais, citoqueratina AE1/AE3, receptores de proliferação celular e

marcadores de vasos sanguíneos, positivos, e outros como vimentina, citoqueratina 5/6, citoqueratina 34 β E12 e receptores para fator de crescimento, todos negativos ⁵³.

Estudos recentes no campo da metabolômica, proteômica e lipidômica têm demonstrado que a fase inicial de metastatização das células 4T1 é associada com mudanças metabolômicas característica da ativação de arginase, e síntese de poliaminas, enquanto a fase tardia, além de apresentar alterações nas vias de arginina também segue em direção às vias glicolíticas e da pentose, remodelando lípidos estruturais e ativando sinalização lipídica relacionada ao processo de metastatização ⁵⁴.

Lu et. al ⁵⁵ (2010) investigaram alterações metabólicas em células 4T1, identificando 157 metabólitos de seis linhagens celulares, incluindo a 4T, de diferentes capacidades tumorigênicas e metastáticas. A avaliação de metabólitos intracelulares neste estudo ⁵⁵ deu luz à hipótese de que haja dois passos fundamentais durante a progressão destes tumores:

- aquisição de capacidades tumorigênicas, incluindo alterações na glicólise, na via de pentose-fosfato e na síntese de ácidos graxos, bem como redução no *pool* de GSH/GSSG *redox*⁵⁵;
- ganho de habilidades metastáticas, incluindo mais alterações na glicólise e no ciclo do ácido tricarboxílico, depleção de espécies de glutatona e aumento de nucleotídeos (evidenciados também no estudo de metabólitos extracelulares) ⁵⁵⁻⁵⁶.

O Diabetes Mellitus tem sido associado a maior risco de desenvolvimento de câncer de mama, a tumores mais avançados ao diagnóstico, a pior prognóstico da doença quando instalada, a maior mortalidade, menor sobrevida e pior qualidade de vida dura após o tratamento.

Há evidências experimentais recentes ^{3,4,15,19,22,23,54,55} de que o metabolismo de glicose e insulina tem um papel na fisiopatologia desses eventos. Esperamos contribuir, com nosso trabalho, para a compreensão dos efeitos da insulina e do diabetes mellitus no crescimento tumoral de adenocarcinoma murino *in vitro* e *in vivo*, como um modelo experimental análogo ao câncer humano.

4 MÉTODO

4.1 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado no Biotério Central e no Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Universidade Estadual de Ponta Grossa, após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UEPG), onde está registrado sob o Protocolo 3323/2018, através do Processo CEUA 013/2018 (Anexo 1). Todo o experimento foi realizado segundo as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), seguindo-se a Lei Nº 11.794⁵⁷, e visando estabelecer parâmetros excelentes e internacionais de *Animal Welfare*.

4.2 AMOSTRAS ESTUDADAS

Foram injetadas células da linhagem de adenocarcinoma mamário glandular ductal murino do tipo 4T1 em camundongos (*Rodentia muridae*, *Mus musculus*, linhagem *Balb-C*), posteriormente analisadas macro e microscopicamente.

4.3 DESENHO DE ESTUDO

Estudo experimental que estudará o efeito de dieta rica em gorduras, hiperinsulinemia e hiperglicemia sobre o crescimento de uma população de células de adenocarcinoma mamário murino *in vivo*, usando um modelo experimental de carcinogênese, isogênico, estabelecido e validado ^{32-35, 52-55}.

4.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Foram incluídos todos os animais que sobreviveram a 30 dias de experimento, sendo excluídos os animais que não sobreviveram.

4.5 EXPERIMENTO

Quarenta e quatro (n=44) camundongos (*Rodentia muridae*, *Mus musculus*, linhagem *Balb-C*) foram submetidos a injeção de células da linhagem de adenocarcinoma mamário glandular ductal murino do tipo 4T1 na região peripapilar mamária esquerda, na dose de 50 μ , na concentração descrita ($1 \times 10^5/50\mu$), conforme técnica sistematizada por Tai et al. (2014)³³, sendo posteriormente randomizados em quatro grupos (Quadro 1).

QUADRO 1 – Grupos de Experimentação

Grupos	n	4T1	Dieta habitual	Dieta rica em gorduras	Insulina oral
1	11	SIM	SIM	-	-
2	11	SIM	-	SIM	-
3	11	SIM	SIM	-	SIM
4	12	SIM	-	SIM	SIM

Fonte: O autor.

Todos os procedimentos seguiram as seguintes etapas:

- contenção do animal na mesa operatória.
- identificação do animal através de marcação caudal.
- injeção de 5×10^5 células da linhagem de adenocarcinoma de mama 4t1 na região peripapilar mamária esquerda. dosagem amostral de glicemia.
- retorno dos animais às gaiolas de plástico, forradas com maravalha, mantidos em temperatura constante (23°C), com ciclo claro/escuro de 12/12 horas e com fornecimento de água e ração *ad libitum*.
- randomização dos animais nos grupos anteriormente descritos, identificados individualmente e por grupo de experimentação.
- o volume tumoral foi aferido no 15º e 30º dias para todos os grupos.
- dosagens séricas de glicose foram realizadas no 15º e 30º dias. os valores laboratoriais foram avaliados segundo parâmetros de referência estimados por Almeida et al.⁵⁰.

- h) eutanásia dos animais no 30º dia pela técnica do deslocamento cervical.
- i) exérese em bloco do tumor para mensuração, pesagem e análise histológica (post-mortem).
- j) exérese do sistema respiratório, em bloco até traqueia (post-mortem).
injeção de solução de tinta da índia pela traqueia, permitindo a identificação e contagem de nódulos metastáticos pulmonares.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizamos o programa Gpower® (disponível em www.gpower.hhu.de/en.html) para uma experimentação com quatro grupos, quatro medidas, correspondência entre medidas de 0,05, com 95% de confiança, levando em conta a análise de variância com posterior teste e uma expectativa de $p > 0,05$, o número sugerido foi de nove animais por grupo, totalizando trinta e seis animais.

Os resultados obtidos foram tabulados em software MS Excel® 2007 e depois transportados para análise estatística no software BioEstat® 5.3 (IDSM).

A estatística descritiva dos dados foi expressa por médias, medianas, valores mínimos, valores máximos e desvios padrões, ou ainda por frequências e percentuais, quando apropriado.

A normalidade da amostra para a variável para as variáveis peso, glicemia e volume tumoral foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilks. Para comparação de variáveis quantitativas nos três momentos de avaliação, foram utilizados os teste ANOVA um fator com correção de Bonferroni ou Turkey.

Foi testada a correção entre dieta rica em gorduras e o volume tumoral através do teste de correlação de Pearson. A análise de variância do Volume Tumoral foi feita pelo método de Friedman. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparação dos volumes tumorais no dia 30 de experimentação para duas amostras independentes foram aplicado em grupos e variáveis de interesse específico.

Para testar a correlação entre glicemia (em dois momentos) e volume tumoral foi utilizado o teste de Spearman. Teste-T para duas amostras independentes foi utilizado para comparação entre dois grupos.

A variável invasão de membro superior, entre os grupos, foi avaliada pelo teste de Qui-quadrado. A variável metástases pulmonares foi avaliada pelo método de Friedman.

5 RESULTADOS

Os resultados foram apresentados em dois capítulos, sob a forma de dois manuscritos, um aceito e outro submetido para a publicação.

Renato van Wilpe Bach, Louise Bach Kmetiuk, Aryadyne Bueno Rocha Szesz. Diabetes mellitus e o câncer de mama: uma breve revisão. **International Journal of Development Research**, v. 10 (04): 35139-35141, 2020.

5.1 ARTIGO DE REVISÃO

DIABETES MELLITUS E O CÂNCER DE MAMA: UMA BREVE REVISÃO **DIABETES MELLITUS E CÂNCER DE MAMA**

ABSTRACT

Há evidências de que o Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) tem sido fator de risco para vários tipos de câncer, como o de mama no pós-menopausa. Nesse sentido, o objetivo desta breve revisão será fornecer o estado de arte dos fatores de risco e da ocorrência associada de DM2 e câncer de mama em mulheres no pós-menopausa. No geral, estudos observacionais, caso-controle, revisões e metanálises apontaram que pacientes com DM2 no pós-menopausa apresentaram risco aumentado para o desenvolvimento da doença, com tumores mais avançados ao diagnóstico, maior mortalidade/menor sobrevida, pior qualidade de vida no pós-tratamento e desfechos clínicos. Apesar dos estudos já realizados, algumas perguntas sobre o período de latência de exposição ao DM2 até o estabelecimento do risco aumentado para o câncer de mama, e até que ponto os efeitos percebidos derivam do DM2 ou são modulados pela medicação antidiabetes, incluindo a insulina, permanecem sem respostas. Dessa forma, além dos estudos epidemiológicos, futuros estudos *in vitro* e *in vivo* parecem ser necessários para melhor compreensão da ocorrência concomitante de DM2 e câncer de mama pós-menopausa.

Keywords: câncer de mama, Diabetes Mellitus tipo 2, fatores de risco.

O Diabetes mellitus e o câncer são causas comuns de morbidade e mortalidade a nível mundial (Bao et al., 2015). O Diabetes Mellitus tem sido a doença metabólica crônica mais comum entre os seres humanos (Goodarz et al., 2011), apresentando alta prevalência e incidência especialmente em populações de países industrializados (Campos Gómez et al. 2014; Bronsveld et al. 2017; García-Esquinas et al. 2016; Vargas-Hernández et al. 2013). O Diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) atingindo cerca de 6.5% da população adulta (Campos-Gómez et al., 2014), e tem sido associado a complicações agudas e crônicas de alta morbimortalidade (Bronsveld et al. 2017; García-Esquinas et al. 2016), como também ao desenvolvimento de vários tipos de câncer (Campos Gómez et al. 2014; Seshasai et al., 2011; Xiangdong et al. 2012). Há evidências de que o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) tem sido fator de risco para vários tipos de câncer (Campos-Gómez et al., 2014; Renehan et al., 2010; Xiangdong et al., 2012), como de pâncreas, fígado, estômago, cólon, reto, próstata, rins, bexiga, endométrio, além do câncer de mama pós-menopausa (Larsson et al., 2007; Lipscombe et al. 2013; Noto et al., 2011; Renehan et al., 2010; Seshasai et al., 2011; Xiangdong et al., 2012; Xue et al., 2007). Nesse sentido, o objetivo desta breve revisão será fornecer o estado de arte da ocorrência associada DM2 e câncer de mama pós menopausa.

Estudos prévios mostram que a mama é o sítio de câncer mais prevalente entre as mulheres (Boyle et al., 2012; Campos Gómez et al., 2014; García-Esquinas et al., 2016; Vargas-Hernández et al., 2013), e responsável por maiores taxas de mortalidade entre elas, na maioria dos países estudados (Agresti et al., 2016; Bao et al., 2015; García-Esquinas et al., 2016; Vargas-Hernández et al., 2013). O risco de uma mulher desenvolver câncer de mama ao longo da vida chega a 9,7% (Bronsveld et al., 2017), com incremento no número de casos que chega à 5% ao ano em países em desenvolvimento (Campos Gómez et al., 2010).

O câncer de mama é uma doença heterogênea e multifatorial (Agresti et al., 2016; Vargas-Hernández et al., 2013), que envolve componentes genéticos, sociodemográficos, reprodutivos (exposição prolongada a estrógenos) (García-Esquinas et al., 2016; Guerra et al., 2005;), relacionados ao estilo de vida e à história pessoal de câncer (Agresti et al., 2016; Bordeleau et al., 2011; Campos Gómez et al., 2014; Guerra et al., 2005;). Apesar da correlação entre câncer de mama humano e obesidade (Bronsveld et al., 2017; Bordeleau et al., 2011; Guerra et al., 2005; Pisani et al., 2008; Vargas-Hernández et al., 2013; Uzunlulu et al., 2016), bem como a

síndrome metabólica (Agresti et al., 2016; Bayraktar et al., 2012; Bordeleau et al., 2011; Sieri et al., 2011; Pisani et al., 2008; Xue et al., 2007) ter sido demonstrada previamente, diferentes estudos prospectivos que tentaram correlacionar câncer de mama e níveis pré-diagnóstico de hiperglicemia foram inconclusivos (Agresti et al., 2016; Bayraktar et al., 2012; Bordeleau et al., 2011; Boyle et al., 2012; Jarvandi et al., 2016; Pisani et al., 2008; Vargas-Hernández et al., 2013; Sieri et al., 2011; Xue et al., 2007).

O entendimento dos fatores de risco para o câncer de mama necessita da distinção de suas apresentações clínicas mais comuns: os que possuem marcadores hormonais (ER, estrogênio, PR, progesterona) em sua superfície celular, correspondentes a 70% do total; e os tumores triplamente negativos (TTN), que configuram o restante (Foygel et al., 2015; Uzunlulu et al., 2016).

Esta proporção não é afetada se considerarmos somente mulheres diabéticas (Bronsveld et al., 2017), porém mulheres pré-menopausa com DM2 tendem a desenvolver tumores que não expressam receptores hormonais (triplo-negativos) (Grimaldi-Bensouda et al., 2014), basais, associados com mau prognóstico (Xiangdong et al., 2012), que não possuem terapia específica (Bao et al., 2015; Bronsveld et al., 2017; Foygel et al., 2015; Grimaldi-Bensouda et al., 2014; Tang et al., 2016).

Estudo realizado em 18.763 pacientes com diagnóstico recente de câncer de mama foram subdivididos em diabéticos e não-diabéticos (Campos Gómez et al., 2014). Nesse estudo, não houve diferença estatística entre os subtipos de câncer entre os grupos ($p=0.43$) e na análise dos receptores hormonais entre os grupos ($p=0.7$). Ainda, pacientes diabéticas apresentaram-se em estágios clínicos mais avançados do câncer de mama (invasão local e/ou metástases) quando comparados a pacientes não-diabéticos (Campos-Gómez et al., 2014).

Além disso, estudos observacionais (Bao et al., 2015; Bayraktar et al., 2012; Bordeleau et al., 2011; Lipscombe et al., 2013; Xiangdong et al., 2012), caso-controle (Campos Gómez et al., 2014; Seshasai et al. 2011), revisões bibliográficas (Bronsveld et al., 2015; Campos Gómez et al., 2014; Noto et al., 2011; Renehan et al., 2010; Xue et al., 2007) e metanálises (Boyle et al., 2012; Larsson et al., 2007; Noto et al., 2011; Pearls et al., 2011; Sieri et al., 2011) apontam que pacientes com DM2, pós-menopausa, apresentaram: risco aumentado para o desenvolvimento da doença (Boyle et al., Campos-Gómez et al., 2014; Larsson et al., 2007; Lipscombe et al., 2013)

tumores mais avançados ao diagnóstico (Lipscombe et al., 2015; Tang et al., 2016), maior mortalidade/menor sobrevida (Bao et al., 2015; Bronsveld et al., 2015; Bronsveld et al., 2017; Jarvandi et al., 2016; Lipscombe et al., 2013; Pearls et al., 2011; Xiangdong et al., 2012) pior qualidade de vida pós-tratamento (Bronsveld et al., 2015; Bronsveld et al., 2017; Jarvandi et al., 2016; Tang et al., 2016) e piores desfechos clínicos (Alagacioclu et al., 2016; Ferroni et al., 2016).

Nesse contexto, o estudo do microambiente tumoral se faz essencial para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da doença (Onuchi et al., 2010), tendo em vista que muitas das alterações genéticas que levam ao desenvolvimento do câncer afetam diretamente a glicólise e a resposta celular à hipóxia (Sieri et al., 2011). Estes achados corroboram a hipótese de que hiperglicemia e hiperinsulinemia (como consequência de resistência à insulina) tem um papel no desenvolvimento do câncer (Sieri et al., 2011). Hiperglicemia e hiperinsulinemia tem se mostrado fatores de risco tanto para o DM2 quanto para o câncer (Bao et al., 2015; Bayraktar et al., 2012; Bordeleau et al., 2011; García-Esquinas et al., 2016; Karlstadt et al., 2013; Lipscombe et al., 2013; Sieri et al., 2008). E estudos epidemiológicos sugeriram que hiperinsulinemia e hiperglicemia estão relacionados a maior risco de malignização epitelial, incluindo câncer de próstata, mama, rins e fígado (García-Esquinas et al., 2016; Grimaldi-Bensouda et al., 2014; Lipscombe et al., 2013; Seshasai et al., 2011; Uzunlulu et al., 2016).

Em ensaios clínicos, o risco da ocorrência de câncer de mama foi maior em mulheres que apresentaram síndrome de resistência à insulina, obesidade, altos níveis de insulina endógena, diabetes e inatividade física (Agresti et al., 2016; Bordeleau et al., 2011; Noto et al., 2011; Pisani et al., 2008; Sieri et al., 2011; Uzunlulu et al., 2016; Xue et al., 2007). Dessa forma, baseado na presente revisão, a associação entre DM2 e câncer de mama na pós-menopausa pode ocorrer devido a existência de fatores de risco comuns a ambas as doenças (obesidade, sedentarismo, dieta) ou por efeito direto da resistência à insulina e, por consequência, da hiperinsulinemia e hiperglicemia resultantes. Apesar dos estudos já realizados, algumas perguntas associadas ao período de latência de exposição ao DM2 até o estabelecimento do risco aumentado para câncer de mama e até que ponto os efeitos percebidos derivam do DM2 ou são modulados pela medicação antidiabetes, incluindo a insulina, permanecem sem resposta. Dessa forma, além dos estudos

epidemiológicos, futuros estudos *in vitro* como *in vivo* são necessários para melhor compreensão da associação entre DM2 e câncer de mama pós-menopausa.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

REFERENCES

Agresti R., Meneghini E., Baili P., Minicozzi P., Turco A., Cavallo I., et al. (2016) Association of adipositu, dysmetabolisms, and inflammation with aggressive breast câncer subtypes: a cross-sectional study. *Breast Cancer Res Trea.*157(1), pp. 179-89.

Alagacioclu A., Kebapcilar L., Gokgoz Z., Oztekin O., Bozkaya G., Tarhan O. et al. (2016) Leptin, insulin and body composition changes during adjuvante taxane based chemotherapy in patients with breast câncer, preliminar study. *Indian J Cancer.* 53(1), pp. 39-42.

Bayraktar S., Hernandez-Aya L., Lei X., Meric-Bernstam F., Litton J.K., Hsu L. et al. (2012) Effect Of Metformin On Survival Outcomes In Diabetic Patients With Triple Receptor-Negative Breast Cancer. *Cancer.* pp. 1202-1211.

Bao PP, Zhao ZG, Gao YT, Zheng Y, Zhang B, Cai H et al. (2015) Association of Type 2 Diabetes Genetic Variants with Breast Cancer Survival among Chinese Women. *PLoS ONE.* 10(2);e0117419.doi:10.1371/journal.pone.0117419.

Bordeleau L., Lipscombe L., Lubinski L., Ghadirian P., Foulkes W.D., Neuhausen S. et al. (2011) Diabetes and Breast Cancer Among Women With BRCA1 and BRCA2 Mutations. *Cancer.* pp. 1812-1818.

Boyle P., Boniol M., Koechlin A., Robertson C., Valentini F., Coppens K., Fairley L-L. et al. (2012) Diabetes and breast cancer risk: a meta-analysis. *British Journal of Cancer.* 107(9), pp. 1608-1617.

Bronsveld H.K., Jensen V., Vahl P., De Bruin M.L., Cornelissen S., Sanders J. et al. (2017) Diabetes and Breast Cancer Subtypes. *PLoS ONE.* 12 (1), e0170084.doi:10.1371/journal.

Bronsveld H.K., Braak B.T., Karlstad Ø., Vestergaard P., Starup-Linde J., Bazelier M.T. et al. (2015) Treatment with insulin (analogues) and breast cancer risk in diabetics; a systematic review and meta-analysis of in vitro, animal and human evidence. *Breast Cancer Research* 2015; 17, pp. 100-121.

Campos-Gómez S., Valero V., Flores-Arredondo J.H., Issassi-Chapa A., Rangel-Rodríguez I., Hortobagyi G.N. et al. (2014) Breast Cancer Subtype and baseline characteristics from Diabetic Breast câncer patients are Not Different from Nondiabetics. *The Breast J.* 20(4), pp. 434-436.

Ferroni P., Riondino S., Laudisi A., Portarena I., Formica V., Alessandroni J. et al. (2016) Pretreatment Insuline Levels as a Prognostic Factor for Breast Cancer Progression. *Oncologist*. 2016 Jul. 7; Piii: theoncologist.2015- 0462 [Epub ahead of print]

Foygel K., Sekar T.V., Paulmurugan R. (2015) Monitoring the Antioxidant Mediated Chemosensitization and ARE-Signaling in Triple Negative Breast Cancer Therapy. *PLoS One*. 10 (11), e0141913.doi:101371/journal.pone.0141913

García-Esquinas E., Guinó E., Castaño-Vinyals G., Pérez-Gómez B., Llorca J., Altzibar J.M. et al. (2016) Association of diabetes and diabetes treatment with incidence of breast câncer. *Acta Diabetol*. 53, pp. 99-107.

Grimaldi-Bensouda L, Cameron D, Marty M, Barnett AH, Penault-Llorca F, Pollack M et al. Risk of Breast Cancer by Individual Insulin Use: An International Multicenter Study. *Diabetes Care* 2014; (37)134-143.

Goodarz D., Finucane M.M., Lu Y., Singh G.M., Cowan M.J., Paciorek C.J. et al. (2011) National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2·7 million participants. *Lancet*. 378(9785), pp. 31-40.

Guerra M.R., Gallo C.V.M., Azevedo A., Mendonça S. (2005) Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2005; 51(3), pp. 227-234.

Jarvandi S., Pérez M., Schootman M., Jeffe D.B. (2016) Pre-Existing Diabetes in Early Stage Breast Cancer Patients is Associated with Lack of Improvement in Quality of Life 2 Years After Diagnosis. *Int J Behav Med*. Jul. 8.

Karlstadt O., Starup-Lindle J., Vestergaard P., Hjellvik V., Bazelier M.T., Schmitt M.K. et al. (2013) Use of insulin and insulin analogs and risks of cancer – systematic review and meta-analysis of observational studies. *Curr Drug Saf*. 8, pp. 333-348.

Larsson S.C., Mantzoros C.S., Wolk A. (2007) Diabetes mellitus and risk of breast cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer*. 121, pp. 856-862.

Lipscombe L.L., Chan W.W., Yun L., Austin P.C., Anderson G.M., Rochon P.A. (2013) Incidence of diabetes among postmenopausal breast cancer survivor. *Diabetologia*. 56, pp. 476-483.

Noto H. Tsujimoto T., Sasazuki T., Noda M. (2011) Significantly increased risk of câncer in patients with diabetes mellitus: a systematic review and metaanalysis. *Endocr Pract*. 17, pp. 616-628.

Onuchi AC, Chammas R. Câncer e o microambiente tumoral. *Rev Med (São Paulo)* 2010; 89(1)21-31.

Pearls K.S., Barone B.B., Snyder C.F., Yeh H.C., Stein K.B., Derr R.L. et al. (2011) Diabetes mellitus and breast cancer outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol.* pp. 29:54-60.

Pisani P. (2008) Hyper-insulinaemia and cancer, meta-analysis of epidemiological studies. *Arch Physiol Biochem.* 114, pp. 63-70.

Renehan A., Smith U., Kirkman M.S. (2010) Linking diabetes and cancer: a consensus on complexity. *Lancet.* 375(9733), pp. 2201-2202.

Seshasai S.R., Kaptoge S., Thompson A., Di Angelantonio E., Gao P., Sarwar N. et al. (2011) Diabetes mellitus, fasting glucose and risk of cause-specific death. *N Engl J Med.* 364, pp. 829-841.

Sieri S., Muti P., Claudia A., Berrino F., Pala V., Grioni S. et al. (2011) Prospective study on the role of glucose metabolism in breast cancer occurrence. *Int J Canc.* pp. 921-929.

Tang Z., Wang J., Zhang H., Sun L., Tang F., Deng Q. et al. (2016) Associations between Diabetes and Quality of Life among Breast Cancer Survivors. *PLoS ONE.* 11(6) e0157791, doi:10.1371/journal.pone.0157791

Uzunlulu M., Telci-Oaklili O., Oguz A. (2016) Association between Metabolic Syndrome and Cancer. *Ann Nutr Metab.* 68(3), pp. 173-9.

Vargas-Hernández V.M., Vargas-Aguilar V.M., Moreno-Eutimio M.A., Acosta-Altamirano G., Tovar-Rodriguez J.M. (2013) Metabolic syndrome and breast cancer. *Gland Surgery.* 2(2), pp. 80-90. 10(2); e0117419. doi:10.1371/journal.pone.0117419.

Xiangdong L., Jiangiang J.I., Sundquist K., Sunquist J. (2012) The Impact of Type 2 Diabetes Mellitus on Cancer-Specific Survival. A Follow-Up Study in Sweden. *Cancer.* pp. 1353-1361.

Xue F., Michaels K.B. (2007) Diabetes, metabolic syndrome and breast cancer: A review of the current evidence. *American J of Clin Nutr.* pp. 86:823S-835S.

5.2 ARTIGO ORIGINAL

Title: Role of high-fat diet, glucose and insulin in tumor growth on murine mammalian adenocarcinoma 4t1/Balb-C's model

Running title: Insulin effects in murine mammalian adenocarcinoma

Renato van Wilpe Bach¹; Louise Bach Kmetiuk²; Aryadyne Bueno Rocha Szesz¹; João Henrique Maffisoni Roceto¹; Patricia Manuitt²; Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro²; Leandro Cavalcante Lipinski ¹; Giovani Marino Fávero^{3*}

1Departament of Medicine, State University of Ponta Grossa, PR, 84030-900, Brazil.
 renatovwbach@gmail.com; aryadyneszezn@gmail.com; joao.roceto@live.com;
 leandrolipinski@uepg.br

2Graduate College of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Paraná (UFPR), PR, 81531-970. louisebachk@gmail.com

3Departament of General Biology, State University of Ponta Grossa, PR, 84030-900, Brasil. gmfavero@uepg.br

*Corresponding author: Giovani Marino Fávero, PhD. Departamento de Biologia Geral. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Avenida Carlos Cavalcante Uvaranas 4748, Ponta Grossa, PR, 84030-900, Brasil. Phone: (+55) 42 3220-3145. Email adress: gmfavero@uepg.br

ABSTRACT

Background: Once most human breast cancers have shown overexpression of insulin receptors, glucose levels and insulin intake may possibly affect breast cancer outcomes. However, the role of hyperglycemia and hyperinsulinemia in breast cancer outcome remains unclear. Thus, the aim of present study was to evaluate the role of high-fat diet, glycemia and insulin intake on murine breast adenocarcinoma tumor growth in vivo.

Method: Adult female mice (Rodentia muridae, *Mus musculus*, Balb-C lineage) were submitted to subcutaneous implantation of murine breast adenocarcinoma cells, divided in four groups. Group 1 received only tumor implantation (4T1 cells), Group 2 tumor implantation and high-fat diet (4T1-HFD), Group 3, tumor implantation and insulin (4T1-INS) and Group 4 tumor implantation and high-fat diet (4T1-HFD-INS). Measurements and laboratory tests were taken at days 15 and 30 of experimentation.

Results: The present study has shown that HFD and insulin may affect tumor growth and the number of metastases. No correlation between serum glucose levels and tumor volume was observed. Higher tumor growth was related to HFD and lower, to insulin intake, despite the diet offered. There was no difference of tumor volume means

between the groups. Metastases were more prevalent in groups that received oral insulin intake with or without HFD.

Conclusions: For the first time, oral insulin intake has been associated to lower range of tumoral growth in experimental groups. Further studies to fully establish the role of oral insulin in murine mammalian adenocarcinoma 4T1/BALB-C should include 4T1 in vitro studies and/or metabolomics 4T1 analysis.

Keywords: Diet, High-Fat; Experimental Breast Neoplasm; Glucose Metabolism Disorders; Insulin

BACKGROUND

Diabetes mellitus (DM) and cancer have been common causes of morbidity and mortality worldwide (Bao et al., 2015). Diabetes mellitus has been the most incident and prevalent metabolic disease in human beings (Goodarz et al., 2011). The type 2 DM has been associated to a variety of neoplasms (Campos-Gómez et al., 2014; Renehan et al., 2010; Xiangdong et al., 2012), such as pancreas, liver, stomach, large intestine, rectum, prostate, kidneys, bladder, endometrium and post-menopausal breast cancer. (Larsson et al., 2007; Lipscombe et al. 2013; Noto et al., 2011, Renehan et al., 2010; Seshasai et al., 2011; Xiangdong et al., 2012; Xue et al., 2007).

Breast cancer is a heterogeneous and multifactorial disease (Agresti et al., 2016; Vargas-Hernández et al., 2013). Although clinical assays have shown the increased risk of breast cancer in women that presented high plasmatic insulin levels, DM and sedentary lifestyle, the tumor microenvironment and pathophysiological mechanisms in breast cancer and hyperglycemia association remains unclear (Agresti et al., 2016; Bayraktar et al., 2012; Bordeleau et al., 2011; Boyle et al., 2012; Jarvandi et al., 2016; Pisani et al., 2008; Vargas-Hernández et al., 2013; Sieri et al., 2011; Xue et al., 2007), as genetic pathways to cancer directly affect glycolysis pathway and cellular responses to hypoxia (Sieri et al., 2011).

Once most of human breast cancers have shown overexpression of insulin receptors, insulin may possibly affect the breast cancer outcomes (Goodwin et al., 2011). However, the exact role of hyperglycemia and hyperinsulinemia in breast cancer outcomes remains unclear. Thus, the aim of the present study was to evaluate

the role of high-fat diet, glycaemia and insulinemia on murine breast adenocarcinoma tumor growth in vivo.

METHOD

In vivo experiments were conducted in adult female BALB/c mice (*Rodentia muridae*, *Mus musculus*), housed at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ under a 12: 12 hours light: dark cycle. This study has been approved by the Ethics Committee of Animal Use (protocol number 3323/2018).

The 4T1 mammary carcinoma transplantable tumor cell line has been regularly cultured in RPMI 1640 medium, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotic/antimycotic solution (100 IU/mL penicillin and streptomycin) at 37°C in a humidified atmosphere at 5% CO_2 . Cell viability and quantification were also obtained by the method of Trypan Blue exclusion (Invitrogen, Carlsbad, CA), by direct counting in a hemocytometer.

The animals were randomly distributed in four groups and submitted to subcutaneous implantation of murine breast adenocarcinoma cells with 1×10^5 cells / $50\mu\text{L}$ injected on left peripapillary mammalian region, according Tai et al. 2014, as follow: Group 1 received only tumor implantation (4T1), Group 2 tumor implantation and high-fat diet (4T1-HFD), Group 3 tumor implantation and insulin (4T1-INS) and Group 4 tumor implantation and HFD and INS (4T1-HFD-INS). Pulmonary metastases were counted according Son et al. 2014.

Statistical analysis was performed based on the possible association between characteristics of murine breast adenocarcinoma as tumor growth, volume, and presence of metastases, in comparison to variables like weight and serum glucoses level. Statistical tests were performed using BioStat 5.3®. Observed differences were considered significant when the resulting p-value was less than 0.05.

RESULTS

Murine breast adenocarcinoma tumors were successfully induced in 42/44 (95.5%) animals. A total of 36/44 (88.1%) animals survived at the procedures and were analyzed after observational period (Table 1). All tumor measures were evaluated at days 0, 15 and 30 of experimentation (expressed as D0, D15 and D30).

The general mortality rate was 18.8%. Deaths have occurred (after D15). Three deaths were observed by the researchers and presented as respiratory failure. Mobility impairment caused by progressive tumor invasion of upper left limb was observed in 30/36 (83.3%) specimens. Two mice did not develop any palpable or visible tumor, but as survivors to observational period were analyzed as well. One of them presented with countless metastases.

Sample normality for weight variable was analyzed by Shapiro Wilk test and resulted as not normal for all groups. Weight averages between three measurements for the four groups were analyzed by one-tailed ANOVA test with Bonferroni correction. Statistical analysis have shown that weight increase occurred between days 15 and 30 for Group 1 ($p < 0.05$), days 1 and 15 for Group 2 ($p < 0.05$), days 15 and 30 for Group 3 ($p < 0.05$) and between days 1 and 30 for Group 4 ($p < 0.05$). No final weight difference was observed between the groups at one-tailed ANOVA test ($p = 0.8266$).

Sample normality for variable serum glucoses level was evaluated by Shapiro Wilk's test. Serum glucose means between three measurements for the four groups were analyzed by one-tailed ANOVA test with Bonferroni's correction. Group 1 (4T1) has presented increase of serum glucose levels at all measurements ($p < 0.05$). Group 2 (HFD) has shown increase of glucose serum level between days 1 and 15 ($p < 0.05$), as well as Group 3 (INS 4T1), that also presented that pattern between days 1 and 30 ($p < 0.05$), but not between days 15 and 30.

Glucose serum levels at D15 between groups were compared between groups by one-tailed ANOVA test with Turkey's correction. Glucose serum levels were higher in Group 1 (4T1) when compared to Group 2 (4T1-HFD), $p = 0.0504$, in Group 3 (4T1-INS) when compared to Group 1 (4T1), $p = 0.0304$, in Group 4 when compared to Group 1 (4T1) ($p = 0.0516$), but not when compared to Group 2 (4T1-HFD), $p = 0.0660$. Comparison between Groups 3 and 4 resulted non- significant, $p = 0.9835$. Glucose serum levels at D30 between groups were compared by one-tailed ANOVA test with Turkey's correction. Glucose serum levels were higher in Group 1 (4T1) when compared to Group 2 (4T1-HFD), $p < 0.05$, in Group 3 (4T1-INS) when compared to Group 1 (4T1), $p = 0.0516$, in Group 4 when compared to Group 1 (4T1) ($p = 0.0614$), but not when compared to Group 2 (4T1-HFD), $p = 0.8108$. Comparison between Groups 3 and 4 resulted non- significant $p = 0.8280$. Glucose serum levels at D15 and D30 on each group were compared by two-tailed ANOVA test with Turkey's correction

and resulted non-significant at all groups ($p=0.8759$, $p=0.5471$, $p=0.1210$, $p=0.5397$ respectively).

Only two specimens showed palpable tumors at D15. Sample normality for variable tumoral volume at D30 was not confirmed by Shapiro Wilk's test ($p=0.0325$). Friedman's analysis of variance did not show any statistic difference between tumoral volume means regarding to groups. Tumoral volume at D30 between groups were analyzed by Mann-Whitney's test and found no differences between the groups (Table 2).

Analysis of glucose serum levels at D15 and D30 versus tumoral volume were made by Spearman test and resulted non-significant for all groups at both experiment days. HFD was correlated to higher tumoral volume increasing according to Pearson's correlation test ($p=0.0492$). Test-t for two independent samples (Groups 3, INS-4T1, and Group 4, HFD INS 4T1) shows that insulin and high-fat diet resulted in less tumor growth ($p=0.0168$).

Tumor invasion of upper limb was detected when there was involvement of homologous upper limb. Data related to tumor invasion of upper limb is shown on Table 2. Chi-square's test of independence revealed no difference between the groups for tumor invasion of upper limb ($p=0.9471$). Pulmonary metastases were counted through post-mortem endotracheal injection of India ink as previously described by Son et al., 2014 (Table 3). Friedman test shows that pulmonary metastases were more frequent in Group 3 (4T1-INS, $p<0.05$) and in Group 4 (4T1-HFD-INS, $p<0.05$) when compared to Group 1 (4T1).

DISCUSSION

The present study has shown that HFD and insulin may affect tumor growth and the number of metastases. Higher glucose serum levels were observed in groups that received insulin and HFD plus insulin, at both D15 and D30, suggesting that hyperglycemia may be induced by tumor and/or oral insulin may be not effective to prevent hyperglycemia.

Glucose serum levels rose for all groups along the observational period, and that elevation was early in animals that received HFD and insulin. Glucose serum levels increased just after tumor implantation, even before tumors were palpable, in all groups. However, glucose serum levels were higher in mice that received HFD plus

insulin when compared to Group 1, HFD alone provided lower levels of glucose at D15 and D30 when compared to the same group. The group that received tumor implantation and oral insulin alone also presented with higher levels of glucose when compared with Group 1. In addition, no correlation has observed between glucose serum levels at D15/D30 and final tumor volume for any of the experimental groups.

For the first time, the present study reports lower range of tumoral growth in experimental groups that receive oral insulin intake (Groups 3 and 4), despite of the diet ($p=0.0168$). Whereas both 4T1-INS and 4T1-HFD-INS groups presented lower tumor growth ($p=0.0168$), high tumoral volumes were related to HFD ($p=0.0492$), although there was no difference of final tumoral volume means. HFD was correlated with higher increase of tumoral volume ($p=0.0492$), when compared to the group that received only tumor implantation (Group 1), even if there was no difference in final tumor volume between the groups. These findings corroborates to previous experimental study that use pubertal mice, that associated HFD with elevated mammary gland expression of inflammatory and growth factor genes after 3 and 4 diet weeks and can be related to breast cancer development in older age (Zhao et al., 2013). Despite that, differently of pubertal mice, where tumor weight and number of metastases have been significantly increased by HFD, lower upper limb invasion (66.7% versus 100%) has been reported in HFD group herein, when compared to the group that received only tumor implantation. The presence of metastases was more often in groups that received insulin alone or HFD plus insulin (both $p < 0.05$).

In the present study, weight increase has occurred earlier for Group 2 (HFD-4T1, ($p < 0.05$), and between 15 and 30 days for all other groups, that suggests rapidly effects of hypercaloric diet. Oral insulin intake herein may have limited the weight increase until the day 15, but not the final weight at the day 30. Although insulin secretagogues have been associated to decreasing of cancer malignancy risk in Type 2 Diabetes women (Sun et al., 2013), no study to date has been focused in oral insulin intake and breast cancer. In this context, further studies are needed to fully establish the role of oral insulin in breast cancer development and growth.

Time for the tumor manifestation was higher than previously reported (Souza et al., 2013). Only two animals developed palpable tumors at Day 15 of experiment. Tumor growth rates observed after Day 15 were high and included local invasive and remote spread of disease. In the present study, deaths have been associated to disease invasion on respiratory system, and, together with the inherent suffering due

to the growth of such invasive tumors, suggesting that the observation period should be not exceed 30 days.

In summary, the present study has shown a wider range of tumor growth in experimental groups that received HFD. No correlation between serum glucose levels and tumor volume was observed. Higher tumor growth was related to HFD and lower, to insulin intake, despite the diet offered. There was no difference of tumor volume means between the groups. Metastases were more prevalent in groups that received oral insulin intake with or without HFD. Thus, further studies to fully establish the role of oral insulin in murine mammalian adenocarcinoma 4T1/BALB-C should include 4T1 in vitro studies and/or metabolomics 4T1 analysis.

REFERENCES

- Agresti R, Meneghini E, Baili P, et al. Association of adipositu, dysmetabolisms, and inflammation with aggressive breast câncer subtypes: a cross-sectional study. *Breast Cancer Res Trea*, 2016, 157(1):179-89.
- Bao PP, Zhao ZG, Gao YT, et al. Association of Type 2 Diabetes Genetic Variants with Breast Cancer Survival among Chinese Women. *PLoS ONE*, 2015, 10(2):e0117419.doi:101371/ jornal.pone.0117419.
- Bayraktar S, Hernandez-Aya L, Lei X, et al. Effect of Metformin On Survival Outcomes In Diabetic Patients With Triple Receptor-Negative Breast Cancer. *Cancer*, 2012, 118(5):1202-11. doi: 10.1002/cncr.26439.
- Bordeleau L, Lipscombe L, Lubinski L, et al. Diabetes and Breast Cancer Among Women With BRCA1 and BRCA2 Mutations. *Cancer*, 2011, 1;117(9):1812-8. doi: 10.1002/cncr.25595.
- Boyle P, Boniol M, Koechlin A, et al. Diabetes and breast cancer risk: a meta-analysis. *Br J Cancer*, 2012, 107(9):1608-1617.
- Campos-Gómez S, Valero V, Flores-Arredondo JH, et al. Breast Cancer Subtype and baseline characteristics from Diabetic Breast cancer patients are Not Different from Nondiabetics. *The Breast J*, 2014, 20(4):434-436.
- Goodarz D, Finucane MM, Lu Y, et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2·7 million participants. *Lancet*, 2011, 378(9785):31-40.
- Goodwin PJ. Insulin resistance in breast cancer: relevance and clinical implications. *Breast Cancer Res*, 2011, 13(Suppl 2):O7.

Jarvandi S, Pérez M, Schootman M, et al. Pre-Existing Diabetes in Early Stage Breast Cancer Patients is Associated with Lack of Improvement in Quality of Life 2 Years After Diagnosis. *Int J Behav Med*, Dec; 23(6):722-729. doi: 10.1007/s12529-016-9577-4

Larsson SC, Mantzoros CS, Wolk A. Diabetes mellitus and risk of breast cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer*, 2007, 121:856-862.

Lipscombe LL, Chan WW, Yun L, et al. 2013. Incidence of diabetes among postmenopausal breast cancer survivors. *Diabetologia*, 2013, 56(3):476-83. doi: 10.1007/s00125-012-2793-9.

Noto H, Tsujimoto T, Sasazuki T, et al. 2011. Significantly increased risk of cancer in patients with diabetes mellitus: a systematic review and metaanalysis. *Endocr Pract*, 2011, 17(4):616-28. doi: 10.4158/EP10357.RA.

Pisani P. Hyper-insulinaemia and cancer, meta-analysis of epidemiological studies. *Arch Physiol Biochem*, 2008, 114(1):63-70. doi: 10.1080/13813450801954451.

Renehan A, Smith U, Kirkman MS. Linking diabetes and cancer: a consensus on complexity. *Lancet*, 2010, 375(9733):2201-2202. doi:10.1016/S0140-6736(10)60706-4.

Seshasai SR, Kaptoge S, Thompson A, et al. Diabetes mellitus, fasting glucose and risk of cause-specific death. *N Engl J Med*, 2011, 364:1281. doi: 10.1056/NEJMc110023.

Sieri S, Muti P, Claudia A, Berrino F, et al. 2011. Prospective study on the role of glucose metabolism in breast cancer occurrence. *Int J Cancer*, 2012, 130(4):921-9. doi: 10.1002/ijc.26071.

Son JY, Park SY, Kim SJ, Park AS, Kim MJ, Kim SW et al. EW-7197, a Novel ALK-5 Kinase Inhibitor, Potently Inhibits Breast to Lung Metastasis. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13(7):1704-16. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0903.

Sun GEC, Wells BJ, Yip K. Gender-specific effects of oral hypoglycaemic agents on cancer risk in type 2 diabetes mellitus. *DIABETES OBES METAB*, 2014, 16: 276-283.

Souza CM. Carcinoma mamário murino 4T1: características morfológicas, imunofenotípicas, bioquímicas e ensaios pré-clínicos com talidomida/carboplatina. [Tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina; 2013. Available from: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/handle/1843/BUOS-99MH3V>

Tai LH, Souza CT, Sahi S, et al. A Mouse Tumor Model Of Surgical Stress To Explore The Mechanisms Of Postoperative Immunosuppression And Evaluate Novel Perioperative Immunotherapies. *J Vis Exp*, 2014, 12;(85):51253. doi: 10.3791/51253.

Vargas-Hernández VM, Vargas-Aguilar VM, Moreno-Eutimio MA, et al. Metabolic syndrome and breast cancer. *GLAND SURG*, 2013, 2(2): 80-90. doi:10.1177/10117419.2013.2.2.80

Xiangdong L, Jiangiang JI, Sundquist K, 2012. The Impact of Type 2 Diabetes Mellitus on Cancer-Specific Survival. A Follow-Up Study in Sweden. *Cancer*, 2012, 118(5):1353-61. doi: 10.1002/cncr.26420. Epub 2011 Jul 28.

Xue F, Michaels KB. Diabetes, metabolic syndrome and breast cancer: A review of the current evidence. *Am J Clin Nutr*, 2007, 86(3):s823-35. doi: 10.1093/ajcn/86.3.823S.

Zhao Y, Tan YS, Aupperlee MD. Pubertal high fat diet: effects on mammary cancer development. *Breast Cancer Res*, 2013, 15:R100.

TABLE 1 – Experimental Groups

Group	1	2	3	4	Total
Initial	10	11	11	12	44
Deaths	1	2	2	3	8
Deaths/ total (%)	1/10 (10.0)	2/11 (18.8)	2/11 (18.8)	3/12 (25.0)	8/44 (18.8)
n final/ total (%)	9/10 (90.0)	9/11 (81.2)	9/11 (81.2)	9/12 (75.0)	36/44 (81.2)

Source: The authors

TABLE 2 – Tumor volume means and tumor invasion of upper limb in experimental groups herein

Groups	1	2	3	4	p-value
Tumor volume means (mm ³)	4248	3385	2941	1816	0.0168
Tumor invasion of upper limb- n/total (%)	9/9 (100)	6/9 (66.7)	8/9 (88.8)	7/9 (77.8)	0.9471

Source: The authors

TABLE 3 – Presence of pulmonar metastases by experimental group

Groups	1	2	3	4
Metastases	1	2	3	3
	1	0	1	3
	1	3	3	3
	0	1	2	3
	0	3	3	3
	0	1	3	3
	0	3	3	3
	1	3	3	3
	0	2	3	3

Source: The authors

6 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que dieta hiperlipídica e insulina podem afetar o crescimento tumoral e o número de metástases, como sugerido anteriormente^{4,5,15,19,22,23,30,31}. Níveis mais altos de glicemia foram observados em grupos que receberam insulina, associada ou não a HFD, o que pode indicar que: 1) a hiperglicemia pode ser induzida pelo tumor e/ou 2) insulina oral não foi efetiva para prevenir hiperglicemia, como previamente relatado. Outros efeitos da ingesta de insulina, no entanto, foram aparentes.

Estudos prospectivos visando estabelecer uma correlação entre câncer de mama e níveis de glicose sérica pré-diagnóstico têm sido inconclusivos^{2,3,6,20-22}. Os níveis séricos de glicose elevaram-se em todos os grupos ao longo do período de observação, de modo precoce nos animais que receberam HFD e insulina, logo após a implantação tumoral, mesmo antes dos camundongos apresentarem tumores palpáveis (D15). Apesar dos níveis de glicemia serem mais altos nos camundongos que receberam HFD e insulina (Grupo 4, 4T1-HFD-INS) quando comparados com o Grupo 1 (4T1), camundongos que receberam apenas HFD (Grupo 2, 4T1-HFD) apresentaram níveis mais baixos de glicemia nos dois momentos de aferição, quando comparados com os que receberam apenas implantes tumorais (Grupo 1, 4T1). Não observamos correlação entre os níveis de glicemia ao D15/D30 e o volume tumoral final para quaisquer dos grupos experimentais.

Este estudo relata menor amplitude de crescimento tumoral nos grupos que receberam insulina oral, a despeito da dieta ($p=0,0168$), diferentemente do que mostram estudos epidemiológicos em pacientes portadoras de DM2 com câncer de mama^{28,29,44}. Maior crescimento tumoral esteve correlacionado a ingesta de dieta hiperlipídica (Grupo 2, $p=0,0492$) quando comparado com o grupo que recebeu apenas implantação tumoral (Grupo 1), mesmo sem diferença nas médias entre os grupos. Esses achados corroboram os achados de estudo experimental anterior realizado com camundongos púberes, que associaram HFD com expressão genética aumentada de fatores de crescimento e inflamatórios após 3 a 4 semanas da dieta, e podem estar relacionados ao desenvolvimento de câncer de mama em idades mais avançadas⁵⁶.

Diferentemente dos camundongos púberes ⁵⁶, onde o peso tumoral e o número de metástases foi significativamente aumentado pela HFD, no presente estudo observamos menor taxa de incidência de invasão de membro homolateral (66,7 versus 100%), não observamos diferença entre os volumes tumorais entre os grupos, e identificamos maior número de metástases nos grupos que receberam insulina (Grupos 3 e 4, ambos $p < 0,05$), incluindo o Grupo 4 (4T1-HFD-INS).

Aumento de peso ocorreu mais cedo para o Grupo 2 (4T1-HFD, $p < 0,05$) e entre os dias 15 e 30 de experimentação para os outros grupos, o que sugere quão rápidos podem ser os efeitos da dieta hiperlipídica. A ingesta de insulina limitou o ganho de peso até o D15, mas não o peso final no D30. Apesar de secretagogues da insulina terem sido associados à diminuição do risco de malignidades em mulheres portadoras de DM2 ²⁷, nenhum estudo experimental até o momento focou no uso de insulina e sua relação com o câncer de mama.

O tempo dispendido para o aparecimento dos tumores foi maior que o relatado na literatura ⁴⁹⁻⁵², com apenas dois indivíduos apresentando tumores palpáveis ao 15º dia. O crescimento tumoral na segunda quinzena do experimento, entretanto, foi geométrico, incluindo rápida disseminação local e à distância. As mortes foram associadas a comprometimento neoplásico tumoral, que, em conjunto com o sofrimento inerente ao rápido crescimento desses tumores altamente invasivos, sugerem que o período de experimentação não deve ultrapassar 30 dias.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Não observamos correlação entre níveis glicêmicos e volume tumoral para nenhum grupo experimental. Maior crescimento tumoral esteve correlacionado com ingesta de dieta hiperlipídica, e menor crescimento, com o uso de insulina oral, a despeito da dieta. Não houve diferença entre as médias de volume tumoral entre os grupos.

Não houve correlação entre níveis glicêmicos e presença de metástases. Metástases foram mais comuns em grupos que receberam só insulina ou HFD com insulina.

REFERÊNCIAS

GUERRA M.R., et al. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 51, n. 3, p. 227-234, 2005.

BOYLE P, et al. Diabetes and breast cancer risk: a meta-analysis. **Br. J. Cancer**, v. 107, n. 9, p. 1608-1617, 2012.

VARGAS-HERNÁNDEZ V. M., et al. Metabolic syndrome and breast câncer. **Gland. Surg.**, v. 2, n. 2, p. 80-90, 2013.

BAO P. P., et al. Association of Type 2 Diabetes Genetic Variants with Breast Cancer Survival among Chinese Women. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2. 2015; e0117419, 2015.

GARCÍA-ESQUINAS E., et al. Association of diabetes and diabetes treatment with incidence of breast cancer. **Acta Diabetol.**, v. 53, p. 99-107, 2016.

JARVANDI S., et al. Pre-existing diabetes in early stage breast cancer patients is associated with lack of improvement in quality of life 2 years after diagnosis. **Int. J. Behav. Med.**, v.23, p. 722-729, 2016.

BRONSVELD H. K., et al. Treatment with insulin (analogues) and breast cancer risk in diabetics; a systematic review and meta-analysis of in vitro, animal and human evidence. **Breast Canc. Res.**, v. 17, p. 100-121, 2015.

BRONSVELD H. K, et al. Diabetes and Breast Cancer Subtypes. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, e0170084, 2017.

GOODARZ D, et al. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. **Lancet**, v.378, n. 9785, p. 31-40, 2011.

CAMPOS GÓMEZ S, et al. Breast cancer subtype and baseline characteristics from diabetic breast câncer patients are not different from nondiabetics. **Breast J.**, 2014, v. 20, n. 4, p. 434-436, 2014.

Cancer Emerging Risk Factors Collaboration, et al. Diabetes mellitus, fasting glucose and risk of cause-specific death.. **N. Engl. J. Med.**, v. 364, p. 829-841, 2011.

XIANGDONG L., et al. The Impact of Type 2 Diabetes Mellitus on cancer-specific survival. A follow-up study in Sweden. **Cancer**, v. 118, n. 5, p. 1353-1361, 2012.

RENEHAN A., SMITH U., KIRKMAN M. S. Linking diabetes and cancer: a consensus on complexity. **Lancet**; v. 375, n. 9733, p. 2201-2202, 2010.

LARSSON S. C., MANTZOROS C. S., WOLK A. Diabetes mellitus and risk of breast cancer: a meta-analysis. **Int. J. Cancer**, v. 121, p. 856-862, 2007.

LIPSCOMBE LL, ET AL. Incidence of diabetes among postmenopausal breast cancer survivor. **Diabetologia**, v. 56, p. 476-483, 2013.

XUE F., MICHAELS K. B. Diabetes, metabolic syndrome and breast cancer: A review of the current evidence. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 86, p. 823S-835S, 2007.

NOTO H., et al. Significantly increased risk of câncer in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. **Endocr. Pract.**, v. 17, p. 616-628, 2011.

AGRESTI R., et al. Association of adipositu, dysmetabolisms, and inflammation with aggressive breast cancer subtypes: a cross-sectional study. **Breast. Cancer Res. Treat.**, v. 157, n. 1, p. 179-89, 2016.

BORDELEAU L., et al. Diabetes and Breast Cancer Among Women With BRCA1 and BRCA2 Mutations. **Cancer**, v. 117, n. 9, p. 1812-1818, 2016.

UZUNLULU M., TELCI OAKLILI O., OGUZ A. Association between metabolic syndrome and cancer. **Ann Nutr Metab.**, v. 68, n. 3, p. 173-9, 2016.

PISANI P. Hyper-insulinaemia and cancer, meta-analysis of epidemiological studies. **Arch. Physiol. Biochem.**, v. 114, p. 63-70, 2008.

SIERI S, et al. Prospective study on the role of glucose metabolism in breast cancer occurrence. **Intl. J. Canc.**, v. 130, n. 4, p. 921-929., 2011.

BAYRAKTAR S. et al. Effect of metformin on survival outcomes in diabetic patients with triple receptor-negative breast cancer. **Cancer**, v. 118, n. 5, p. 1202-1211.

FOYGEL K., SEKAR T. V., PAULMURUGAN R. Monitoring the antioxidant mediated chemosensitization and ARE-signaling in triple negative breast cancer therapy. **PLoS One**, v. 10, n. 11, e0141913, 2015.

GRIMALDI-BENSOU DA L., et al. Risk of Breast Cancer by Individual Insulin Use: An International Multicenter Study. **Diabetes Care**, v. 37, n. 1, p. 134-143, 2013.

PEARLS K. S., et al. Diabetes mellitus and breast cancer outcomes: a systematic review and meta-analysis. **J. Clin. Oncol.**, v. 29, n. 1, p. 54-60, 2011.

TANG Z., et al. Associations between Diabetes and Quality of Life among Breast Cancer Survivors. **PloS ONE**, 2016, v. 11, n. 6, 0157791, 2016.

ALGACIOCLU A., et al. Leptin, insulin and body composition changes during adjuvant taxane based chemotherapy in patients with breast câncer, preliminar study. **Indian J. Cancer**, v. 53, n. 1, p. 39-42, 2016.

FERRONI P., et al. Pretreatment Insuline Levels as a Prognostic Factor for Breast Cancer Progression. **Oncologist**, v. 21, n. 9, p. 1041-9, 2016.

ONU CHI A. C., CHAMMAS R. Câncer e o microambiente tumoral. **Rev Med**, v. 9, n. 1, p. 21-31, 2010.

KARLSTADT O., et al. Use of insulin and insulin analogs and risks of cancer – systematic review and meta-analysis of observational studies. **Curr. Drug Saf.**, v. 8, n. 5, p. 333-348, 2013.

HEPPNER G. H., MILLER F. R., MALATHY SHEKHAR P. V. Nontransgenic models of breast cancer. **Breast. Cancer Res.**, v. 2, n. 5, p. 331–334, 2000.

TAI LH, et al. A mouse tumor model of surgical stress to explore the mechanisms of postoperative immunosuppression and evaluate novel perioperative immunotherapies. **J. Vis. Exp.**, v. 85, e51253, 2014.

SON J. Y., et al. EW-7197, a novel ALK-5 kinase inhibitor, potently inhibits breast to lung metastasis. **Mol. Cancer Ther.**, v. 13, n. 7, p. 1704-1716, 2014.

SILVA V. L., et al. Selection of novel peptides homing the 4T1 cell line: exploring alternative targets for triple negative breast cancer. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, e0161290.

DELFINO V. D. A., et al. Diabetes mellitus induzido por streptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **J. Bras. Nefrol.**, v. 24, n. 1, p. 31-36, 2002.

LERCO M. M., et al. Caracterização de um modelo experimental de Diabetes Mellitus, induzido por aloxana em ratos. Estudo clínico e laboratorial. **Acta Cir. Bras.**, v. 18, n. 2, p. 132-142, 2003.

HEYDEMANN A. An overview of murine high fat diet as a model for Type 2 Diabetes Mellitus. **J. Diabetes Res.**, v. 2016, 2902351, 2016.

FLORES-LÓPEZ L. A., et al. High glucose and insulin enhance uPA expression, ROS formation and invasiveness breast cancer-derived cells. **Cell Oncol. (Dordr)**, v. 39, n. 4, p. 365-78, 2016.

CHOI H. J., et al. Dipeptidyl peptidase 4 promotes epithelial cell transformation and breast tumorigenesis via induction of PIN1 gene expression. **Br. J. Pharmacol.**, v. 172, n. 21, p. 5096-5109, 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, INCA, 2019.** Disponível em <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>

DE LORENZO M. S., et al. Caloric restriction reduces growth of mammary tumors and metastases. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 9, p. 1381-7, 2011.

LIPSCOMBE L. L., Diabetes mellitus and breast cancer: a retrospective population based cohort. **Breast Canc. Res. Treat.**, n. 98, p. 349-356, 2006.

MU L., et al. Type 2 Diabetes, insulin treatment and prognosis of breast cancer. **Diabetes Metab. Res. Rev.**, v. 33, n. 1, 10.1002/dmrr.2823. doi:10.1002/dmrr.2823, 2017.

CALIP G. S., et al. Comparative safety of diabetes medication and risk of incidente invasive breast câncer: a population-based cohort study. **Cancer Cause Control**, v. 27, n. 5, p. 709-20, 2016.

SCHMID M. C., et al. Insulin-like growth factor binding protein 3 is overexpressed in endothelial cells of mouse breast tumor vessels. **Int. J. Canc.**, v. 103, p. 577-586, 2003.

PAN B., et al. High-density lipoprotein of patients with type 2 diabetes mellitus elevates the capability of promoting migration and invasion of breast cancer cells. **Int. J. Cancer**, v. 131, n. 1, p. 70-82, 2012.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes, 2014-2015**. Oliveira, José (org). São Paulo: AC Farmacêutica, 2015. Disponível em: <https://www.diabetes.org.br/publico/images/2015/area-restrita/diretrizes-sbd-2015.pdf>

LANARI C., et al. The MPA mouse breast cancer model: evidence for a role of progesterone receptors in breast cancer. **Endocr. Relat. Cancer**, v. 16, n. 2, p. 333–350, 2009.

ALMEIDA A.S., et al. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. *J. Bras. Patol. Med. Lab*, v. 44, n. 6, p. 429-432, 2008.

SINHA P., et al. Tumor immunity: a balancing act between T cell activation, macrophage activation and tumor-induced immune suppression. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 54, n. 11, p. 1137-42, 2005.

SOUZA C. M. **Carcinoma mamário murino 4T1: características morfológicas, imunofenotípicas, bioquímicas e ensaios pré-clínicos com talidomida/carboplatina**. 2013, 138 fl. Tese (Doutorado em Patologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina, Belo Horizonte, 2013. Disponível em <http://hdl.handle.net/1843/BUOS-99MH3V>.

GARCIA C. M. S., et al. Morphological and Immunophenotypical Characterization of Murine Carcinoma 4T1. **Braz. J. Vet. Pathol.**, v. 7, n. 3, p. 158 – 165, 2014.

KUS K., et al. Alterations in arginine and energy metabolism, structural and signalling lipids in metastatic breast cancer in mice detected in plasma by targeted metabolomics and lipidomics. **Breast Cancer Res.**, v. 20, n. 148, p. 1-13, 2018.

LU X., et al. Metabolomic changes accompanying transformation and acquisition of metastatic potential in a syngeneic mouse mammary tumor model. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 13, p. 9317-9321, 2018.

Zhao Y, Tan YS, Aupperlee MD. Pubertal high fat diet: effects on mammary cancer development. **Breast Cancer Res**, 2013, 15:R100.

BRASIL. PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA. CASA CIVIL. SUBCHEFIA PARA ASSUNTOS JURÍDICOS. **Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008**. Disponível em <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm>

ANEXOS**ANEXO A – Carta de aprovação Comissão de Ética do uso de Animal**

UEPG

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**

CARTA DE APROVAÇÃO

Processo CEUA – 013/2018

Protocolo UEPG – 3323/2018

Título – Projeto de pesquisa “*Papel de glicose e insulina no crescimento tumoral em modelo Balb/C-4T1 de adenocarcinoma mamário murino*”.

Interessado: Prof. Dr. Giovani Marino Favero e Doutorando Renato Van Wilpe Bach

Data de Entrada – 07/03/2018

Resultado: Aprovado

Considerações

Prezado Professor Giovani Marino Favero (gmfavero@yahoo.com.br/PPGCF) e Doutorando Renato Van Wilpe Bach (renatovwbach@gmail.com):

Em relação á utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela aprovação da utilização de aprovada a utilização de 36 (trinta e seis) camundongos Balb C, 20-25 gramas.

Ponta Grossa, 04 de junho de 2018.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
CEUA - Comissão de Estudos e Pesquisas em Animais
Dra. Dionizina Xavier Scomparin
Coordenadora

Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, CEP 84.030-900 Campus Universitário em Uvaranas
Ponta Grossa – Paraná
Bloco da Reitoria - anexo a PROPESP
Fone: (042) 3220-3264

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

Comissão de Estudos e pesquisa em animais

Ata CEUA 006/18 1/2

*Comissão de estudos e pesquisas em animais da UEPG, CEUA, no dia quatro de junho de 2018 às 10h00 na sala de reuniões do SEBISA, Bloco M, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, sob a coordenação da Professora Doutora Dionizia Xavier Scomparin. Participaram: Cheila Roberta Lehen, Denilton Vidolin, Leandro Cavalcante Lipinski, Luciana da Silva Leal, Márcia Thaís Pochapski, Raquel Abdalaih da Rocha Oliveira e Robson Klimionte. **PRIMEIRO ASSUNTO:** Processo 3323/2018 - Projeto de pesquisa "Papel de glicose e insulina no crescimento tumoral em modelo Balb/C-4T1 de adenocarcinoma mamário murino". Interessado: Giovani Marino Favero. Decisão: Considerando que todas as recomendações presentes na Ata do dia 20 de abril de 2018 foram atendidas, o projeto está aprovado por unanimidade. Fica autorizado o uso de 36 camundongos Balb-C. 20-25 gramas... Nada mais havendo a tratar, a Coordenadora encerrou a reunião, que será lavrada em ata, depois lida e aprovada, então assinada pelos presentes.*

Dionizia Xavier Scomparin

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
CEUA - Comissão de Estudos e Pesquisas em Animais
Dra. Dionizia Xavier Scomparin
Coordenadora

ANEXO B – Artigo publicado Revista International Journal of Development Research – IJDR – Open Access



ISSN: 2230-9926

Available online at <http://www.journalijdr.com>

IJDR

International Journal of Development Research
Vol. 10, Issue, 04, pp. 35139-35141, April, 2020

RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

DIABETES MELLITUS E O CÂNCER DE MAMA: UMA BREVE REVISÃO

¹Renato van Wilpe Bach, ²Louise Bach Kmetiuk, ¹Aryadyne Bueno Rocha Szesz, ¹João Henrique Maffisoni Roceto, ¹Leandro Cavalcante Lipinski and ³Giovani Marino Fávero

¹Departamento de Medicina, Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR, 84030-900, Brasil

²Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 81531-900, Brasil

³Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Ponta Grossa, PR, 84030-900, Brasil

ARTICLE INFO

Article History:

Received 08th January, 2020

Received in revised form

11th February, 2020Accepted 20th March, 2020Published online 29th April, 2020

Key Words:

Câncer de mama, Diabetes Mellitus tipo 2, Fatores de risco.

*Corresponding author: Renato van Wilpe Bach,

ABSTRACT

Há evidências de que o Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) tem sido fator de risco para vários tipos de câncer, como o de mama no pós-menopausa. Nesse sentido, o objetivo desta breve revisão será fornecer o estado de arte dos fatores de risco e da ocorrência associada de DM2 e câncer de mama em mulheres no pós-menopausa. No geral, estudos observacionais, caso-controle, revisões e metanálises apontaram que pacientes com DM2 no pós-menopausa apresentaram risco aumentado para o desenvolvimento da doença, com tumores mais avançados ao diagnóstico, maior mortalidade/menor sobrevida, pior qualidade de vida no pós-tratamento e desfechos clínicos. Apesar dos estudos já realizados, algumas perguntas sobre o período de latência de exposição ao DM2 até o estabelecimento do risco aumentado para o câncer de mama, e até que ponto os efeitos percebidos derivam do DM2 ou são modulados pela medicação antidiabética, incluindo a insulina, permanecem sem respostas. Dessa forma, além dos estudos epidemiológicos, futuros estudos *in vitro* e *in vivo* parecem ser necessários para melhor compreensão da ocorrência concomitante de DM2 e câncer de mama pós-menopausa.

Copyright © 2020, Renato van Wilpe Bach et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Citation: Renato van Wilpe Bach, Louise Bach Kmetiuk, Aryadyne Bueno Rocha Szesz. "Diabetes mellitus e o câncer de mama: uma breve revisão", International Journal of Development Research, 10, (04), 35139-35141.

INTRODUCTION

O Diabetes mellitus e o câncer são causas comuns de morbidade e mortalidade a nível mundial (Bao et al., 2015). O Diabetes Mellitus tem sido a doença metabólica crônica mais comum entre os seres humanos (Goodarz et al., 2011), apresentando alta prevalência e incidência especialmente em populações de países industrializados (Campos Gómez et al. 2014; Bronsveld et al. 2017; García-Esquinas et al. 2016; Vargas-Hernández et al. 2013). O Diabetes mellitus do tipo 2 (DM2) atingindo cerca de 6.5% da população adulta (Campos-Gómez et al., 2014), e tem sido associado a complicações agudas e crônicas de alta morbimortalidade (Bronsveld et al. 2017; García-Esquinas et al. 2016), como também ao desenvolvimento de vários tipos de câncer (Campos Gómez et al. 2014; Seshasai et al., 2011; Xiangdong et al. 2012). Há evidências de que o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) tem sido fator de risco para vários tipos de câncer (Campos-Gómez et al., 2014; Renehan et al., 2010; Xiangdong et al., 2012), como

de pâncreas, fígado, estômago, cólon, reto, próstata, rins, bexiga, endométrio, além do câncer de mama pós-menopausa (Larsson et al., 2007; Lipscombe et al. 2013; Noto et al., 2011; Renehan et al., 2010; Seshasai et al., 2011; Xiangdong et al., 2012; Xue et al., 2007). Nesse sentido, o objetivo desta breve revisão será fornecer o estado de arte da ocorrência associada de DM2 e câncer de mama pós menopausa. Estudos prévios mostram que a mama é o sítio de câncer mais prevalente entre as mulheres (Boyle et al., 2012; Campos Gómez et al., 2014; García-Esquinas et al., 2016; Vargas-Hernández et al., 2013), e responsável por maiores taxas de mortalidade entre elas, na maioria dos países estudados (Agresti et al., 2016; Bao et al., 2015; García-Esquinas et al., 2016; Vargas-Hernández et al., 2013). O risco de uma mulher desenvolver câncer de mama ao longo da vida chega a 9,7% (Bronsveld et al., 2017), com incremento no número de casos que chega à 5% ao ano em países em desenvolvimento (Campos Gómez et al., 2010). O câncer de mama é uma doença heterogênea e multifatorial (Agresti et al., 2016; Vargas-Hernández et al., 2013), que envolve componentes genéticos, sociodemográficos,

reprodutivos (exposição prolongada a estrógenos) (García-Esquinas *et al.*, 2016; Guerra *et al.*, 2005), relacionados ao estilo de vida e à história pessoal de câncer (Agresti *et al.*, 2016; Bordeleau *et al.*, 2011; Campos Gómez *et al.*, 2014; Guerra *et al.*, 2005). Apesar da correlação entre câncer de mama humano e obesidade (Bronsveld *et al.*, 2017; Bordeleau *et al.*, 2011; Guerra *et al.*, 2005; Pisani *et al.*, 2008; Vargas-Hernández *et al.*, 2013; Uzunlulu *et al.*, 2016), bem como a síndrome metabólica (Agresti *et al.*, 2016; Bayraktar *et al.*, 2012; Bordeleau *et al.*, 2011; Sieri *et al.*, 2011; Pisani *et al.*, 2008; Xue *et al.*, 2007) ter sido demonstrada previamente, diferentes estudos prospectivos que tentaram correlacionar câncer de mama e níveis pré-diagnóstico de hiperglicemia foram inconclusivos (Agresti *et al.*, 2016; Bayraktar *et al.*, 2012; Bordeleau *et al.*, 2011; Boyle *et al.*, 2012; Jarvandi *et al.*, 2016; Pisani *et al.*, 2008; Vargas-Hernández *et al.*, 2013; Sieri *et al.*, 2011; Xue *et al.*, 2007).

O entendimento dos fatores de risco para o câncer de mama necessita da distinção de suas apresentações clínicas mais comuns: os que possuem marcadores hormonais (ER, estrogênio, PR, progesterona) em sua superfície celular, correspondentes a 70% do total; e os tumores triplamente negativos (TTN), que configuram o restante (Foygel *et al.*, 2015; Uzunlulu *et al.*, 2016). Esta proporção não é afetada se considerarmos somente mulheres diabéticas (Bronsveld *et al.*, 2017), porém mulheres pré-menopausa com DM2 tendem a desenvolver tumores que não expressam receptores hormonais (triplo-negativos) (Grimaldi-Bensouda *et al.*, 2014), basais, associados com mau prognóstico (Xiangdong *et al.*, 2012), que não possuem terapia específica (Bao *et al.*, 2015; Bronsveld *et al.*, 2017; Foygel *et al.*, 2015; Grimaldi-Bensouda *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2016). Estudo realizado em 18.763 pacientes com diagnóstico recente de câncer de mama foram subdivididos em diabéticos e não-diabéticos (Campos Gómez *et al.*, 2014). Nesse estudo, não houve diferença estatística entre os subtipos de câncer entre os grupos ($p=0.43$) e na análise dos receptores hormonais entre os grupos ($p=0.7$). Ainda, pacientes diabéticas apresentaram-se em estágios clínicos mais avançados do câncer de mama (invasão local e/ou metástases) quando comparados a pacientes não-diabéticos (Campos-Gómez *et al.*, 2014).

Além disso, estudos observacionais (Bao *et al.*, 2015; Bayraktar *et al.*, 2012; Bordeleau *et al.*, 2011; Lipscombe *et al.*, 2013; Xiangdong *et al.*, 2012), caso-controle (Campos Gómez *et al.*, 2014; Seshasai *et al.*, 2011), revisões bibliográficas (Bronsveld *et al.*, 2015; Campos Gómez *et al.*, 2014; Noto *et al.*, 2011; Renehan *et al.*, 2010; Xue *et al.*, 2007) e metanálises (Boyle *et al.*, 2012; Larsson *et al.*, 2007; Noto *et al.*, 2011; Pearls *et al.*, 2011; Sieri *et al.*, 2011) apontam que pacientes com DM2, pós-menopausa, apresentaram maior risco aumentado para o desenvolvimento da doença (Boyle *et al.*, Campos-Gómez *et al.*, 2014; Larsson *et al.*, 2007; Lipscombe *et al.*, 2013) tumores mais avançados ao diagnóstico (Lipscombe *et al.*, 2015; Tang *et al.*, 2016), maior mortalidade/menor sobrevida (Bao *et al.*, 2015; Bronsveld *et al.*, 2015; Bronsveld *et al.*, 2017; Jarvandi *et al.*, 2016; Lipscombe *et al.*, 2013; Pearls *et al.*, 2011; Xiangdong *et al.*, 2012) pior qualidade de vida pós-tratamento (Bronsveld *et al.*, 2015; Bronsveld *et al.*, 2017; Jarvandi *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2016) e piores desfechos clínicos (Alagacioclu *et al.*, 2016; Ferroni *et al.*, 2016). Nesse contexto, o estudo do microambiente tumoral se faz essencial para a compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da doença (Onuchi *et al.*,

2010), tendo em vista que muitas das alterações genéticas que levam ao desenvolvimento do câncer afetam diretamente a glicólise e a resposta celular à hipóxia (Sieri *et al.*, 2011). Estes achados corroboram a hipótese de que hiperglicemia e hiperinsulinemia (como consequência de resistência à insulina) tem um papel no desenvolvimento do câncer (Sieri *et al.*, 2011). Hiperglicemia e hiperinsulinemia tem se mostrado fatores de risco tanto para o DM2 quanto para o câncer (Bao *et al.*, 2015; Bayraktar *et al.*, 2012; Bordeleau *et al.*, 2011; García-Esquinas *et al.*, 2016; Karlstadt *et al.*, 2013; Lipscombe *et al.*, 2013; Sieri *et al.*, 2008). E estudos epidemiológicos sugeriram que hiperinsulinemia e hiperglicemia estão relacionados a maior risco de malignização epitelial, incluindo câncer de próstata, mama, rins e fígado (García-Esquinas *et al.*, 2016; Grimaldi-Bensouda *et al.*, 2014; Lipscombe *et al.*, 2013; Seshasai *et al.*, 2011; Uzunlulu *et al.*, 2016). Em ensaios clínicos, o risco da ocorrência de câncer de mama foi maior em mulheres que apresentaram síndrome de resistência à insulina, obesidade, altos níveis de insulina endógena, diabetes e inatividade física (Agresti *et al.*, 2016; Bordeleau *et al.*, 2011; Noto *et al.*, 2011; Pisani *et al.*, 2008; Sieri *et al.*, 2011; Uzunlulu *et al.*, 2016; Xue *et al.*, 2007). Dessa forma, baseado na presente revisão, a associação entre DM2 e câncer de mama na pós-menopausa pode ocorrer devido a existência de fatores de risco comuns a ambas as doenças (obesidade, sedentarismo, dieta) ou por efeito direto da resistência à insulina e, por consequência, da hiperinsulinemia e hiperglicemia resultantes. Apesar dos estudos já realizados, algumas perguntas associadas ao período de latência de exposição ao DM2 até o estabelecimento do risco aumentado para câncer de mama até que ponto os efeitos percebidos derivam do DM2 ou são modulados pela medicação antidiabetes, incluindo a insulina, permanecem sem resposta. Dessa forma, além dos estudos epidemiológicos, futuros estudos *in vitro* como *in vivo* são necessários para melhor compreensão da associação entre DM2 e câncer de mama pós-menopausa.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

REFERENCES

- Agresti R., Meneghini E., Bailly P., Minicozzi P., Turco A., Cavallo L., *et al.* 2016. Association of adipositu, dysmetabolisms, and inflammation with aggressive breast cancer subtypes: a cross-sectional study. *Breast Cancer Res Treat.* 157(1), pp. 179-89.
- Alagacioclu A., Kebapçılar L., Gokgoz Z., Oztekin O., Bozkaya G., Tarhan O. *et al.* 2016. Leptin, insulin and body composition changes during adjuvant taxane based chemotherapy in patients with breast cancer, preliminary study. *Indian J Cancer.* 53(1), pp. 39-42.
- Bao PP, Zhao ZG, Gao YT, Zheng Y, Zhang B, Cai H *et al.* 2015. Association of Type 2 Diabetes Genetic Variants with Breast Cancer Survival among Chinese Women. *PLoS ONE.* 10(2); e0117419. doi:10.1371/journal.pone.0117419.
- Bayraktar S., Hernandez-Aya L., Lei X., Meric-Bernstam F., Litton J.K., Hsu L. *et al.* 2012. Effect Of Metformin On Survival Outcomes In Diabetic Patients With Triple Receptor-Negative Breast Cancer. *Cancer.* pp. 1202-1211.
- Bordeleau L., Lipscombe L., Lubinski L., Ghadirian P., Foulkes W.D., Neuhausen S. *et al.* 2011. Diabetes and Breast Cancer Among Women With BRCA1 and BRCA2 Mutations. *Cancer.* pp. 1812-1818.

- Boyle P., Boniol M., Koehlin A., Robertson C., Valentini F., Coppens K., Fairley L-L. *et al.* 2012. Diabetes and breast cancer risk: a meta-analysis. *British Journal of Cancer*. 107(9), pp. 1608-1617.
- Bronsveld H.K., Braak B.T., Karlstad O., Vestergaard P., Starup-Linde J., Bazelier M.T. *et al.* 2015. Treatment with insulin (analogues) and breast cancer risk in diabetics; a systematic review and meta-analysis of in vitro, animal and human evidence. *Breast Cancer Research* 2015; 17, pp. 100-121.
- Bronsveld H.K., Jensen V., Vahl P., De Bruin M.L., Cornelissen S., Sanders J. *et al.* 2017. Diabetes and Breast Cancer Subtypes. *PLoS ONE*. 12 (1), e0170084.doi:10.1371/journal.
- Campos-Gómez S., Valero V., Flores-Arredondo J.H., Issassi-Chapa A., Rangel-Rodríguez I., Hortobagyi G.N. *et al.* 2014. Breast Cancer Subtype and baseline characteristics from Diabetic Breast cancer patients are Not Different from Nondiabetics. *The Breast J.* 20(4), pp. 434-436.
- Ferroni P., Riondino S., Laudisi A., Portarena I., Formica V., Alessandrini J. *et al.* 2016. Pretreatment Insuline Levels as a Prognostic Factor for Breast Cancer Progression. *Oncologist*. 2016 Jul. 7; Piii: theoncologist.2015- 0462 [Epub ahead of print]
- Foygel K., Sekar T.V., Paulmurugan R. 2015. Monitoring the Antioxidant Mediated Chemosensitization and ARE-Signaling in Triple Negative Breast Cancer Therapy. *PLoSOne*. 10 (11), e0141913.doi:10.1371/journal.pone.0141913
- García-Esquinas E., Guinó E., Castaño-Vinyals G., Pérez-Gómez B., Llorca J., Altzibar J.M. *et al.* 2016. Association of diabetes and diabetes treatment with incidence of breast cancer. *Acta Diabetol.* 53, pp. 99-107.
- Goodarz D., Finucane M.M., Lu Y., Singh G.M., Cowan M.J., Paciorek C.J. *et al.* 2011. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2·7 million participants. *Lancet*. 378(9785), pp. 31-40.
- Grimaldi-Bensouda L., Cameron D., Marty M., Barnett AH, Penault-Llorca F, Pollack M *et al.* Risk of Breast Cancer by Individual Insulin Use: An International Multicenter Study. *Diabetes Care* 2014; (37)134-143.
- Guerra M.R., Gallo C.V.M., Azevedo A., Mendonça S. 2005. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2005; 51(3), pp. 227-234.
- Jarvandi S., Pérez M., Schootman M., Jeffe D.B. 2016. Pre-Existing Diabetes in Early Stage Breast Cancer Patients is Associated with Lack of Improvement in Quality of Life 2 Years After Diagnosis. *Int J Behav Med.* Jul. 8.
- Karlstadt O., Starup-Lindle J., Vestergaard P., Hjellvik V., Bazelier M.T., Schmitt M.K. *et al.* 2013. Use of insulin and insulin analogs and risks of cancer – systematic review and meta-analysis of observational studies. *CurrDrug Saf.* 8, pp. 333-348.
- Larsson S.C., Mantzoros C.S., Wolk A. 2007. Diabetes mellitus and risk of breast cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer*. 121, pp. 856-862.
- Lipscombe L.L., Chan W.W., Yun L., Austin P.C., Anderson G.M., Rochon P.A. 2013. Incidence of diabetes among postmenopausal breast cancer survivor. *Diabetologia*. 56, pp. 476-483.
- Noto H., Tsujimoto T., Sasazuki T., Noda M. 2011. Significantly increased risk of cancer in patients with diabetes mellitus: a systematic review and metaanalysis. *Endocr Pract.* 17, pp. 616-628.
- Onuchi AC, Chammas R. Câncer e o microambiente tumoral. *RevMed (São Paulo)* 2010; 89(1)21-31.
- Pearls K.S., Barone B.B., Snyder C.F., Yeh H.C., Stein K.B., Derr R.L. *et al.* 2011. Diabetes mellitus and breast cancer outcomes: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol.* pp. 29:54-60.
- Pisani P. 2008. Hyper-insulinaemia and cancer, meta-analysis of epidemiological studies. *Arch PhysiolBiochem.* 114, pp. 63-70.
- Renahan A., Smith U., Kirkman M.S. 2010. Linking diabetes and cancer: a consensus on complexity. *Lancet*. 375(9733), pp. 2201-2202.
- Seshasai S.R., Kaptoge S., Thompson A., Di Angelantonio E., Gao P., Sarwar N. *et al.* 2011. Diabetes mellitus, fasting glucose and risk of cause-specific death. *N Engl J Med.* 364, pp. 829-841.
- Sieri S., Muti P., Claudia A., Berrino F., Pala V., Grioni S. *et al.* 2011. Prospective study on the role of glucose metabolism in breast cancer occurrence. *Intl J Canc.* pp. 921-929.
- Tang Z., Wang J., Zhang H., Sun L., Tang F., Deng Q. *et al.* 2016. Associations between Diabetes and Quality of Life among Breast Cancer Survivors. *PloS ONE*. 11(6)e0157791, doi:10.1371/journal.pone.0157791
- Uzunlulu M., Telci-Oaklil O., Oguz A. 2016. Association between Metabolic Syndrome and Cancer. *Ann NutrMetab.* 68(3), pp. 173-9.
- Vargas-Hernández V.M., Vargas-Aguilar V.M., Moreno-Eutimio M.A., Acosta-Altamirano G., Tovar-Rodríguez J.M. 2013. Metabolicsyndromeand breast cancer. *Gland Surgery.* 2(2), pp. 80-90. 10(2); e0117419.doi:10.1371/journal.pone.0117419.
- Xiangdong L., Jiang J.I., Sundquist K., Sundquist J. 2012. The Impact of Type 2 Diabetes Mellitus on Cancer-Specific Survival. A Follow-Up Study in Sweden. *Cancer.* pp. 1353-1361.
- Xue F., Michaels K.B. 2007. Diabetes, metabolic syndrome and breast cancer: A review of the current evidence. *American J of Clin Nutr.* pp. 86:823S-835S.
