



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Avaliação do estado inflamatório em ilhotas de Langerhans de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich

Natalia Moretti Violato

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - UNESP – Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Biologia Geral e Aplicada, Biologia de Processos e Sistemas.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro

Botucatu – SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Avaliação do estado inflamatório em ilhotas de Langerhans de
camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich**

Natalia Moretti Violato

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Bosqueiro

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista - UNESP – Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Biologia Geral e Aplicada, Biologia de Processos e Sistemas.

Botucatu – SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Violato, Natalia Moretti.

Avaliação do estado inflamatório de ilhotas de Langerhans de camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich / Natalia Moretti Violato - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: José Roberto Bosqueiro

Capes: 20702000

1. Caquexia. 2. Langerhans, Ilhotas de. 3. Citocinas. 4. Inflamação. 5. Insulina. 6. Câncer. 7. Homeostase.

Palavras-chave: Caquexia; Inflamação; Ilhotas Pancreáticas; Citocinas.

Auxílio Financeiro: **FAPESP**
(Fundação de Amparo á Pesquisa do Estado de São Paulo)



Dedico este trabalho,

Aos meus pais Silvana e Vinicius Violato, exemplos de persistência e garra, pelo carinho, compreensão, companheirismo e incentivo em todos os momentos da minha vida. Não há como descrever a gratidão que sinto por tudo que fizeram por mim até hoje, deixando muitas vezes seus sonhos de lado para que eu realizasse os meus. A força que me guia em direção aos meus ideais e traz tranquilidade para superar os obstáculos da vida vem de vocês. Muito Obrigada!

Agradeço especialmente,

Ao meu orientador José Roberto Bosqueiro, pelos valiosos ensinamentos, pela amizade, e pela ajuda indispensável na realização deste trabalho. Agradeço ainda pela confiança dispensada a mim ao longo destes anos e por me guiar rumo aos meus objetivos desde a iniciação científica até o presente momento.

Agradeço,

À minha amiga e companheira de pesquisa Priscilla Ponce, pela ajuda imensurável na realização deste trabalho e pelos momentos agradáveis proporcionados.

Aos meus companheiros de pesquisa, Nathalia, Levy, Poliana e Sthéphanie pela contribuição na realização deste trabalho, pelo espírito de coletividade sempre presente e pelos momentos de descontração.

Aos membros do laboratório de Bioquímica e Nutrição da universidade das Ilhas Baleares-Espanha, especialmente à Paula, Enzo e Sthefânia, por toda a ajuda na realização deste trabalho, por todo o ensinamento e, por toda a atenção dedicada a este projeto.

À Flavia Paula da Universidade de Campinas, pelo auxílio na execução dos PCRs.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida.

Aos meus familiares pelo valioso apoio.

Ao Rodolpho Carazzatto, por toda a paciência, amor e ajuda psicológica na execução deste trabalho.

Aos meus grandes amigos pós-graduandos Leonardo, Sarah, Fernanda, João e Thaís pelas dificuldades divididas e pelos momentos de descontração.

Aos moradores da minha casa, Sarah, Flora, Luciana, Ricardo, Bruna, Tamirez e Márcio, pelos momentos felizes, pelos almoços em dias corridos e pela amizade verdadeira que me deram tranquilidade e leveza para a realização deste trabalho.

Ao bioterista Tiago, por cuidar tão zelosamente dos animais.

Aos funcionários da seção de pós-graduação, em especial à Luciana, pela atenção no esclarecimento de dúvidas.

Enfim, a todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e para minha formação profissional.

Muito Obrigada!

Eu quase que nada não sei, mas desconfio de muita coisa.

João Guimarães Rosa

RESUMO

A manutenção da homeostase energética é, sem dúvida, o aspecto fisiológico mais importante para a garantia de sobrevivência animal. Doenças crônicas como câncer são capazes de alterar esta homeostase, agravada principalmente pela presença do tumor. O conjunto de sintomas envolvidos neste quadro de desequilíbrio metabólico, comum a diversas doenças, foi agrupado e caracterizado como uma síndrome metabólica denominada caquexia que, entre outros fatores, leva à progressiva perda de peso, perda de tecido muscular e adiposo, e está frequentemente associado a sintomas de anorexia e inflamação sistêmica. Na caquexia induzida por câncer, o desequilíbrio no metabolismo de carboidratos é um sintoma frequente, especialmente alterações no perfil secretório de insulina. Da mesma forma, a presença tumoral gera um estado de inflamação sistêmica que há algum tempo tem sido apontada como principal responsável pela alteração funcional de diversos órgãos, acarretando na progressão da síndrome. No entanto, não há trabalhos na literatura que correlacionem o papel da inflamação sistêmica gerada pelo desenvolvimento tumoral com a alteração no metabolismo de carboidratos, principalmente aquelas relacionadas à secreção de insulina. Em resultados anteriores evidenciamos que camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich (TSE) exibiram drástica diminuição na capacidade secretória de insulina, hipoinsulinemia, maiores sensibilidade a este hormônio e tolerância à glicose. Deste trabalho, inúmeras possibilidades de estudo surgiram, dentre elas a investigação do quadro inflamatório na ilhota como possível causador das alterações na secreção de insulina. Diante da escassez de trabalhos nesta área e diante da importância da adequada secreção de insulina e da homeostase glicêmica na melhora da sobrevida de portadores de doenças malignas, foi proposta do presente estudo avaliar componentes da resposta inflamatória nas ilhotas de Langerhans em camundongos caquéticos portadores TSE a fim de buscarmos informações que nos permitam inferir sobre mecanismos moleculares envolvidos na alteração da secreção de insulina apresentada por estes animais. Para tanto, ilhotas de camundongos Swiss controle (CTL) e de portadores do TSE com 14 dias de evolução tumoral foram analisadas para avaliação da expressão gênica dos receptores *toll-like* 3, 4 e 9, expressão proteica de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , IFN γ , IFN- α , IL-6 e IL-8 e detecção de infiltração linfocitária. Nossos resultados revelaram que camundongos portadores do TSE exibiram aumento significativo na expressão de todas as citocinas analisadas bem como da expressão gênica de receptores TLR3 e TLR4, não havendo diferença estatística na expressão do TLR9.

As análises histopatológicas demonstraram severo infiltrado celular na região acinar do tecido pancreático com infiltrado de linfócitos CD3 na periferia das ilhotas. Ainda, as mesmas análises demonstraram que a região acinar dos animais do grupo TSE exibiram acúmulo lipídico que aparece como um fator adicional importante no agravamento da inflamação na ilhota. Estes dados coletivamente suportam a hipótese de que há um ambiente de inflamação instalado nas ilhotas pancreáticas que nos permite sugerir um estado de insulite. Estudos mais aprofundados poderão estabelecer melhor a relação entre inflamação e secreção de insulina neste modelo experimental e certamente análises futuras se concentrarão neste enfoque.

Palavras-chave: Câncer; Caquexia; Ilhotas de Langerhans; Inflamação; Secreção de insulina.

ABSTRACT

The maintenance of energy homeostasis is one of the most crucial physiological tasks to ensure long-term survival in animals. Chronic diseases, as cancer, are capable to lead to homeostasis imbalance mainly by tumor presence and the cluster of symptoms involved in this process was named cachexia. Cancer cachexia is a metabolic syndrome characterized by a marked weight loss, loss of muscle and adipose tissues and is frequently associated with anorexia and systemic inflammation. Alterations in carbohydrate metabolism are frequent in cancer cachexia, especially insulinemic alterations. In the same way, tumor presence promotes severe systemic inflammation in the host, and it was demonstrated that this is responsible for functional alterations in many organs leading to cachexia progression. However, there are no studies that correlate the role of systemic inflammation with the alterations in carbohydrate metabolism, mainly related with alterations in insulin secretion. In previous studies we demonstrated that solid Ehrlich carcinoma-bearing mice (SET) showed drastic decrease in insulin secretion, hypoinsulinemia, increase in insulin sensitivity and glucose tolerance. With these results, numerous opportunities for study appeared, among them the establishment of inflammatory response in islets. Considering the lack of studies in this area and considering the importance of proper insulin secretion and glycaemic homeostasis to the survival of cancer patients, we evaluated inflammatory response components in pancreatic islets of solid Ehrlich tumor-bearing mice in order to seek consistent information about possible mechanisms involved in alterations in insulin secretion in SET group. For this, pancreatic islets of control (CTL) and SET bearing mice were analyzed 14 days after tumor inoculation for determination of the expression of the proinflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β , IFN γ , IFN- α , IL-6 e IL-8, and gene expression of toll-like receptors TLR3, TLR4 and TLR9. In addition, we analyzed histopathological aspects and lymphocyte invasion. Our results showed that SET group exhibited significantly increase in the expression of all cytokines analyzed as well as in the expression of TLR3 and TLR4 mRNAs, but not of TLR9 between the two groups. The histological analysis exhibited infiltrated cells and lipid accumulation in exocrine tissue and lymphocyte CD3 infiltration in islets periphery. Together, these data demonstrates that an inflammatory status exists in pancreatic islets of cachectic SET group which should be in a condition of insulinitis. Further studies may provide a better relation between inflammation and insulin secretion in this experimental model and our group will focus in this on this approach.

Key Words: Cancer; Cachexia; Islets of Langerhans; Inflammation; Insulin secretion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Expressão proteica de IFN- α em ilhotas de camundongos controles e portadores do tumor sólido de Ehrlich.	42
Figura 2 – Expressão proteica de IFN- γ em ilhotas de camundongos controles e portadores do tumor sólido de Ehrlich.	43
Figura 3 – Expressão proteica de IL-1 β em ilhotas de camundongos controles e portadores do tumor sólido de Ehrlich.	44
Figura 4 – Expressão proteica de IL-6 em ilhotas de camundongos controles e portadores do tumor sólido de Ehrlich.	45
Figura 5 – Expressão proteica de IL-8 em ilhotas de camundongos controles e portadores do tumor sólido de Ehrlich.	46
Figura 6 – Expressão proteica de TNF- α em ilhotas de camundongos controles e portadores do tumor sólido de Ehrlich.	47
Figura 7 – Expressão de mRNA total do receptor <i>toll-like</i> 3 em ilhotas de camundongos controles e portadores do tumor sólido de Ehrlich.	48
Figura 8 – Expressão de mRNA total do receptor <i>toll-like</i> 4 em ilhotas de camundongos controles e portadores do tumor sólido de Ehrlich.	49
Figura 9 – Expressão de mRNA total do receptor <i>toll-like</i> 9 em ilhotas de camundongos controles e portadores do tumor sólido de Ehrlich.	49
Figura 10 – Análise histopatológica de tecido pancreático de camundongos controles e portadores do tumor sólido de Ehrlich.	51

Figura 11 – Análise histopatológica de tecido pancreático de camundongos controles e portadores do tumor sólido de Ehrlich.	52
Figura 12 – Análise histopatológica de tecido pancreático de camundongos controles e portadores do tumor sólido de Ehrlich.	53
Figura 13 – Análise imunohistoquímica para marcação de linfócitos CD3 em tecido pancreático de camundongos controles e portadores do tumor sólido de Ehrlich.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sequência de *primers* dos genes-alvo.

.....36

Tabela 2 – Média de valores em unidades arbitrárias da expressão proteica das citocinas analisadas.

.....41

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS: síndrome da imunodeficiência adquirida.

APC^{Min/+}: *Min, Multiple Intestinal Neoplasia*

Bax: proteína X associada à Bcl-2

Bcl-2: *B-cell lymphoma 2*

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar

c-myc: *cellular myelocytomatosis oncogene*

DAB: diaminobenzidina

DEPC: dietilpirocarbonato

DNA: ácido desoxirribonucleico

dNTP: desoxirribonucleico fosfatado

DP5: *death-promoting gene 5*

DTT: ditioneitol

FAS: fatty acid synthase

GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

IFNGR1: receptor de interferon gamma 1

IFN- α : interferon alpha

IFN- γ : interferon gamma

IKK: complexo I κ B quinase

IL-1R: receptor de interleucina 1

IL-1 β : interleucina 1 beta

IL-6: interleucina 6

IL-8: interleucina 8

iNOS: *inducible nitric oxide synthase*

IRF-3: interferon regulatory factor 3

I κ B: proteína inibitória kappa B

JAK/STAT: *janus kinase/signal transducer and activator of transcription*

LIF: fator inibidor de leucemia

LPS: lipopolissacarídeo

MgCl₂: cloreto de magnésio

MHC: complexo principal de histocompatibilidade

mRNA: RNA mensageiro

MyD88: gene de resposta primária de diferenciação mielóide 88

MyoD: antígeno de diferenciação miogênica

NaCl: cloreto de sódio

NFκB: fator nuclear kappa B

PCR: *polymerase chain reaction*

Pdx-1: *pancreatic duodenal homeobox-1*

Ph: potencial hidrogeniônico

PLC: fosfolipase C

PUMA: *p53 upregulated modulator of apoptosis*

RE: retículo endoplasmático

RNA: ácido Ribonucleico

SDS: *sodium dodecyl sulfate*

SNAP-25: *synaptosomal-associated protein 25*

STAT-1: *signal transducer and activator of transcription 1*

STAT-3: *signal transducer and activator of transcription 3*

TAE: tumor ascítico de Ehrlich

TIR: *Toll/ Interleukin-1 receptor domain*

TLRs: receptores do tipo Toll

TNFR: receptor de fator de necrose tumoral

TNF-α: fator de necrose tumoral alpha

TSE: tumor sólido de Ehrlich

UPR: *unfolded protein response*

VAMP-2: *vesicle-associated membrane protein 2*

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	20
1.1- A SÍNDROME CAQUÉTICA	21
1.2- INFLAMAÇÃO E A CAQUEXIA INDUZIDA POR CÂNCER.....	21
1.3- A INFLAMAÇÃO NA CAQUEXIA INDUZIDA POR CÂNCER E O METABOLISMO DE CARBOIDRATOS.....	235
1.4- INFLAMAÇÃO SISTÊMICA, ILHOTAS DE LANGERHANS E SECREÇÃO DE INSULINA.....	27
2- OBJETIVOS	32
OBJETIVO GERAL.....	33
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3-MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4- RESULTADOS	41
5- DISCUSSÃO	57
6- CONCLUSÕES.....	65
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
8- APÊNDICES	79
MANUSCRITO 1	80
MANUSCRITO 2	98
9- ANEXOS	117

1- INTRODUÇÃO

1.1- A SÍNDROME CAQUÉTICA

A manutenção da homeostase energética é, sem dúvida, o aspecto fisiológico mais importante para a garantia de sobrevivência animal. Sob condições normais, a energia absorvida e a energia gasta são precisamente controladas, fornecendo notável estabilidade ao funcionamento da maquinaria corpórea (HART, 1991). Quando do aparecimento de enfermidades, o organismo acaba sacrificando esta homeostase energética para garantir maiores chances de sobrevivência (HART, 1988). Este status fisiológico alterado gera, a princípio, benefícios ao animal na luta contra afecções. No entanto, quando falamos de doenças de caráter crônico, como AIDS e câncer, o desequilíbrio prolongado na homeostase corpórea gera consequências em detrimento ao organismo, como a diminuição da sobrevida. Nas últimas décadas, o conjunto de sintomas envolvidos neste quadro de desequilíbrio metabólico comum a diversas doenças foi agrupado e caracterizado como uma síndrome metabólica denominada caquexia (GROSSBERG; SCARLETT; MARKS, 2010).

A palavra caquexia é oriunda do grego, onde “kakos” significa má e “hexis” que significa estado/condição (TISDALE, 1997) e é uma síndrome associada a doenças de caráter crônico tais como insuficiência cardíaca, doenças renais, AIDS e câncer (ASP et al., 2010). No entanto, uma definição universal para o termo caquexia só aconteceu no final do ano de 2006, quando cientistas de todo o mundo se reuniram para definir as características da síndrome caquética. A definição proposta diz: “Caquexia é uma síndrome metabólica complexa associada a doenças de caráter imunossupressor e caracterizada por perda da massa muscular com ou sem perda de gordura. A característica clínica proeminente em adultos é a perda de peso e em crianças é a falta de crescimento (excluindo doenças endócrinas). Anorexia, inflamação, resistência à insulina e aumento de proteólise estão frequentemente associados” (EVANS et al., 2008).

Mais recentemente, Fearon et al. (2011) definiram a caquexia como sendo uma síndrome multifatorial caracterizada por perda de massa muscular (acompanhada ou não de perda de gordura) que não pode ser totalmente revertida por nutrição convencional e leva a um progressivo comprometimento funcional. Sua patofisiologia é caracterizada por um balanço negativo de proteínas e energia combinados com a variação de ingestão alimentar e desequilíbrio metabólico.

Além desta definição, os mesmos autores dividiram a síndrome em três estágios, quais sejam: pré-caquexia, caquexia e caquexia refratária, sendo que a pré-caquexia corresponderia aos primeiros sintomas da doença, caquexia propriamente dita um estado mais avançado onde

a perda de peso é mais acentuada e, por fim, a caquexia refratária que normalmente acomete pacientes em estados de doenças terminais e não há mais respostas do organismo a terapias.

Entre todos os sintomas que definem a síndrome e seu diagnóstico, a perda de peso é considerada o primeiro sinal de sua manifestação e está frequentemente associada ao aumento do risco de mortalidade (ANKER et al., 2003; EVANS et al., 2010). Diversos fatores estão envolvidos na perda de peso durante a progressão caquética, como a lipólise, perda de massa muscular, anorexia e alterações no metabolismo de carboidratos. A lipólise aparece regularmente em pacientes com caquexia induzida por câncer, por insuficiência cardíaca, ou por doenças renais crônicas (ANKER; COAT, 1998; FEARON; VOSS; HUSTEAD, 2006; KALANTAR-ZADEH; KOPPLE, 2006), enquanto a perda de massa muscular, além de estar associada à perda de peso, também parece apresentar papel importante na evolução da caquexia como maior causadora de fadiga (EVANS; LAMBERT, 2007).

Assim como a lipólise e a proteólise muscular, a anorexia é sintoma frequente na caquexia. Componentes envolvidos no estabelecimento de uma inflamação sistêmica, característica comum de doenças crônicas, são capazes de gerar alterações no controle hipotalâmico, causando muitas vezes mudanças no padrão de ingestão alimentar do indivíduo caquético (TAKAO; HASHIMOTO; DE SOUZA, 1995). Entre os componentes que se destacam, as citocinas apresentam papel chave na interação com neurotransmissores. Citocinas como IL-1 β e TNF- α possuem capacidade de interagir com um neurotransmissor denominado CRH, responsável por promover a inibição do apetite. Estas interações podem resultar em efeitos aditivos, sinérgicos e antagonistas, podendo envolver a modificação de moléculas de transcrição de sinal intracelular (ARGILÉS et al., 2009).

Ademais, o aumento da instabilidade hipotalâmica resulta na inibição da ingestão alimentar (anorexia), que leva o organismo a buscar estoques energéticos provenientes do fígado, gordura e músculos, agravando o desequilíbrio do metabolismo de glicose e dos tecidos adiposo e muscular (GROSSBERG; SCARLETT; MARKS, 2010).

Nesta série coordenada de mecanismos, a inflamação sistêmica parece ser o denominador comum de várias consequências clínicas e metabólicas da caquexia (BALDWIN, 2011). Seu papel no agravamento de sintomas como anorexia, lipólise e proteólise está cada vez mais evidente e, uma vasta gama de trabalhos tem apresentado dados consistentes acerca desta hipótese (DANTZER, 2001; RYDÉN et al., 2004; MELSTROM et al., 2007).

No entanto, tanto o aparecimento quanto o grau dos sintomas da caquexia dependem do tipo de doença à qual a síndrome está associada. AIDS e câncer, por exemplo, apresentam progressão caquética mais rápida e intensa quando comparadas a doenças como insuficiência

cardíaca e renal (MOLFINO; LAVIANO; FANELLI, 2010). No presente estudo, deu-se especial atenção à caquexia induzida por câncer, principalmente no que se refere às alterações no metabolismo de carboidratos e a possível participação da inflamação sistêmica neste processo.

1.2- INFLAMAÇÃO E A CAQUEXIA INDUZIDA POR CÂNCER

A concepção da síndrome caquética no câncer como um estado inflamatório crônico, no qual a reação do hospedeiro à presença do tumor aparece como principal agente causal, tem tomado impulso na última década (LUNDHOLM et al., 2004; MCCARTHY, 2003; FEARON; MOSES, 2002). Classicamente, define-se inflamação como um conjunto de reações biológicas que ocorrem em resposta a condições adversas do organismo, como infecções, injúria, estresse e alterações na função tecidual (MEDZHITOV, 2008).

Marcadores inflamatórios têm sido amplamente usados tanto para o diagnóstico quanto para o prognóstico da evolução da caquexia no câncer. No mais, são crescentes as evidências com estudos em humanos e animais que, adotando estratégias de bloqueio do processo inflamatório, consegue-se atenuar os efeitos da caquexia induzida por câncer (ARGILÉS; BUSQUESTS; LÓPEZ-SORIANO, 2011).

Tan et al. (2011) delinearam um estudo onde foram caracterizados os principais processos nos quais a progressão da inflamação na caquexia no câncer atua diretamente. Entre eles se destacam sua ação no controle central do balanço energético, no controle do metabolismo e função dos tecidos muscular e adiposo, e a modulação do apetite.

O processo inflamatório nos portadores de tumor maligno se inicia a partir da interação local entre células do organismo e células tumorais, os quais subsequentemente eliciam mecanismos sistêmicos que dão início às respostas de fase aguda. Diferentes proteínas de fase aguda, incluindo a proteína C-reativa, são produzidas e liberadas pelo fígado, contribuindo para o agravamento da inflamação sistêmica (DONOHOE; RYAN; REYNOLDS, 2011).

Da mesma forma, uma vasta gama de citocinas pró-inflamatórias é encontrada em altas concentrações no plasma de portadores de neoplasias (ARGILÉS et al., 2009). Não somente na caquexia induzida por câncer, mas também em outras doenças crônicas às quais a síndrome está associada, como insuficiência cardíaca e AIDS, as citocinas têm sido vastamente reconhecidas por sua atuação parácrina e endócrina na progressão da caquexia (BARONZIO, 1999; DEI CAS; MUOIO; ZAVARONI, 2011).

As citocinas mais amplamente estudadas na etiologia da caquexia no câncer são: IL-1 β ,

TNF- α , IL-6 e IFN- γ (ARGILÉS et al., 2009). Define-se citocina como um grupo heterogêneo de pequenos peptídeos solúveis ou glicoproteínas, com efeito pleiotrópico, capazes de produzir crescimento, diferenciação e ativação de células normais (SERUGA et al., 2008) e que exercem funções de caráter pró ou anti-inflamatórias bem como efeito imunossupressor dependendo do microambiente onde se encontra (RAMOS et al., 2004).

Altas concentrações de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α , são encontradas em ratos caquéticos portadores do tumor de Walker 256 (REBECA et al., 2008; YANO et al., 2008). Outro estudo demonstrou que camundongos com supressão do gene Apc (Apc^{Min/+}), o que leva à formação de pólipos intestinais, tiveram acentuado aumento nos níveis de IL-6 circulantes o que ocasionou o aumento da forma fosforilada de STAT-3, um importante fator de transcrição e transdução de sinal. Elevadas taxas de STAT-3 fosforilada levaram à severa perda de massa muscular nestes camundongos além de causar diminuição da sobrevivência (BALTGALVIS et al., 2008).

Melstrom et al. (2007) evidenciaram que níveis elevados de IL-6 em pacientes caquéticos portadores de tumor levaram ao aumento da atividade de uma importante enzima denominada E3 (enzima ligase de ubiquitinas), envolvida na regulação da via proteolítica da ubiquitina-proteassoma, o que ocasionou aumento na proteólise muscular destes pacientes. Além disso, já está bem estabelecido que o aumento dos níveis de TNF- α causa inibição da atividade da lipoproteína lipase bem como estimulação da atividade da lipase hormônio sensível, duas enzimas essenciais para a regulação da lipogênese (LAURENCIKIENE et al., 2007; TISDALE, 2009). Ainda, citocinas como IL-1 β e IFN- γ são capazes de agir no hipotálamo causando aumento da atividade de hormônios envolvidos na inibição do apetite (ARGILÉS; LÓPEZ-SORIANO, 1999).

Concentrações elevadas de IL-1 β em ratos foram capazes de induzir inibição do apetite através de interações desta citocina com os núcleos arqueados do hipotálamo. A parte média destes núcleos apresentam células peptidérgicas que possuem papel importante na estimulação e inibição do apetite. Estas células expressam um receptor específico para IL-1 β denominado IL-1RI. Neste estudo a inibição do apetite foi causada através da ligação da IL-1 β com seu receptor, sugerindo um possível envolvimento da IL-1 β no sistema das melanocortinas (REYES; SAWCHENKO, 2002).

Aliado a isso, um denominador comum regulado pelo aumento da expressão de várias citocinas mencionadas acima é a via do NF κ B, e seu papel no controle da inflamação associada à caquexia no câncer parece estar relacionado principalmente aos danos causados

nos tecidos periféricos e ao sistema nervoso central. Esta via também regula, entre outros processos, o estresse oxidativo das células e a expressão de enzimas responsáveis pela síntese de eicosanoides pró-inflamatórios, ambos descritos como parte dos fatores envolvidos na progressão da síndrome (GUPTA et al., 2011).

Langen, Schols e Kelders (2001) demonstraram que as citocinas IL-6, IL-1 β e TNF- α têm a capacidade de ativar o fator NF- κ B no músculo, o que promove a degeneração muscular através da aceleração da degradação proteica pela via ubiquitina-proteassoma (CAI et al., 2004), bem como impede a regeneração muscular através da diminuição da expressão do fator de transcrição MyoD (GUTTRIDGE et al., 2000). Além disso, o tratamento de explantes musculares com citocinas inflamatórias levou a um desequilíbrio na expressão proteica, o que culminou no aumento do processo catabólico (BARACOS et al., 1983). Ademais, as altas concentrações de citocinas plasmáticas encontradas na caquexia induzida por câncer não advêm somente da resposta imunológica do organismo ao tumor, sendo produzidas também pelas células tumorais (LAVIANO; MEGUID; ROSSI-FANELLI, 2003).

Coletivamente, estes dados suportam a hipótese de que as respostas metabólicas coordenadas que ocorrem na caquexia induzida por câncer provavelmente envolvem os efeitos sinérgicos de uma combinação de citocinas provenientes tanto de células do sistema imune quanto de células tumorais e, são capazes de agir tanto no cérebro quanto nos tecidos periféricos.

Contudo, os estudos envolvendo o papel da inflamação sistêmica na progressão da caquexia no câncer se concentram principalmente na evidência de suas ações em tecidos periféricos, como músculo e gordura, bem como na regulação da ingestão alimentar, não havendo trabalhos que correlacionem o estabelecimento da inflamação com alterações no metabolismo de carboidratos.

Porém, no que concerne ao estudo de doenças como obesidade e *diabetes mellitus*, já está bem estabelecido que um processo inflamatório, em especial a presença de citocinas, causa danos irreversíveis no metabolismo de carboidratos, principalmente por sua ação deletéria ao pâncreas endócrino, através da indução de alterações em sua função, especialmente nas células beta pancreáticas (WANG; GUAN; YANG, 2010).

1.3- A INFLAMAÇÃO NA CAQUEXIA INDUZIDA POR CÂNCER E O METABOLISMO DE CARBOIDRATOS

O desenvolvimento da caquexia no câncer é, talvez, a manifestação mais comum de doenças malignas avançadas. Sua característica no câncer é multifacetada, de etiologia extremamente complexa, diretamente relacionada à redução da sobrevida e a prognóstico adverso (KAZANTZIS; SEELAENDER, 2005).

Aproximadamente 50% do total de pacientes com câncer sofrem de caquexia podendo atingir 80% se considerarmos apenas os pacientes em estágios avançados da doença (FEARON; MOSES, 2002). Além disso, a caquexia é considerada a causa imediata de morte de 22% a 40% de pacientes portadores de tumor maligno (KUMAR et al., 2010).

A perda de peso pode variar de 30% a 80% de incidência entre pacientes com câncer dependendo do tipo de tumor. Pacientes com câncer pancreático ou gástrico apresentam as maiores frequências de perda de peso enquanto aqueles com linfomas do tipo não Hodgkin's, câncer de mama, leucemia aguda não linfocitária e sarcomas têm uma frequência de perda de peso menor (TISDALE, 2009).

Pacientes que desenvolvem caquexia durante o câncer exibem, normalmente, perda da habilidade do organismo de lutar contra infecções e da capacidade de resistir aos tratamentos da doença como a quimioterapia e a radioterapia, levando, na maioria das vezes a um estado de severo enfraquecimento podendo, em alguns casos, levar à morte (TISDALE, 2009).

O principal fator envolvido na progressão da caquexia em doenças de caráter neoplásico é a própria presença tumoral, que pode agir de forma direta no avanço da síndrome, ou indireta pela resposta aberrante do hospedeiro ao tumor.

Diretamente, as células neoplásicas atuam em detrimento à homeostase metabólica principalmente por causarem alterações no metabolismo de carboidratos do hospedeiro. Para seu crescimento e diferenciação, estas células necessitam de alto consumo energético, e por isso utilizam grande parte da glicose plasmática provenientes da ingestão alimentar e, mais tarde, acabam consumindo glicose estocada em tecidos como o fígado e os músculos (MATHUPALA; REMPEL; PEDERSEN, 1995). A hipoglicemia é uma característica comum em portadores de tumor maligno e frequentemente vem acompanhada de alterações no metabolismo hepático de glicose e na secreção de insulina, contribuindo de forma considerável para o avanço da síndrome (TISDALE, 2002).

Porém, dados que esclareçam os reais mecanismos envolvidos no desequilíbrio do metabolismo de glicose associado à progressão da caquexia no câncer ainda são escassos e controversos. Alguns estudos evidenciaram que a progressão tumoral juntamente com evolução caquética levam o organismo a desenvolver resistência à insulina associada a níveis

de insulina plasmática elevados (LUNDHOLM; HOLM; SCHERSTÉN, 1978; ASP et al., 2010; MU et al., 2012).

Por outro lado, outros estudos sugerem que o aumento do volume tumoral associado ao estabelecimento da caquexia gera a condição de hipoinsulinemia. Por exemplo, em ratos Wistar portadores do tumor de Walker 256, níveis de insulina plasmática reduzidos podem ter sido ocasionados pela diminuição observada na capacidade secretória de insulina pelas células beta pancreáticas (EL RAZI NETO et al., 1996). Da mesma forma, ratos Wistar com tumor hepático ascítico Yoshida AH130 apresentaram hipoinsulinemia, e o tratamento com injeções de insulina resultou na diminuição do crescimento tumoral bem como diminuição no avanço da síndrome (COSTELLI et al., 2007). Em estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa, evidenciamos que camundongos caquéticos portadores do TSE secretavam menos insulina quando comparados aos animais controle, além de exibirem maior sensibilidade a este hormônio, maior tolerância à glicose, hipoinsulinemia e hipoglicemia (ver manuscrito 1- apêndice 1).

No entanto, os dados presentes até o momento nada dizem sobre o quanto o consumo de glicose pelas células neoplásicas seria responsável por tais alterações no metabolismo glicêmico. Neste sentido, outros fatores parecem estar envolvidos na evolução da caquexia no câncer, como o estabelecimento de inflamação sistêmica. De maneira indireta, o tumor em desenvolvimento é o grande envolvido na evolução da inflamação sistêmica na caquexia induzida por câncer. Sua presença é reconhecida como um corpo estranho ao organismo, que reage ativando sua maquinaria de defesa composta por células do sistema imune. Em curto prazo, esta reação apresenta efeitos benéficos no controle da evolução tumoral, no entanto, em níveis crônicos, um ambiente “inflamado” pode ser prejudicial ao organismo como um todo (EIZIRIK; COLLI; ORTIS, 2009).

Quanto ao metabolismo de carboidratos, ainda não há dados que indiquem a participação da inflamação sistêmica na alteração de sua homeostasia durante a progressão da síndrome caquética no câncer. Porém, já está bem definido que a inflamação sistêmica, em especial pela presença de citocinas, atua sobre a regulação da atividade de diversos órgãos vitais para a manutenção do equilíbrio metabólico, tendo como possíveis resultados a destruição celular e consequente supressão prolongada da função do órgão, inibição ou estimulação de regeneração tecidual, além de alterações na expressão gênica (TISDALE, 2010).

1.4- INFLAMAÇÃO SISTÊMICA, ILHOTAS DE LANGERHANS E SECREÇÃO DE INSULINA

As ilhotas de Langerhans, especialmente as células beta, apresentam como característica a propriedade de modificar seu estado funcional em resposta adaptativa a ambientes estressores. Como dito anteriormente, em análises feitas em nosso laboratório utilizando camundongos caquéticos portadores do TSE, uma drástica diminuição na secreção de insulina associado a um aumento na sensibilidade periférica a este hormônio e aumento na tolerância à glicose foram observadas (ver manuscrito-apêndice 1). Muito pouco se sabe acerca dos mecanismos causadores das disfunções que acometem as ilhotas pancreáticas em resposta à presença tumoral, no entanto, em outras doenças os estudos encontram-se mais adiantados. Por exemplo, em situações de hiperglicemia crônica encontradas no estabelecimento do *diabetes mellitus* tipo 1, severas mudanças na homeostasia do retículo endoplasmático (RE) são observadas (EIZIRIZ; CARDOZO; CNOP, 2008).

O RE apresenta um ambiente único para o dobramento, montagem, formação de pontes dissulfeto e glicosilação de proteínas. Em células secretoras, como a célula beta, elevadas taxas de síntese proteica no RE são evidenciadas. A síntese de pró-insulina, que ocorre no RE, é aumentada várias vezes por estímulo crônico como a hiperglicemia. Este aumento na demanda de síntese proteica para formação de pró-insulina ativa no RE um mecanismo denominado *Unfolded Protein Response* (UPR), que atua como um mecanismo de segurança garantindo que a síntese de grande quantidade de proteínas não seja realizada à custa do prejuízo da qualidade (FONSECA et al., 2009). Simplificadamente, o mecanismo UPR apresenta como propósito inicial adaptar o RE às alterações ambientais e manter sua função normal. Quando os esforços em favor da manutenção da função normal da célula entram em exaustão, o estresse do RE é capaz de ativar fatores de transcrição como o NFκB que induzem a apoptose celular, a fim de descartar células com disfunção irreversível (EIZIRIK; MIANI; CARDOZO, 2012).

Nos últimos anos, a inflamação sistêmica, que é característica invariável de portadores de tumor maligno, também foi reconhecida como um fator causador de exaustão no mecanismo de UPR no RE das células beta pancreáticas (CARDOZO et al., 2005; EIZIRIZ; CARDOZO; CNOP, 2008). Estudos demonstraram que a indução da apoptose de células beta causada pelos altos níveis de citocinas circulantes, está diretamente relacionada ao estresse funcional que as mesmas causam no RE. Citocinas como a IL-1β e IFN-γ aumentam os níveis de óxido nítrico no RE causando diminuição nas concentrações de cálcio e inibição da síntese de proteínas chaperonas, o que dificulta os mecanismos de defesa da célula beta e amplifica as vias pró-apoptóticas (EIZIRIZ; CARDOZO; CNOP, 2008).

Mais que isso, nas últimas décadas, um grande número de dados experimentais consistentes indicam que níveis de citocinas elevados atuam na alteração da função das células beta não somente através de ações no RE, mas também por serem capazes de regular uma variedade enorme de genes envolvidos na homeostase funcional destas células (SANDLER et al., 1994; EIRIZIK; MANDRUP-POULSEN, 2001).

Além disso, citocinas em altas concentrações oriundas de células do sistema imune, como macrófagos e linfócitos infiltrados nas ilhotas pancreáticas, são capazes de estimulá-las a produzirem mais citocinas, levando à intensificação dos seus efeitos sobre a atividade celular (WANG; GUAN; YANG, 2010). No entanto, a produção de citocinas pelas células beta não é necessariamente dependente da estimulação ocasionada pela presença de citocinas provenientes de outras células, uma vez que as próprias células beta podem desencadear reações inflamatórias com função de reparo e adaptação em resposta a situações específicas, como o estresse metabólico gerado por doenças crônicas como diabetes e obesidade (ANDERSSON; FLODSTROM; SANDLER, 2001). Esta capacidade de produzir citocinas em resposta a alterações na homeostase local apresenta efeitos inicialmente benéficos para as células beta, mas quando se trata de situações de estresse crônico, uma reação prolongada pode ocasionar efeitos maléficos, como a indução da apoptose celular (DONATH et al., 2010).

As principais citocinas envolvidas na indução de apoptose nas células beta são IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , por serem capazes de desencadear mecanismos apoptóticos isoladamente ou em sinergismo, gerando consequências detrimenais a estas células, como a diminuição da secreção de insulina (EIZIRIK; MANDRUP-POULSEN, 2001).

Fisiologicamente, os mecanismos através dos quais estas citocinas provocam apoptose celular envolvem principalmente a ativação de fatores de transcrição que atuam no núcleo das células beta, regulando a expressão gênica (GURZOV; EIZIRIK, 2011). Citocinas como IL-1 β e TNF- α agem através de mecanismos semelhantes. Resumidamente, ambas as citocinas, após se ligarem ao seu receptor específico de membrana (IL-1R e TNFR, respectivamente), fosforilam um complexo com atividade quinase denominado complexo IKK. Este, por sua vez, fosforila uma proteína denominada I κ B que se encontra ligada ao fator de transcrição NF κ B. Enquanto ligados, o NF κ B permanece inativo no citossol das células beta, mas quando a I κ B é fosforilada pelo complexo IKK esta ligação se desfaz, permitindo a ativação do NF κ B. Uma vez livre no citossol, o NF κ B pode agora migrar para o núcleo celular e regular a expressão de genes apoptóticos como Bax, Fas, c-myc e iNOS (ORTIS et al., 2012).

Já o IFN- γ , ao se ligar ao seu receptor (IFNGR1), induz a fosforilação de outras quinases, denominadas Janus quinase 1 e 2, que por sua vez induzem a ativação de NF κ B, além de também induzirem a ativação de um fator de transcrição denominado STAT-1, que regula a expressão de outros genes envolvidos no mecanismo apoptótico como o Bcl-2, Pdx1 e MafA (WANG; GUAN; YANG, 2010).

Aliado a isso, apesar de uma citocina conseguir, isoladamente, alterar a função das células beta, muitos estudos apontam que uma combinação de citocinas exibe efeitos deletérios ainda maiores sobre estas células. Pirot, Eizirik e Cardoso (2006) demonstraram que o IFN- γ aumenta a expressão de genes envolvidos na indução de estresse de RE em cultura de células beta quando combinado a IL-1 β . Outro estudo recente demonstrou que os níveis de apoptose celular pela via JAK/STAT causados pelo IFN- γ adicionado à cultura de células beta, foi maior quando em combinação com o TNF- α , mesmo o TNF- α não possuindo capacidade de ativar sozinho a via JAK/STAT (BARTHSON et al., 2011). Kim et al. (2005) demonstraram que IFN- γ e TNF- α quando adicionados em conjunto à cultura de células beta de ratos, conseguem ativar uma importante via apoptótica denominada via p53/p21, o que não acontece se estas citocinas forem adicionadas à cultura separadamente.

Inserido neste contexto, outros candidatos envolvidos na progressão da resposta inflamatória da ilhota pancreática são os receptores *toll-like* (TLRs). Estes receptores têm a capacidade de reconhecer microorganismos patogênicos e, em resposta ativam uma via de sinalização intracelular que resulta na indução da resposta imune inata através da produção de citocinas e ativação de células como macrófagos e células dendríticas (TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003). As ilhotas pancreáticas são capazes de expressar receptores *toll-like*, tais como TLR2, TLR3, TLR4, e TLR9, sendo TLR3 e TLR4 expressos em altos níveis. Em ilhotas humanas que foram expostas a interferons como o IFN- α e IFN- γ e também a interleucinas como a IL1- β , tiveram aumento na expressão destes receptores (HULTCRANTZ et al., 2007). A alta expressão do TLR3, por exemplo, pode levar a apoptose das células β além de aumentar a produção de citocinas, pelo menos em parte, através da ativação dos fatores de transcrição NF κ B e IRF-3. A ativação destes fatores é seguida também pelo aumento da produção de IFN- α e IFN- β , o que leva ao aumento da expressão de MHC de classe I e liberação de quimiocinas (MAKKOUK; ABDELNOOR, 2009).

Estes dados indicam que o estabelecimento de uma inflamação sistêmica pode levar a um prejuízo funcional à ilhota pancreática, especialmente por ativação da apoptose, através de uma cascata de eventos ativadas principalmente pelo aumento nas concentrações de citocinas

circulantes. Adicionalmente, os dados discutidos em tópicos anteriores acerca do papel da inflamação sistêmica na progressão da disfunção de outros tecidos na caquexia induzida por câncer, associados à carência de estudos que caracterizem o status inflamatório do tecido pancreático em modelos tumorais e, diante da importância que a homeostase glicêmica desempenha no controle da progressão caquética, neste trabalho procuramos investigar o status inflamatório das ilhotas de Langerhans em nosso modelo tumoral.

Desta forma, nesta dissertação de mestrado, procuramos por evidências que caracterizassem o padrão inflamatório em que o tecido pancreático se encontra neste modelo de caquexia induzida por câncer e, em particular as ilhotas de Langerhans devido à drástica alteração na capacidade secretória de insulina apresentada por estes animais.

2- OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Caracterizar o status inflamatório presente em ilhotas de Langerhans de camundongos caquéticos portadores do tumor sólido de Ehrlich buscando dados que correlacionem este status com a baixa secreção de insulina apresentada por estes animais.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, $\text{IFN}\gamma$, $\text{IFN-}\alpha$, IL-6 e IL-8 , gerados pela presença tumoral e que também apresentam importante papel nos processos inflamatórios de ilhotas pancreáticas.
- Avaliar a expressão gênica dos receptores *toll-like*, também envolvidos com o estabelecimento da inflamação nas ilhotas de Langerhans.
- Análise histopatológica do tecido pancreático com marcação de infiltrados celulares inflamatórios.

3-MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Swiss (45 dias de idade) pesando em torno de 30 gramas, provenientes do Biotério Central da UNESP – Botucatu. Durante a fase experimental, os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Fisiologia do Pâncreas Endócrino da UNESP – Bauru, recebendo ração balanceada e água *ad-libitum*, em temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas. Os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA), da Faculdade de Odontologia da UNESP, campus de Araçatuba.

Grupos experimentais: Cerca de 40 animais foram distribuídos ao acaso em 2 grupos, sendo estes:

1. Grupo controle (CTL): Animais que receberam injeção subcutânea de salina e foram sacrificados aos 14 dias.

2. Grupo TS14D: Animais que receberam implante tumoral e foram sacrificados aos 14 dias.

3.2- TUMOR

Para obtenção do tumor sólido, foram utilizadas células tumorais obtidas a partir de tumor ascítico de Ehrlich (TAE) com 7 dias de evolução.

3.3- DETERMINAÇÃO DO NÚMERO E VIABILIDADE DAS CÉLULAS TUMORAIS

O número total de células foi determinado mediante contagem em microscópio óptico de campo claro, com auxílio de câmara de Neubauer. O teste de exclusão do Azul de Tripán determina a viabilidade das células tumorais. Alíquotas de 10 μl do fluido ascítico foram diluídas dez vezes em solução de salina tamponada. Após feita esta diluição, foram retirado 50 μl desta, e acrescentados a 50 μl de Azul Tripán (0,2%), e 10 μl desta mistura tiveram as células contadas em câmara de Neubauer. Foram consideradas vivas as células que excluíram o corante. Somente as suspensões celulares com viabilidade superior a 90% foram utilizadas em nossos protocolos experimentais.

3.4- TUMOR DE EHRLICH

A suspensão obtida a partir do TAE foi centrifugada, as células lavadas três vezes em salina tamponada e ressuspensas com o volume necessário. Após a assepsia com álcool 70%, os animais receberam 1×10^7 células tumorais/0,1ml por via subcutânea (sc).

3.5- ISOLAMENTO DAS ILHOTAS PANCREÁTICAS

Os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ seguido por decapitação. A excisão do pâncreas e o isolamento de suas ilhotas foram realizados de acordo com Lacy & Kostianovski, 1967. Em resumo, após laparotomia, foi injetada solução contendo collagenase (solução de Hank's contendo 8mg de collagenase) por animal, pelo ducto biliar, que atingiu o pâncreas por fluxo contrário via ductos pancreáticos. O pâncreas foi então incubado a 37°C durante 12 minutos, com posterior agitação manual e lavagens. As ilhotas, então livres do tecido acinoso, foram coletadas sob lupa (Carlzeiss-Jena Citoval2) por aspiração, com auxílio de pipeta Pasteur estirada e siliconizada.

3.6- EXPRESSÃO PROTÉICA DE TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IFN- α , IL-6 E IL-8 POR WESTERN BLOTTING

Cerca de 1800 ilhotas foram coletadas para cada grupo analisado. As ilhotas foram homogeneizadas em coquetel anti-protease com 1% de SDS (Cell Signal) a 4°C e o conteúdo total foi armazenado em freezer a -80°C. Foram determinadas as concentrações de proteínas pelo método de Bradford (Bio-Rad). Alíquotas entre 50-100 μ g de proteína total foram fervidas a 100°C por 5 minutos em 30% do volume em tampão Laemmli (Na₂SO₄ 1M pH 7,0, 10% SDS, 10% mercaptoetanol, 50% glicerol, 0,1% azul de bromofenol). As amostras foram fracionadas no sistema de eletroforese (Mini Protean II – Bio-Rad) em gel de poliacrilamida 10 a 12% (dependendo do peso molecular da proteína). A corrida iniciou-se com a aplicação de 80 Volts (gel de empacotamento) seguida de 120 Volts (gel de resolução). Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) na presença de 20% metanol e 0,02% SDS em voltagem constante de 120 Volts. Depois de testada a eficiência de transferência na membrana com Pounceau S (Sigma) a membrana foi então saturada com solução bloqueadora contendo leite desnatado a 5% em solução basal (10mM Trisma base, 150mM NaCl, 0,05% Tween 20) por 2 horas em temperatura ambiente

(TA). Em seguida a membrana foi lavada por 3x de 10 minutos em solução basal em TA. As proteínas foram detectadas na membrana após incubação “overnight” a 4°C com anticorpo primário específico em solução basal contendo albumina 3%, seguida de lavagem e incubação por 1h30min com anticorpo secundário conjugado com peroxidase-HRP em solução basal contendo leite desnatado 1% em TA. As membranas foram lavadas e incubadas em sala escura com substrato luminol quimioluminescente (Pierce WestPico Super Signal) por 1-7 min e expostas ao filme autoradiográfico (Kodak T-Mat G/RA). A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria e avaliada pelo software Scion Corporation.

3.7- RT-PCR EM TEMPO REAL

3.7.1- Extração de RNA total para detecção da expressão de receptores do tipo toll 3, 4 e 9.

Para a extração de RNA total de ilhotas foi utilizado o reagente Trizol (Invitrogen, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, o tecido foi inicialmente rompido com sonificador e homogeneizado com o regeente Trizol até completa solubilização. Em seguida a mistura foi incubada por 5 minutos em temperatura ambiente, acrescida de 0,2 mL de clorofórmio por mL de Trizol para desproteinização. O sobrenadante foi separado por centrifugação (12.000 x g, 15 min, 4°C), e o RNA contido na fase aquosa foi precipitado com isopropanol, lavado com etanol 75% e 100%, e dissolvido com H₂O deionizada previamente tratada com DEPC. O RNA obtido foi quantificado por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm (*GeneQuant*, Pharmacia Biotech). A integridade do RNA obtido foi verificada através de eletroforese em gel de agarose desnaturante a 1,2%, corado com brometo de etídeo.

3.7.2- Obtenção de cDNA a partir de RNA total

A reação da transcriptase reversa foi realizada em termociclador às temperaturas específicas, em 20 µL de uma mistura contendo 2,0 µg de RNA total, 10mM de dNTP mix, 40 U/µL de inibidor de RNase, 0,1M de DTT, 5X first-strand buffer, 0,5 µg/mL de oligo dT e 200 U da enzima Super Script II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen - Life Technologies).

3.7.3- Primers para a reação de pcr em tempo real (qRT-PCR)

A tabela 1 mostra os pares de *primers* dos genes transcritos para os receptores *toll-like* 3, 4, 9 e GAPDH. Os *primers* foram desenhados com o auxílio do programa Vector[®], seguindo o padrão de tamanho de fragmento máximo e mínimo para qRT-PCR. As amostras alvo (receptores *toll-like*) e o gene constitutivo (GAPDH) foram amplificados e quantificados com auxílio dos *primers* citados, com sistema SYBR Green[®] em aparelho de PCR em tempo real StepOnePlus RT-PCR[®]. Por ser um gene constitutivo, o GAPDH foi usado como gene de expressão comparativo.

Tabela 1. Sequência de *primers* dos genes-alvo

PRIMERS	SEQUÊNCIA
Receptor <i>toll-like</i> 3	F-GTTCCACAAGAGCCGGAAGGTT/R-AGATGATGCCAGAGCGGTGC
Receptor <i>toll-like</i> 4	F-ACGCAGCGCCCAAACCTCTCC/R-GGCCAGGCAGCCAATCTCGG
Receptor <i>toll-like</i> 9	F-ACGCAGCGCCCAAACCTCTCC/R-GGCCAGGCAGCCAATCTCGG
GADPH	F-TCGTGCGTGACATTAAGGAG/R-GCAGCTCGTACGACTTTTCC

3.7.4- Reação de PCR quantitativa em tempo real

A qRT-PCR foi realizada de acordo com Calegari et al. (2012) com modificações. O mix para cada reação foi composto por 5µM de cada *primer*, 5 mM de dNTPs, tampão 10x, 50mM de MgCl₂, 1x de SYBR Green[®], 5U/µL de Taq polimerase para completar o volume final de 10µL. Para completar o volume da reação de qRT-PCR foi inserido em cada poço da placa de 96 poços um volume de 10µL de cada cDNA da diluição de 1:30.

Em seguida, a placa contendo o mix e as amostras de cDNA foi submetida ao equipamento *StepOnePlus* RT-PCR[®] (Applied Biosystems). As condições utilizadas para a amplificação dos *primers* foram: Desnaturação inicial por 7 minutos a 95°C por 20 segundos, hidridação a 60°C por 20 segundos, elongação a 72°C por 25 segundos, momento em que foi realizada a leitura da fluorescência. Estes ciclos foram repetidos por 40 vezes. Em seguida foi realizada a leitura da curva de melting com desnaturação a 95°C por 15 segundos. O anelamento dos primers ocorreu a 60°C por 1 minuto, e a extensão a 95°C por 15 segundos.

A partir do programa do termociclador *StepOnePlus* os resultados fornecidos foram analisados pelo método $\Delta\Delta C^T$ que permitiram observar as alterações na expressão gênica das

amostras de cDNA de ilhotas pancreáticas do grupo TSE14D em relação ao grupo CTL, determinando assim o nível de expressão de cada gene estudado.

3.8- ANÁLISE HISTOLÓGICA

3.8.1- Processamento tecidual e análise da estrutura geral.

Retirou-se o pâncreas inteiro de camundongos controles e portadores do TSE e posteriormente fixados em paraformaldeído a 4% dissolvido em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,2, por 48 horas. Após a fixação, o material foi lavado em água corrente, desidratado em série crescente de etanóis, diafanizado em xilol e incluído em Paraplast. Cortes de 5µm foram produzidos em micrótomo rotativo, coletados em lâminas silanizadas e armazenados até o momento de uso.

As lâminas foram coradas pela hematoxilina-eosina, para a obtenção da análise geral da estrutura do pâncreas e das ilhotas. Os cortes foram observados em luz normal e fotomicrografados em microscópio Leica DMLB.

A análise de acúmulo lipídico no tecido pancreático foi feita comparativamente por presença e ausência e os grau de steatose foi confirmado de acordo com Brunt et al. (1999). Durante o processamento tecidual, o conteúdo lipídico é degradado pelo xilol, deixando lacunas características de células adiposas quando coradas com hematoxilina-eosina, o que proporcionou a análise do conteúdo lipídico destas lâminas sem a necessidade de marcação específica.

Todos os fatores analisados comparativamente pela coloração com hematoxilina-eosina seguiram o seguinte protocolo experimental: foram analisadas 10 lâminas de animais distintos de cada grupo e, de cada lâmina, foram escolhidas 5 áreas para comparação de presença de ausência de infiltrado celular bem como presença e ausência de ilhotas com edema e deformações.

3.8.2- Imunohistoquímica para detecção da infiltração de linfócitos

Para as análises imunohistoquímicas retirou-se o pâncreas inteiro de camundongos controles e portadores do TSE. *Recuperação Antigênica*: em tampão citrato (PH 6,0), no microondas, 2 ciclos, 3 minutos cada. *Bloqueio da Atividade da Peroxidase Endógena*: em PBS por 3 vezes de 5 minutos e, em seguida, 30 minutos em solução de H₂O₂ a 3% diluído

em água destilada. *Bloqueio dos sítios de ligação não-específico*: em PBS por 5 minutos e incubação em câmara úmida e escura com 3% de soro bovino fetal (BSA) por 1 hora. *Incubação com anticorpo primário anti-CD3*(BSB5141): 4°C, overnight e diluição de 1:100 em PBS com 3% de soro bovino fetal (BSA). *Incubação do anticorpo secundário + complexo avidina-biotina peroxidase*: o complexo antígeno-anticorpo foi detectado por um anticorpo secundário conjugado à biotina após 3 horas em câmara úmida e diluição de 1:200 em PBS com 3% de soro bovino fetal (BSA). *Revelação da Imunorreatividade – Cromogênio DAB (3,3 diaminobenzidina)*: foram diluídos 5mg de DAB em 7,5ml de água destilada, 2,5ml de tampão fosfato em 100 ml e 10µl de água oxigenada (3%). As lâminas foram mergulhadas na solução do Cromogênio-DAB por aproximadamente 2 minutos ou até a visualização macroscópica da cor marrom-dourada. *Contra-coloração*: hematoxilina, por 1 minuto. As documentações fotográficas foram feitas no Analisador de Imagens Olympus BX60 (Hamburg, Germany) com o programa Image-Pro-Plus da Media Cybernetics.

A análise comparativa foi feita por meio de presença e ausência de marcações para CD3 nas lâminas de animais CTL e portadores do TSE. Foram analisadas 10 lâminas correspondentes a 10 animais de cada grupo e foram observadas pelo menos 5 campos de área distintos com presença de ilhotas em microscópio óptico Leica DMLB.

3.9- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como Média $\pm$ Erro Padrão da Média (EPM). Para comparação de resultados paramétricos foi utilizado teste t-student. O nível de significância adotado foi $P < 0,05$.

4- RESULTADOS

4.1- ANIMAIS PORTADORES DO TUMOR SÓLIDO DE EHRLICH APRESENTARAM AUMENTO NA EXPRESSÃO PROTÉICA DE CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS.

Camundongos portadores do tumor sólido de Ehrlich com 14 dias de evolução tumoral (TSE14D) apresentaram aumento significativo ($P < 0,05$) na expressão de citocinas pró-inflamatórias em ilhotas de Langerhans quando comparados ao grupo controle (CTL) (tabela 1). Foram analisadas importantes citocinas inflamatórias, entre elas IFN- α (figura 1), IFN- γ (figura 2), IL-1 β (figura 3), IL-6 (figura 4), IL-8 (figura 5) e TNF- α (figura 6).

A expressão de citocinas como IL-6 e IFN- α apresentaram aumento extremamente significativo ($P < 0,0001$), 121% e 80% mais elevadas, respectivamente, quando comparadas ao grupo CTL. Na sequência aparecem as citocinas IL-1 β e IL-8, IFN- γ e TNF- α , com 61%, 60%, 41% e 30% de aumento respectivamente.

As citocinas analisadas neste estudo foram escolhidas por participarem do conjunto de fatores que caracterizam uma ilhota pancreática inflamada (insulite). O severo aumento de 121% e 80% nas concentrações de IL-6 e IFN- α respectivamente, juntamente com os valores encontrados para o restante das citocinas representam forte indício do estabelecimento de um ambiente inflamado.

Ademais, algumas delas como IL-6, IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , também estão altamente envolvidas com a progressão da caquexia induzida por câncer. Neste sentido, o aumento de 121% nas concentrações de IL-6 apresenta-se como um resultado relevante dado seu papel chave no avanço da síndrome. Os valores encontrados para IL-1 β , IFN- γ e TNF- α também se encaixam nesta linha de análise.

No entanto, estes dados não nos permitem inferir acerca da origem das citocinas. Apesar de termos verificado infiltrados linfocitários no tecido pancreático de portadores do TSE (resultados analisados adiante), não podemos apontar se as citocinas são provenientes dos infiltrados, ou se foram produzidas pela própria ilhota pancreática.

Tabela 2- Expressão de citocinas pró-inflamatórias em ilhotas de Langerhans de camundongos controles (CTL) e portadores do TSE (TSE14D).

CITOCINAS	CTL	TSE14D
IL-8	4856±703	7792±661*
IL-6	3332±742	7382±1239*
IFN-γ	5427±219	7699±371*
IFN-α	3749±628	6752±672*
TNF-α	5486±430	7078±372*
IL-1β	3250±336	5256±378*

Valores em unidades arbitrárias (u.a), normalizados pelo controle interno e representando média±erro padrão da média. * Diferença significativa vs. CTL (P<0,05, N=4)

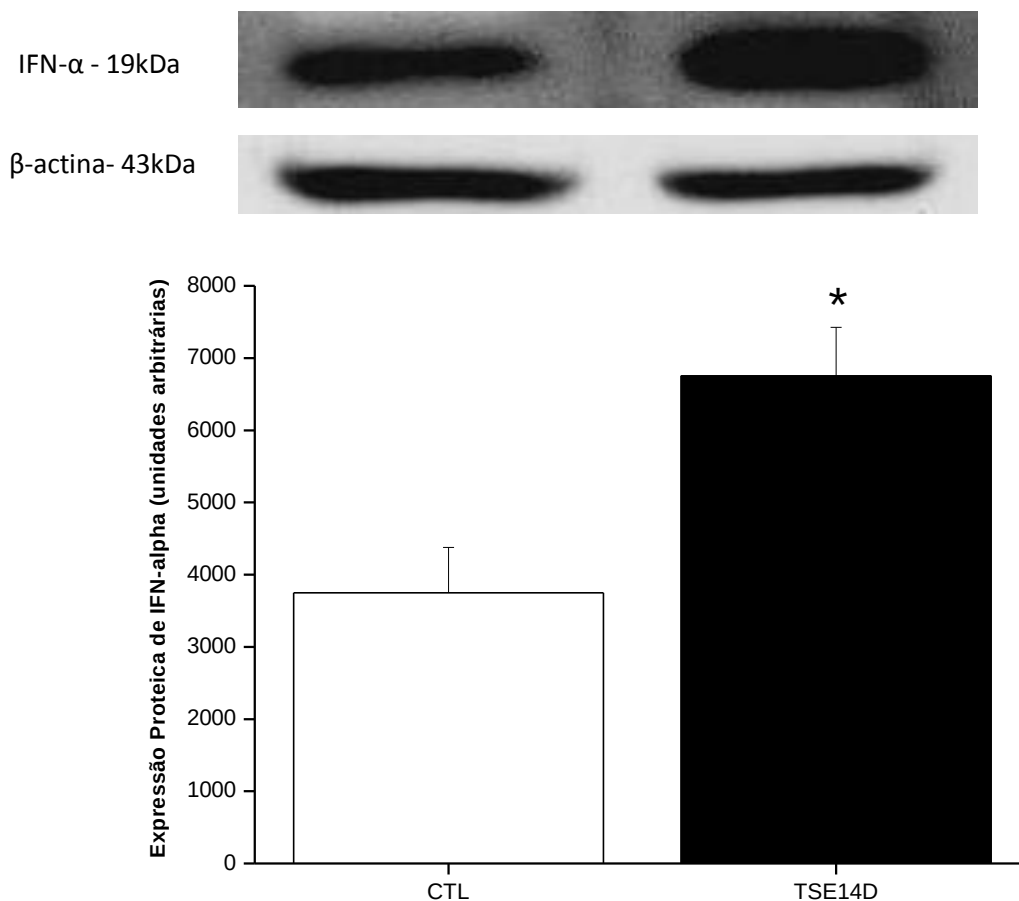


Figura 1. Expressão proteica de IFN- α . Animais portadores do TSE apresentaram aumento de 80% quando comparados ao grupo CTL. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os valores estão representados em unidades arbitrárias e foram normalizados pela proteína constitutiva β -actina. *Diferença significativa vs CTL, N=4, teste *t-student* ($p<0,0001$).

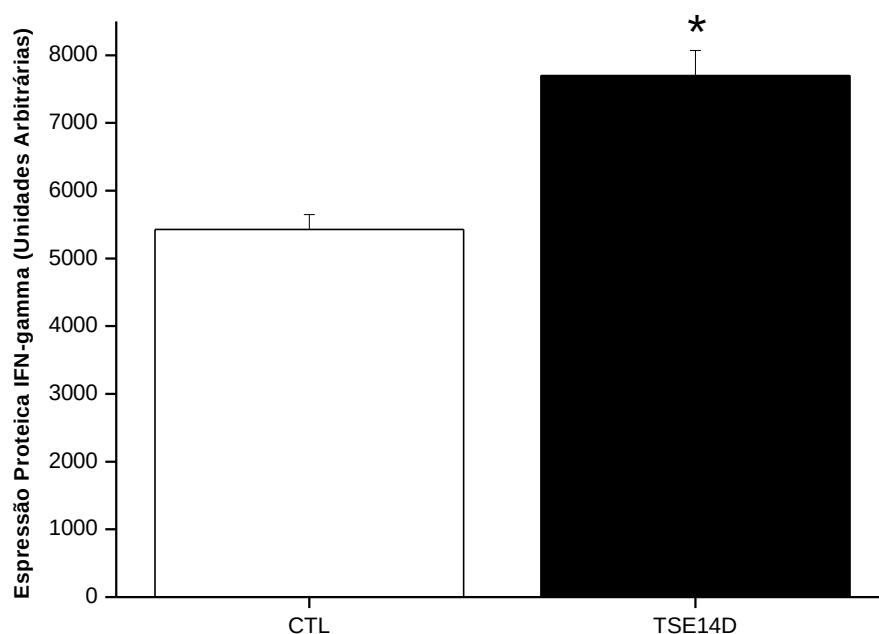
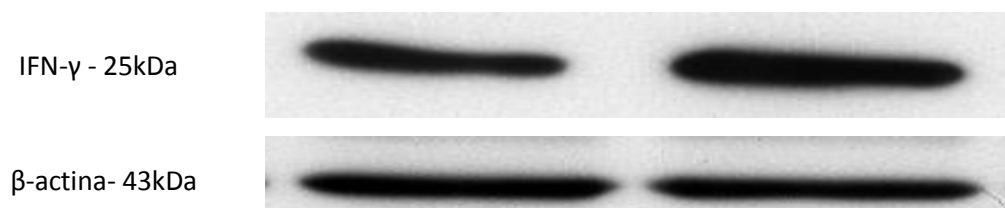


Figura 2. Expressão proteica de IFN- γ . Animais portadores do TSE apresentaram aumento de 41% quando comparados ao grupo CTL. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os valores estão representados em unidades arbitrárias e foram normalizados pela proteína constitutiva β -actina. *Diferença significativa vs CTL, N=4, teste *t-student* ($p<0,05$).

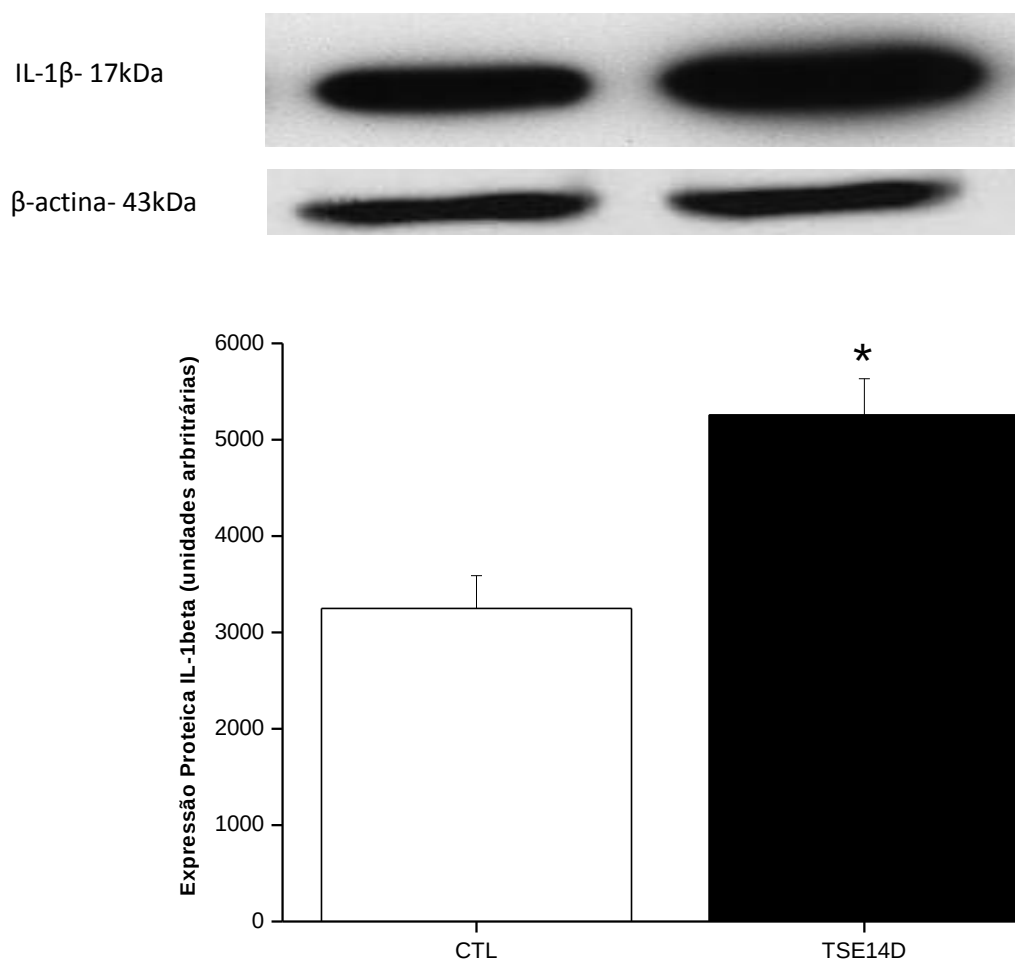


Figura 3. Expressão proteica de IL-1 β . Animais portadores do TSE apresentaram aumento de 61% quando comparados ao grupo CTL. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os valores estão representados em unidades arbitrárias e foram normalizados pela proteína constitutiva β -actina. *Diferença significativa vs CTL, N=4, teste *t-student* ($p<0,05$).

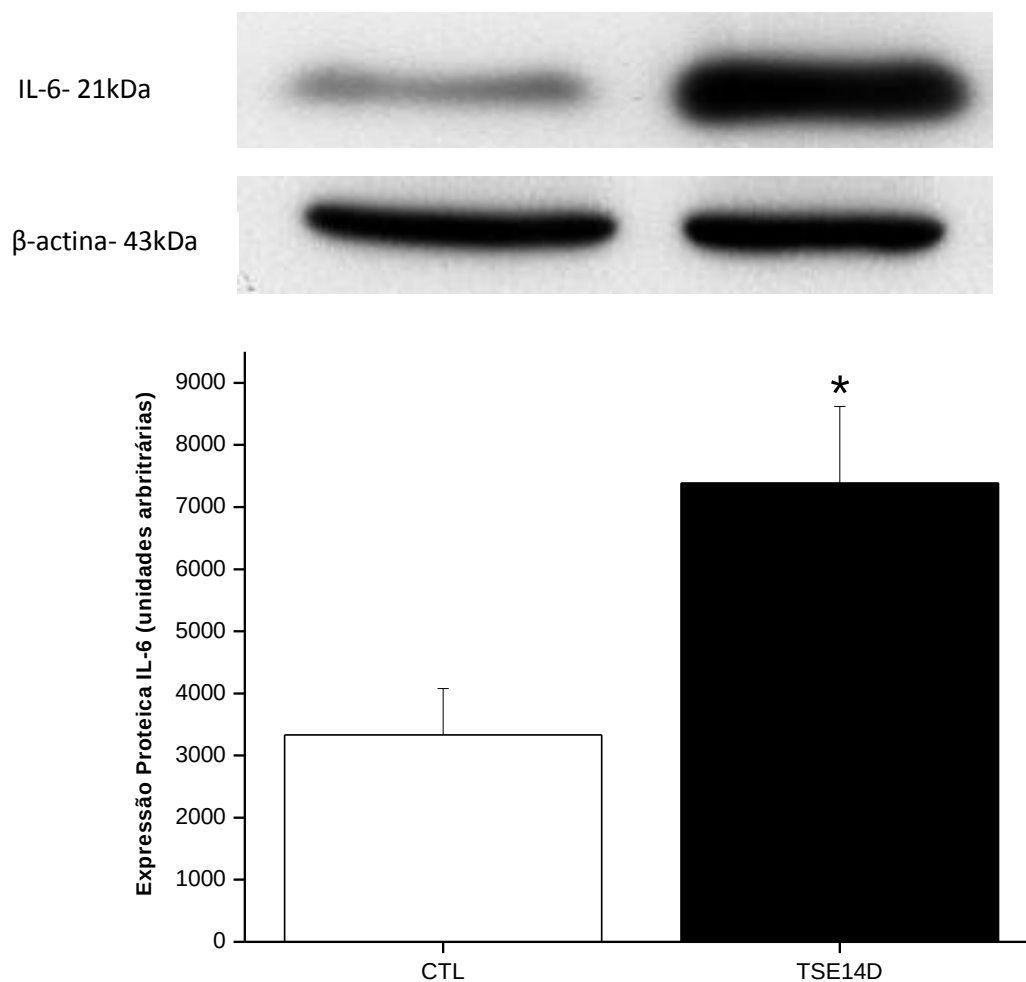


Figura 4. Expressão proteica de IL-6. Animais portadores do TSE apresentaram aumento de 121% quando comparados ao grupo CTL. Os resultados foram expressos como média±erro padrão da média. Os valores estão representados em unidades arbitrárias e foram normalizados pela proteína constitutiva β-actina. *Diferença significativa vs CTL, N=4, teste *t-student* ($p<0,0001$).

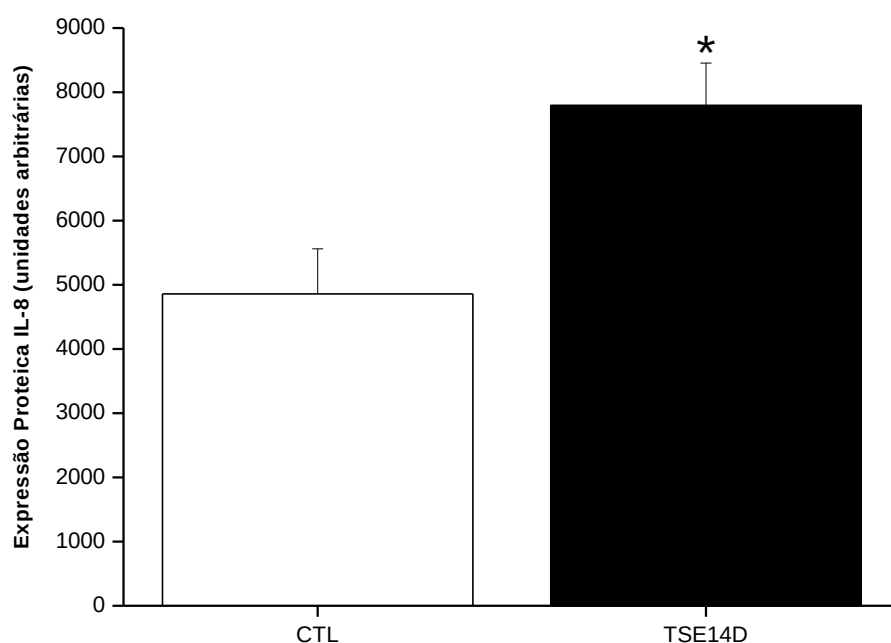
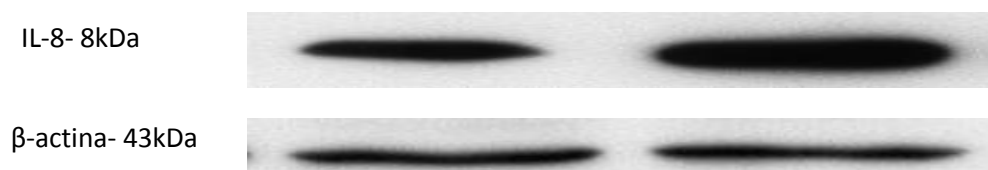


Figura 5. Expressão proteica de IL-8. Animais portadores do TSE apresentaram aumento de 60% quando comparados ao grupo CTL. Os resultados foram expressos como média±erro padrão da média. Os valores estão representados em unidades arbitrárias e foram normalizados pela proteína constitutiva β-actina. *Diferença significativa vs CTL, N=4, teste *t-student* ($p<0,05$).

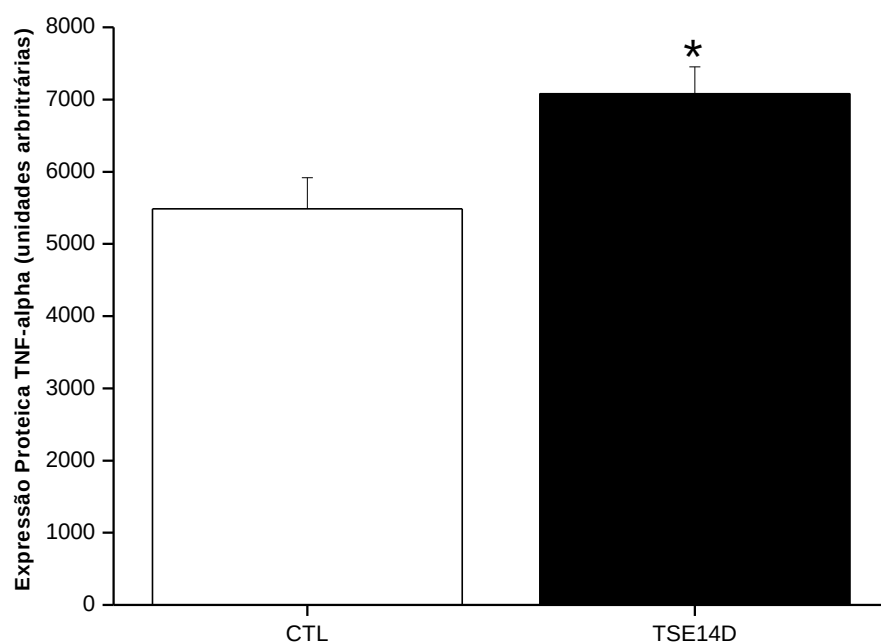
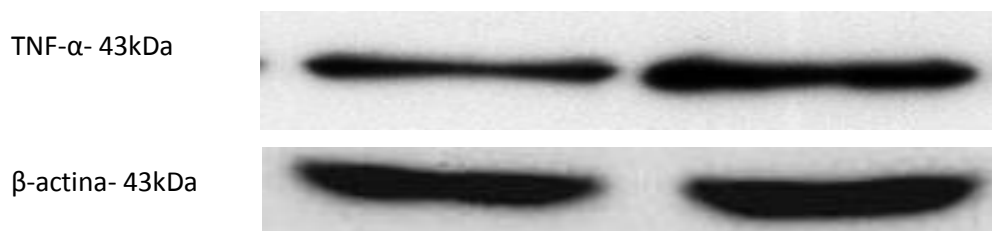


Figura 6. Expressão proteica de TNF- α . Animais portadores do TSE apresentaram aumento de 30% quando comparados ao grupo CTL. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os valores estão representados em unidades arbitrárias e foram normalizados pela proteína constitutiva β -actina. *Diferença significativa vs CTL, N=4, teste *t-student* ($p < 0,05$).

4.2- ANIMAIS PORTADORES DO TUMOR SÓLIDO DE EHRLICH APRESENTARAM AUMENTO NA EXPRESSÃO DE mRNA TOTAL DE RECEPTORES *TOLL-LIKE*.

Assim como as citocinas anteriormente descritas, a análise dos receptores *Toll-like* é de fundamental importância para a caracterização do status inflamatório apresentado pelas ilhotas pancreáticas. Analisamos a expressão de mRNA total dos receptores 3, 4 e 9, os três principais receptores envolvidos nesta situação.

Os resultados revelaram que camundongos portadores do TSE exibiram aumento significativo ($P < 0,05$) na expressão de mRNA total dos receptores toll like 3 (figura 7) e 4 (figura 8) em ilhotas de Langerhans quando comparados ao grupo controle (CTL). A porcentagem de aumento foi de 49% para o receptor *Toll-like* 3 e de 51% para o receptor *Toll-like* 4. Já a expressão de mRNA do receptor *Toll-like* 9 (figura 9) no mesmo tecido não apresentou diferença estatística entre os grupos. Os valores nos gráficos estão representados em porcentagem de ciclos.

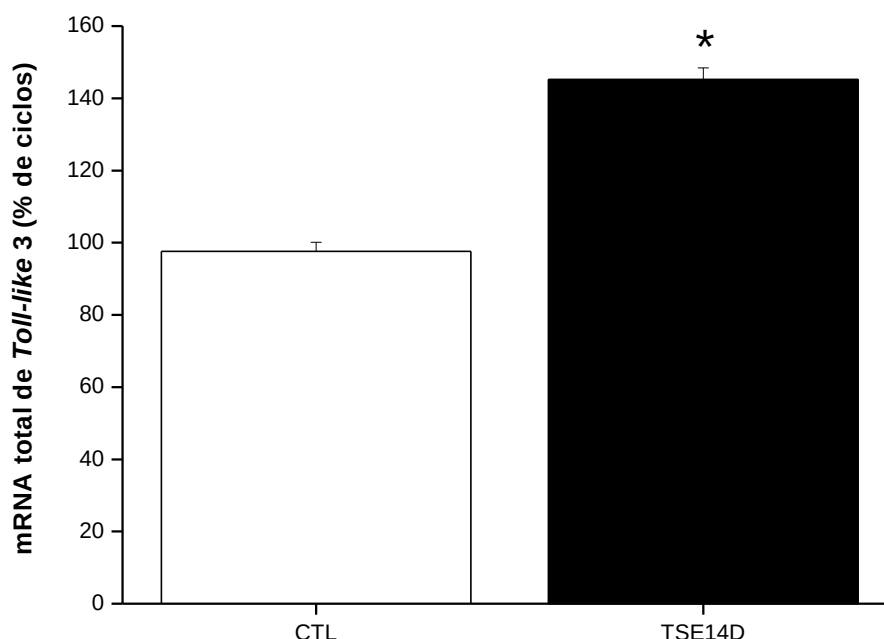


Figura 7. Expressão de mRNA total do receptor *Toll-like* 3 em ilhotas de camundongos controles (CTL) e portadores do TSE (TSE14D). Animais com 14 dias de evolução tumoral apresentaram aumento significativo na expressão do receptor quando comparados ao grupo controle (CTL). * Diferença significativa vs CTL. $p < 0,05$, $n=4$. Teste *t-student*. GAPDH foi utilizado como gene constitutivo para a normalização dos resultados.

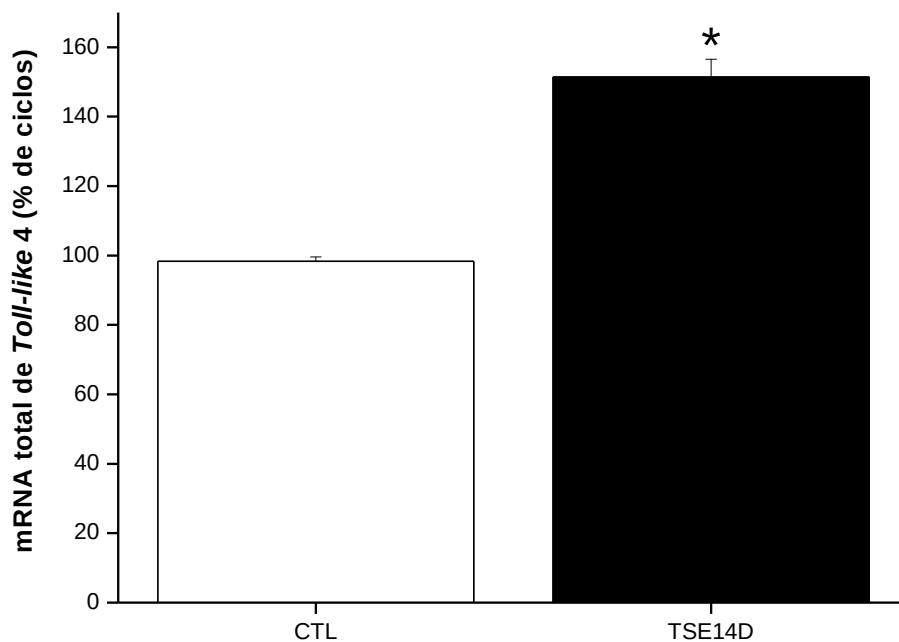


Figura 8. Expressão de mRNA total do receptor *Toll-like* 4 em ilhotas de camundongos controles (CTL) e portadores do TSE (TSE14D). Animais com 14 dias de evolução tumoral apresentaram aumento significativo na expressão do receptor quando comparados ao grupo controle (CTL). * Diferença significativa vs CTL. $p < 0,05$, $n = 4$. Teste *t-student*. GAPDH foi utilizado como gene constitutivo para a normalização dos resultados.

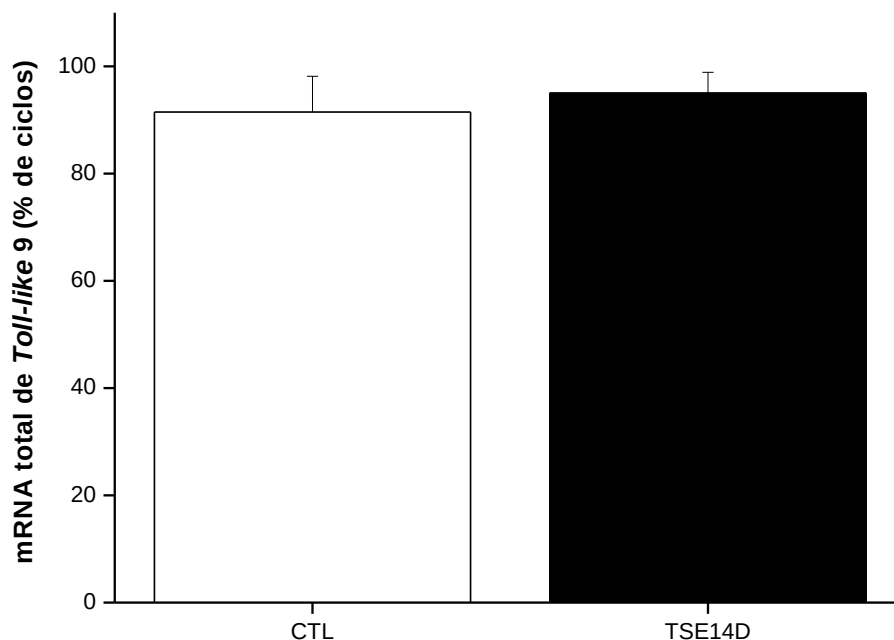


Figura 9. Expressão de mRNA total do receptor *Toll-like* 9 em ilhotas de camundongos controles (CTL) e portadores do TSE (TSE14D). Animais com 14 dias de evolução tumoral apresentaram aumento significativo na expressão do receptor quando comparados ao grupo controle (CTL). * Diferença significativa vs CTL. $p < 0,05$, $n = 4$. Teste *t-student*. GAPDH foi utilizado como gene constitutivo para a normalização dos resultados.

4.3- ANIMAIS PORTADORES DO TUMOR SÓLIDO DE EHRlich APRESENTARAM DEFORMIDADES NA ESTRUTURA DAS ILHOTAS, INFILTRADOS LINFOCITÁRIOS EM SUA PERIFERIA, E ACÚMULO DE LIPÍDIOS NO TECIDO PANCREÁTICO EXÓCRINO.

As análises histopatológicas revelaram que camundongos portadores do TSE exibiram alterações na estrutura das ilhotas de Langerhans quando comparados ao grupo CTL, apresentando discreta modificação de sua forma arredondada, comumente encontrada em ilhotas saudáveis. Foram analisadas 5 áreas distintas de 10 lâminas de cada grupo experimental. Os resultados revelaram que 90% das lâminas analisadas do grupo TSE14D, o que corresponde a 5 campos por lâmina de 9 lâminas, apresentaram ilhotas periacinares e perivascularares com formas menos arredondadas, contra aproximadamente 5% no grupo controle, o que corresponde a 2 campos de uma lâmina.

Além disso, foram encontradas ilhotas com edemas em 80% das lâminas analisadas, o que corresponde a 4 campos por lâmina de 9 lâminas analisadas, contra 2% no grupo controle, o que corresponde a 1 campo de uma lâmina. Na figura 10 estão representadas duas imagens de ilhotas acinares referentes ao grupo CTL (A) e TSE14D (B) onde podemos observar estas descrições. Nota-se ainda em B a presença de infiltrado celular discreto na periferia do vaso sanguíneo (seta preta).

As análises demonstraram ainda infiltrados celulares em 100% das lâminas analisadas do grupo TSE14D, não havendo presença de infiltrados no grupo controle. Na figura 11 podemos observar em A e B, a presença de ilhota periductal e periacinar respectivamente, de aspecto normal, sem infiltrados celulares e com região acinar sem alterações (lâminas do grupo CTL). Na mesma figura, observa-se em C e D, a presença de ilhotas com deformidades (seta amarelas), infiltrados celulares discretos (D- seta verde) e moderados (C- seta verde) e a presença de acúmulo lipídico discreto na região acinar (setas vermelhas) (laminas do grupo TSE14D).

Ao analisarmos as lâminas por coloração com hematoxilina-eosina, notamos a presença de vacúolos lipídicos nas lâminas do grupo TSE14D. Devido ao fato de que o xilol, substância utilizada para o preparo do material histológico, apresenta potencial de degradar lipídios, os vacúolos aparecem com formas características, o que nos permitiu identificar bem como inferir acerca do grau de acúmulo lipídico apresentado pelo grupo TSE14D.

Os resultados revelaram que 85% das lâminas analisadas do grupo TSE14D o que corresponde a 4 campos por lâmina de 8 lâminas e 5 campos por lâmina de duas lâminas, exibiram presença de vacúolo lipídico na região acinar. Destes 85%, 10% apresentaram acúmulo discreto (figura 11, C e D), 15% apresentaram acúmulo moderado (figura 12, C e D, setas vermelhas) e 60% demonstraram acúmulo acentuado (figura 12, E e F, setas pretas). Na figura 12 observa-se ainda, acentuado infiltrado celular (E e F, setas brancas) ocorrendo nesta intensidade em 50% das lâminas analisadas do grupo TSE14D. As lâminas do grupo CTL não apresentaram sinais de acúmulo lipídico acinar (figura 12, A e B).

Por fim, marcamos as lâminas para linfócitos CD3 e notamos presença de infiltrados linfocitários moderados na periferia da ilhota e/ou na região acinar (figura 13-B, seta vermelha) em 90% das lâminas do grupo TSE14D analisadas, o que corresponde a 4 campos por lâmina de 5 lâminas e 5 campos por lâminas de 5 lâminas, não havendo marcações para CD3 no grupo CTL (figura 13-A).

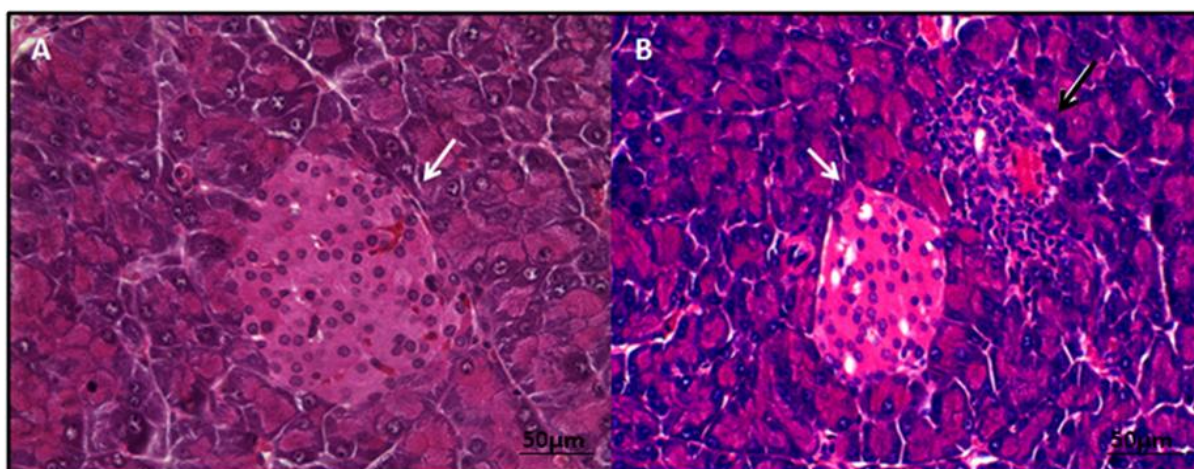


Figura 10. Análise histopatológica de pâncreas de animais controles (A) e portadores do TSE com 14 dias de evolução tumoral (B). Setas brancas indicam ilhotas pancreáticas e seta preta indica presença de infiltrado celular. Coloração hematoxilina-eosina. Aumento de 20 vezes

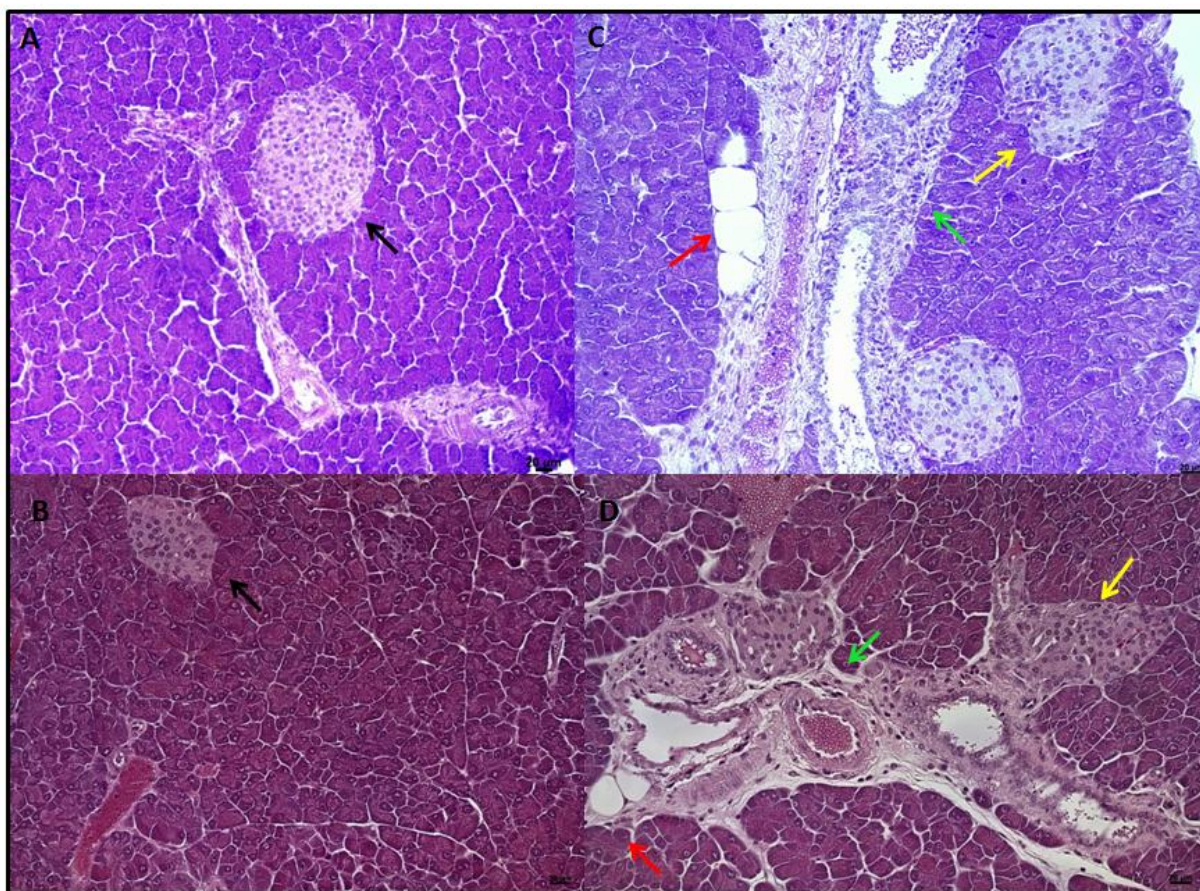


Figura 11. Análise histopatológica de pâncreas de animais controles (A e B) e portadores do TSE com 14 dias de evolução tumoral (C e D). Setas pretas indicam ilhotas pancreáticas normais, setas vermelhas indicam acúmulo lipídico, setas amarelas indicam a presença de deformidades na ilhota e setas verdes indicam infiltrados celulares (grau discreto em D e grau moderado em C). Coloração hematoxilina-eosina. Aumento de 20 vezes.

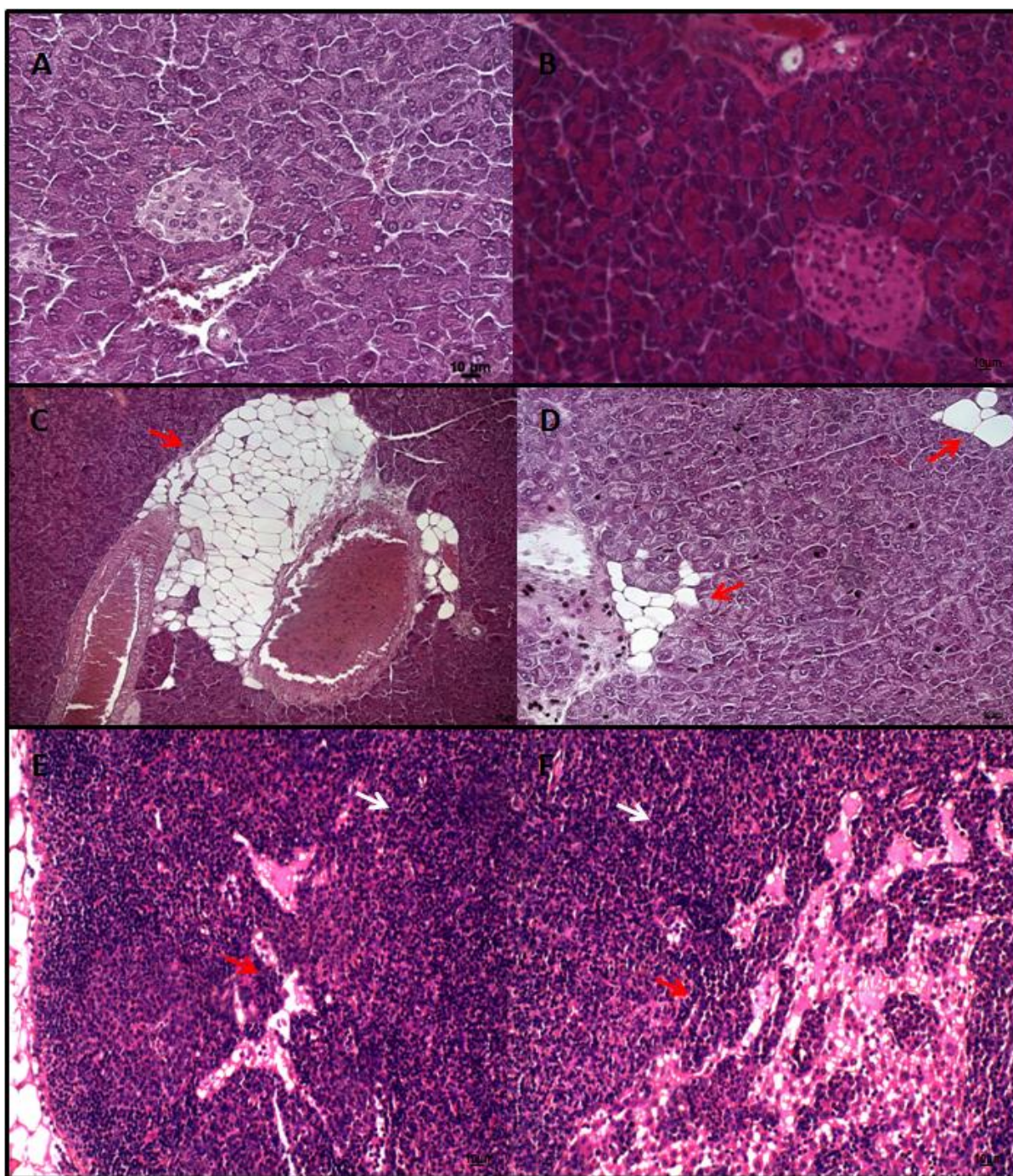


Figura 12. Análise histopatológica de pâncreas de animais controles (A e B) e portadores do TSE com 14 dias de evolução tumoral (C, D, E e F). Setas vermelhas indicam acúmulo lipídico (grau moderado em C e D, e grau intenso em E e F). Setas brancas indicam infiltrado celular em grau acentuado. Coloração hematoxilina-eosina. Aumento de 20 vezes.

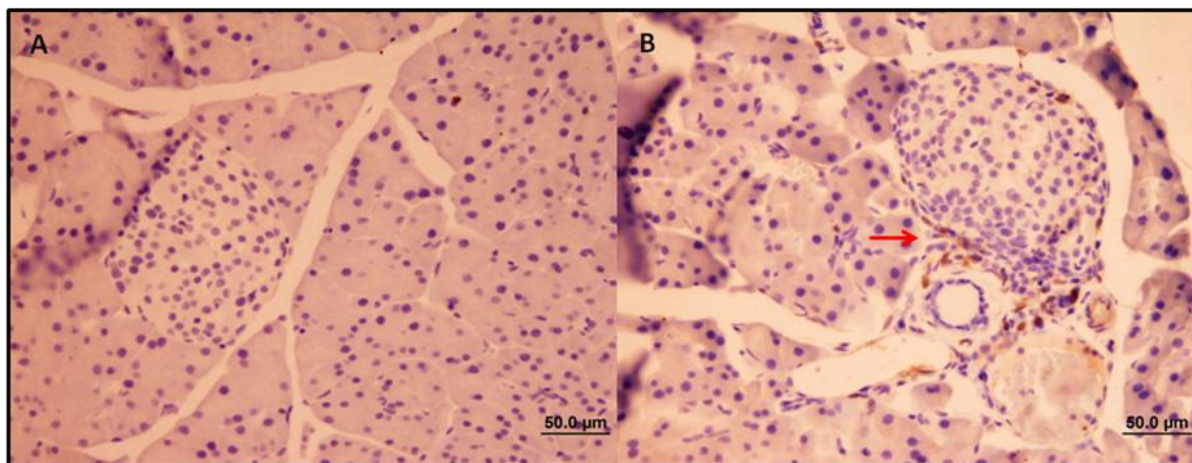


Figura 13. Análise imunohistoquímica de pâncreas de animais controles (A) e portadores do TSE com 14 dias de evolução tumoral (B). Lâminas marcadas para linfócitos CD3. Seta vermelha indica infiltrado linfocitário na periferia da ilhota. Contra-corado com hematoxilina. Aumento de 20 vezes.

5- DISCUSSÃO

A caquexia, como dito anteriormente, é definida como uma complexa síndrome metabólica que leva a severa depleção corpórea e que pode se desenvolver no organismo como resultado da progressão de doenças crônicas (EVANS et al., 2008). Diferentemente de outras enfermidades que levam ao estabelecimento da síndrome, no câncer, a presença do tumor em si se apresenta como um aspecto peculiar e seu crescimento é o grande responsável pelo ambiente inflamatório generalizado que acomete os portadores de tumor maligno (DEANS; WIGMORE, 2005). Ademais, o consumo de glicose pelas células tumorais como principal combustível para sua manutenção e progressão, se constitui em um fator importante envolvido nas alterações do metabolismo de carboidratos na caquexia induzida por câncer (MATHUPALA; REMPEL; PEDERSEN, 1995). O controle da evolução da síndrome, especialmente o controle da estabilidade do perfil glicêmico e insulinêmico, se torna de grande importância para o aumento da sobrevida de indivíduos com câncer. No entanto, o esclarecimento dos fatores envolvidos nestas alterações, principalmente aquelas relacionadas a alterações na secreção de insulina, são extremamente escassos na literatura.

Levando em consideração estes dados, nosso grupo de pesquisa concentrou-se primeiramente na caracterização do perfil secretório de insulina, bem como outros aspectos do metabolismo de carboidratos, a fim de demonstrarmos como este quadro se apresentava em nosso modelo de caquexia tumoral. Neste trabalho, optamos por utilizar o tumor sólido de Ehrlich como modelo experimental devido a sua rápida proliferação que é causada principalmente pela ausência de antígenos de histocompatibilidade para este tipo de células em camundongos (CHEN; WATKINS, 1970). O tumor de Ehrlich é caracterizado como um adenocarcinoma mamário espontâneo, que pode ser induzido tanto na forma ascítica por injeção intraperitoneal quanto na forma sólida com injeção subcutânea (EHRlich; APOLANT, 1905). Este estudo revelou que animais portadores do TSE aos 14 dias de evolução tumoral apresentavam quadro de hipoglicemia e hipoinsulinemia, drástica diminuição na quantidade de glicogênio hepático, bem como significativa redução na capacidade secretória de insulina em resposta a estímulos metabólicos, elétricos e neurais (ver manuscrito-apêndice 1).

Estes dados nos levaram a buscar explicações que não se concentrassem naquelas previamente descritas na literatura, onde a captação de glicose pelo tumor aparece como principal fator envolvido. Trabalhos realizados há mais de uma década mostram que ratos caquéticos portadores do tumor de Walker 256 tiveram sua secreção de insulina comprometida por diminuição do conteúdo da proteína PLC bem como por alterações na

manipulação de cálcio intracelular (FERNANDES et al., 1990; EL RAZI NETO et al., 1996). Estes estudos nos levam a crer que mudanças funcionais ocorrem nas ilhotas de Langerhans em resposta à presença tumoral e que tais mudanças podem estar relacionadas às alterações na capacidade secretória de insulina, contribuindo deste modo para o agravamento do desequilíbrio do metabolismo de carboidratos.

Aliado a estas questões, tem sido demonstrado que o estabelecimento da inflamação sistêmica atua na modificação da função de diversos tecidos como o muscular e o adiposo e tais modificações estariam envolvidas na progressão da caquexia no câncer (TISDALE, 2010). Desta forma, este estudo procurou avaliar o status inflamatório das ilhotas de Langerhans de camundongos caquéticos portadores do TSE, com o intuito de buscar aspectos que pudessem estar relacionados à diminuição da secreção de insulina apresentada por estes animais.

Para tanto, avaliamos fatores envolvidos no estabelecimento do estado inflamatório na ilhota, estado este que muitos autores denominam insulite. Este termo foi utilizado pela primeira vez pelo pesquisador suíço Von Meyenburg (1940) e inicialmente se definia pelo infiltrado linfocitário que acometia as ilhotas de pacientes diabéticos tipo 1 (VELD, 2011). Mais tarde, outras características foram atribuídas a este processo, como a participação dos receptores *toll-like* e de mediadores inflamatórios, e hoje este termo abrange, grosso modo, o conjunto de respostas inflamatórias da ilhota pancreática (EIZIRIK; COLLI; ORTIS, 2009).

No presente trabalho, analisamos a expressão proteica das principais citocinas envolvidas no estabelecimento de insulite e progressão da caquexia no câncer, como TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IFN α , IL-6 e IL-8. Além disso, analisamos a expressão gênica dos receptores *toll-like* mais comumente expressos pela ilhota pancreática, como os receptores TLR3, TLR4 e TLR9. Igualmente, realizamos análises histopatológicas e marcação linfocitária no tecido pancreático.

Nossos resultados revelaram que ilhotas de Langerhans de camundongos caquéticos portadores do TSE exibiram aumento significativo nas concentrações de todas as citocinas analisadas, com especial atenção para o aumento de 121% nas concentrações de IL-6. O aumento nas concentrações de citocinas há algum tempo vem sendo descrito como parte integrante do processo inflamatório da ilhota pancreática (EIZIRIK; MANDRUP-POULSEN, 2001). Citocinas como IL-1 β , TNF- α , IFN- α e IFN- γ desempenham papel importante na disfunção e indução de apoptose de células beta, principalmente por ativação de fatores de transcrição gênica como o NF- κ B e STAT-1 (ORTIS et al., 2006). Ilhotas de roedores

expostas *in vitro* à combinação de TNF- α + IFN- γ e IL-1 β + IFN- γ , tiveram seu caráter apoptótico ativado (ORTIS et al., 2010). Do mesmo modo, análises de microarray identificaram 700 genes que tiveram sua expressão modulada pela presença de IL-1 β e/ou IFN- γ em ilhotas pancreáticas *in vitro* (CNOP et al., 2005).

A capacidade de ativar fatores de transcrição como o NF- κ B e STAT-1, confere às citocinas o poder de regular genes envolvidos não somente com indução de apoptose celular, mas também aqueles envolvidos no processo de exocitose dos grânulos de insulina. Kutlu et al.(2003) evidenciaram por análises de microarray que a adição de citocinas como a IL-1 β e IFN- γ sozinhas ou em conjunto em células beta purificadas *in vitro*, foi capaz de inibir a expressão de vários genes envolvidos neste processo como o SNAP-25, VAMP-2 e Rab3.

Apesar de termos observado através de análises histopatológicas severo infiltrado celular na região acinar do tecido pancreático de camundongos portadores do TSE e, apesar da marcação das células demonstrarem presença de infiltrado de linfócitos CD3 na periferia das ilhotas de Langerhans, estes dados não são suficientes para afirmar que o infiltrado inflamatório seja unicamente responsável pelo aumento nas concentrações de citocinas nas ilhotas pancreáticas. Se levarmos em consideração que uma grande variedade de tipos tumorais é capaz de secretar citocinas e este fato há algum tempo vem sendo correlacionado com a ação destas na atividade de outros tecidos como o muscular e o adiposo durante a progressão da caquexia no câncer (Mantovani et al., 2000), um vasto leque de possibilidades se abre na discussão desta questão.

Hipóteses acerca da produção tumoral de citocinas agindo em sinergismo com a produção das mesmas por células do sistema imune têm sido amplamente aceita nas últimas décadas (TISDALE, 2004). Preston et al.(1998) demonstraram que tanto células tumorais quanto células do sistema imune secretam citocinas indutoras de respostas de fase aguda em pacientes portadores de tumor maligno e, tecidos como o fígado, remodelam o metabolismo de proteínas e induzem o aumento da produção da proteínas de fase aguda, como a proteína C-reativa. O consumo de aminoácidos em função da produção exacerbada destas proteínas é suprido principalmente pelo tecido muscular e este fato tem sido associado às elevadas taxas de proteólise muscular encontradas na caquexia induzida por câncer. Em pacientes portadores de câncer gastroesofágico, citocinas como IL-1, IL-6 e IL-8 foram encontradas em concentrações elevadas tanto no tecido tumoral quanto no plasma (DEANS; WIGMORE; PATERSON-BROWN, 2004).

Além disso, citocinas como IL-1 β , TNF α e IL-6, podem ser secretadas por adipócitos, sendo também conhecidas como adipocinas (THUSHUIZEN et al., 2007). A princípio, não foi proposta do presente estudo avaliar o conteúdo lipídico das ilhotas pancreáticas dos animais portadores do TSE. Porém, ao realizarmos as análises histopatológicas em busca de infiltrados inflamatórios, encontramos acúmulo lipídico na região acinar do pâncreas em todas as lâminas analisadas do grupo TSE, em graus que variaram em sua maioria de moderado a intenso. Ademais, em resultados anteriores encontramos aumento nas concentrações de triglicérides e ácidos graxos livres no plasma associados à perda do tecido adiposo (ver manuscrito-apêndice 1), característica comumente encontrada em modelos de caquexia induzida por câncer.

Da mesma forma que a síndrome caquética, durante o estabelecimento do *diabetes mellitus* tipo 2, o aumento da lipólise acarreta no aumento de níveis de ácidos graxos livres e triglicérides (ROBERTSON et al., 2004). Quando os níveis circulantes destes compostos excedem a quantidade que o tecido adiposo é capaz de metabolizar, tecidos não adiposos, e neste sentido inclui-se ilhotas pancreáticas, começam então a acumular triglicérides (SHIMABUKURU et al., 1998). Estudos evidenciaram que o acúmulo lipídico em ilhotas de Langerhans de diabéticos do tipo 2 foi capaz de causar disfunção na célula beta bem como causar diminuição da massa total destas células, principalmente por liberação local de ácidos graxos como também por liberação de mediadores inflamatórios como as adipocinas IL-6 e TNF- α (KHARROUBI et al., 2004; WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005; ELDOR; RAZ, 2006; RAHIER et al., 2008).

Recentemente, Cunha et al.(2012) demonstraram que o tratamento *in vitro* de ilhotas humanas com palmitato e oleato, foi capaz de induzir apoptose celular através da indução da liberação do citocromo C na mitocôndria, translocação da proteína BAX do citossol para mitocôndria, e ativação das caspases 3 e 9. Os mesmos autores evidenciaram ainda, que o tratamento com palmitato provocou estresse de retículo endoplasmático e aumento na expressão de genes pró-apoptóticos como PUMA e DP5.

Estudos adicionais seriam necessários para associar os níveis de algumas das citocinas analisadas com o acúmulo lipídico acinar nos camundongos portadores do TSE. No entanto, diferentemente das outras citocinas analisadas, onde encontramos aumento de certo modo similar entre elas, a IL-6 se apresentou destoante. O aumento de 121% nas concentrações de IL-6, uma das principais adipocinas envolvidas no processo de lipólise na progressão caquética, nos alerta para a possibilidade de que o nível elevado de citocinas nas ilhotas não

seja de responsabilidade exclusiva dos infiltrados inflamatórios ou da produção das mesmas pela ilhota em resposta ao estresse do ambiente, mas que este aumento poderia ser uma associação de um conjunto de fatores e, neste caso, a presença dos adipócitos poderia exercer papel importante no agravamento da disfunção das ilhotas pancreáticas. Certamente nosso grupo futuramente se concentrará em esclarecer esta questão, pois estes dados indicam uma possível participação, ainda não esclarecida, do acúmulo lipídico na disfunção das ilhotas de Langerhans neste modelo.

Adicionalmente, nossos resultados revelaram que camundongos portadores do TSE exibiram aumento na expressão gênica do TLR4 associado ao aumento de ácidos graxos livres no plasma. O receptor TLR4 é o receptor da família *toll-like* mais bem caracterizado até hoje. Sua peculiaridade consiste em sua capacidade de se ligar a moléculas de LPS presentes na membrana de bactérias gram-negativas (MEDZHITOV, 2001). Esta ligação promove o reconhecimento do TLR4 por receptores específicos com domínio TIR e este reconhecimento é modulado por moléculas adaptadoras como a MyD88. Esta interação acarreta na ativação de fatores de transcrição gênica como o NFκB que por sua vez promove o aumento da transcrição de mediadores pró-inflamatórios como citocinas e quimiocinas (ZUANY-AMORIM; HASTEWELL; WALKER, 2002). Esta afinidade do TLR4 por componentes lipídicos tem sido foco de atenção nos últimos anos e parece constituir o *link* entre as alterações no metabolismo lipídico e alterações funcionais na ilhota pancreática.

Estudos da última década têm evidenciado que o aumento nas concentrações de ácidos graxos no plasma constitui um mecanismo subjacente na indução das reações inflamatórias na ilhota. Shi et al.(2006) demonstraram que o aumento de ácidos graxos saturados resultante de dieta hiperlipídica foram capazes de ativar o receptor TLR4 de tecidos sensíveis à insulina como o fígado e músculos. Outro estudo provou que ácidos graxos livres no plasma em modelos de *diabetes mellitus* tipo 2 ativaram TLR4 nas ilhotas de Langerhans com subsequente ativação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1β, IL-6 e IL-8, todas significativamente aumentadas em nosso modelo de caquexia induzida por câncer (BONISCHNETZLER et al., 2009)

Neste contexto, além do TLR4, este estudo avaliou ainda a expressão gênica dos receptores TLR3 e TLR9. Em nossas análises, não evidenciamos diferença significativa na expressão do receptor TLR9 entre os grupos. No entanto, a expressão do TLR3 se mostrou significativamente aumentada em camundongos portadores do TSE.

A expressão de TLR3 é regulada na ilhota por RNAs de fita dupla, um ácido nucleico intermediário que é gerado durante o ciclo de vida da maioria dos vírus. No entanto, células danificadas também são capazes de gerar RNAs de fita dupla e, na ilhota, promovem ativação do TLR3 que, por consequência, ativam mecanismos apoptóticos principalmente através de fatores como o NFκB e IRF-3. Consequentemente, a ativação destes fatores induz a uma produção massiva de interferons, especialmente o IFN-α que, a níveis crônicos, induz estresse no retículo endoplasmático, posterior ativação da apoptose celular via STAT-1, e aumento da expressão de antígenos MHC de classe 1. Este resultado combinado de fatores leva ao recrutamento de macrófagos e linfócitos que liberam citocinas como IL-1β e IFN-γ no ambiente inflamatório (TISDALE, 2009b).

Além disso, ilhotas humanas expostas *in vitro* a altas concentrações de citocinas como IFN-γ e IL-1β foram capazes de ativar o receptor TLR3 (HULTCRANTZ et al., 2007). Deste modo, estes dados indicam que a ativação do TLR3 é capaz de gerar um “ciclo vicioso” nos mecanismos inflamatórios da ilhota pancreática, pois ativa diretamente o fator NFκB e indiretamente, através da produção de interferons resultantes da ação do NFκB, a via STAT-1. Esta última por sua vez, induz o aumento na transcrição de citocinas que, em altos níveis acarretam na ativação de receptores TLR3.

Associado ao aumento da expressão de mRNA de TLR3, nossos resultados evidenciaram aumento de 80% nas concentrações de IFN-α, nos animais portadores do TSE quando comparados ao grupo controle. Além disso, o aumento significativo de IL-1β e IFN-γ também foi evidenciado, corroborando com a hipótese proposta neste estudo de que as ilhotas pancreáticas estariam sofrendo ação de fatores pró-inflamatórios e, apesar de ainda iniciais, estes resultados nos levam a crer que uma ação combinada de fatores esteja agravando o quadro inflamatório da ilhota pancreática destes animais.

Coletivamente, estes dados suportam o fato de que há um ambiente inflamado instalado na ilhota pancreática de camundongos portadores do TSE bem como em toda região acinar do tecido pancreático. Além disso, os valores encontrados para as concentrações de citocinas e receptores *toll-like* associados aos infiltrados linfocitários na periferia da ilhota pancreática nos permite afirmar que as ilhotas dos animais pertencentes ao grupo TSE desenvolveram status de insulite ao 14º dia após a inoculação tumoral.

Diante da importância da inflamação sistêmica na homeostase funcional de diversos órgãos e, de modo geral, na progressão dos sintomas da caquexia no câncer, estes resultados nos alertam para a possível participação deste ambiente inflamatório causado pela presença

tumoral na diminuição da capacidade secretória de insulina apresentada pelos animais caquéticos portadores do TSE.

Diante dos dados da literatura expostos ao longo deste trabalho, é clara a participação de concentrações cronicamente elevadas de citocinas na indução da apoptose e disfunção da ilhota pancreática, em especial à célula beta. Outrossim, há muito se tem demonstrado que o aumento na expressão de receptores TLR3 e TLR4 também atua gravemente na disfunção destas células. As análises histológicas confirmam o infiltrado celular, composto em sua maioria por linfócitos e este resultado nos dá certa ideia acerca da origem desta elevada concentração de citocinas.

Adicionalmente, o acúmulo lipídico encontrado na região acinar nos alerta para outros fatores que podem estar envolvidos na progressão deste quadro inflamatório, principalmente se levarmos em consideração que das citocinas analisadas, adipocinas como a IL-6 e IL-1 β se apresentaram aumentadas. Ademais, a íntima correlação que existe entre o aumento do receptor TLR4 e o desequilíbrio no metabolismo lipídico, principalmente na indução do *diabetes mellitus* tipo 2, nos chama a atenção, pois o perfil lipídico apresentado pelos animais portadores do TSE se assemelha aqueles encontrados naquela doença.

Embora os dados encontrados na presente dissertação não nos permitam afirmar que o estabelecimento da inflamação associado ao acúmulo lipídico nas ilhotas de Langerhans do grupo TSE seja responsável pela diminuição da secreção de insulina apresentada por estes animais, estes resultados claramente nos direcionam para os possíveis mecanismos envolvidos nestas alterações. Estudos adicionais certamente se concentrarão na análise dos mecanismos apoptóticos causados pelo aumento nas concentrações de citocinas e de receptores *toll-like* como a ativação dos fatores de transcrição NF κ B e STAT-1. Além disso, mecanismos apoptóticos envolvidos com presença de acúmulo lipídico e de concentrações elevadas de ácidos graxos livres, como a indução do estresse do retículo endoplasmático na ilhota pancreática, também receberá especial atenção.

6- CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente estudo nos permitem afirmar que no estado de caquexia induzida por câncer, as ilhotas pancreáticas são bastante afetadas, reagindo à síndrome através do estabelecimento de severo estado inflamatório. Este ambiente inflamado caracteriza a ilhota pancreática de camundongos portadores do TSE em estado de insulite, principalmente em função das elevadas concentrações de citocinas, do aumento da expressão de mRNA dos receptores TLR3 e TLR4 e dos infiltrados linfocitários. Adicionalmente, o acúmulo lipídico na região acinar do tecido pancreático nos permite concluir que possivelmente uma combinação de fatores esteja atuando na disfunção da célula beta e progressão da inflamação.

No entanto, estes resultados não nos permitem afirmar que este estado apresentado pelas ilhotas de camundongos portadores do TSE seja responsável pelas alterações na secreção de insulina e estudos futuros se concentram em responder esta questão com base nos dados encontrados neste trabalho.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSSON, A. K.; FLODSTROM, M.; SANDLER, S. Cytokine induced inhibition of insulin release from mouse pancreatic beta-cell deficient in inducible nitric oxide synthase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 281, p. 396-403, 2001.

ANKER, S. D.; COATS, A. J. Cachexia in heart failure is bad for you. **Eur. Heart J.**, v. 19, p. 191-93, 1998.

ANKER, S. D.; NEGASSA, A.; COATS, A. J.; AFZAL R.; POOLE-WILSON, P. A.; COHN, J. N.; YUSUF, S. Prognostic importance of weight loss in chronic heart failure and the effect of treatment with angiotensin-converting-enzyme inhibitors: an observational study. **Lancet.**, v.361, p.1077-83, 2003.

ARGILÉS, J. M.; BUSQUESTS, S.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. Anti-inflammatory therapies in cancer cachexia. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 668, p. S81-86, 2011.

ARGILÉS, J. M.; BUSQUETS, S.; TOLEDO, M.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. The role of cytokines in cancer cachexia. **Curr. Opin. Support. Palliat. Care.**, v. 3, p. 263-68, 2009.

ARGILÉS, J. M.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. The role of cytokines in cancer cachexia. **Med. Res. Rev.**, v. 19, p. 223-48, 1999.

ASP, M. L.; TIAN, M.; WENDEL, A. A.; BELURY, M. A. Evidence for the contribution of insulin resistance to the development of cachexia in tumor-bearing mice. **Int. J. Cancer.**, v. 126, p. 756-63, 2010.

BALDWIN, C. Nutritional support for malnourished patients with cancer. **Curr. Opin. Support. Palliat. Care.**, v. 5, p. 29-36, 2011.

BALTGALVIS, K.; BERGER, F. G.; PENA, M. M.; DAVIS, J. M.; MUGA, S. J.; CARSON, J. A. Interleukin-6 and cachexia in ApcMin/+ mice. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 294, p. R393–R401, 2008.

BARACOS, V.; RODEMANN, H. P.; DINARELLO, C. A.; GOLDBERG, A. L. Stimulation of muscle protein degradation and prostaglandin E2 release by leukocytic pyrogen (interleukin-1). A mechanism for the increased degradation of muscle proteins during fever. **N. Engl. J. Med.**, v. 308, p. 553–58, 1983.

BARONZIO, G.; ZAMBELLI, A.; COMI, D.; BARLOCCO, A.; BARONZIO, A.; MARCHESI, P.; GRAMAGLIA, A.; CASTIGLIONI, E.; MAFEZZONI, A.; BEVIGLIA, E.; CRESPI, F.; CARGNEL, A. I.; PRAVETTONI, G. Proinflammatory and regulatory cytokine levels in AIDS cachexia. **In Vivo.**, v. 13, p. 499-502, 1999.

BARTHSON, J.; GERMANO, C. M.; MOORE, F.; MAIDA, A.; DRUCKER, D. J.; MARCHETTI, P.; GYSEMANS, C.; MATHIEU, C.; NUÑEZ, G.; JURISICOVA, A.; EIZIRIK, D. L.; GURZOV, E. N. Cytokines tumor necrosis factor alpha and interferon gamma induce pancreatic beta cell apoptosis through-STAT1 mediated Bim protein activation. **J. Biol. Chem.**, v. 286, p. 39632-43, 2011.

BONI-SCHNETZLER, M.; BOLLER, S.; DEBRAY, S.; BOUZAKRI, K.; MEIER, D. T.; PRAZAK, R.; KERR-CONTE, J.; PATTOU, F.; EHSES, J. A.; SCHUIT, F. C.; DONATH, M. Y. Free fatty acids induce a proinflammatory response in islets via the abundantly expressed interleukin-1 receptor 1. **Endocrinology.**, v. 150, p. 5218-29, 2009.

CAI, D.; FRANTZ, J. D.; TAWA, N. E.; MELENDEZ, P. A.; OH, B. C.; LIDOV, H. G.; HASSELGREN, P. O.; FRONTERA, W. R.; LEE, J.; GLASS, D. J.; SHOELSON, S. E. IKKbeta/NF-kappaB activation causes severe muscle wasting in mice. **Cell.**, v. 119, p. 285–98, 2004.

CARDOZO, A. K.; ORTIS, F.; STORLING, J.; YING-MEI, F.; RASSCHAERTE, J.; TONNESEN, M.; VAN EYLEN, F.; MANDRUP-POULSEN, T.; HERCHUELZ, A.; EIZIRIK, D. L. Cytokines downregulates the sarcoendoplasmatic reticulum pump Ca²⁺ ATPase 2b and deplete endoplasmatic reticulum Ca²⁺, leading to induction of endoplasmatic reticulum stress in pancreatic beta-cells. **Diabetes.**, v. 54, p. 452-61, 2005.

CHEN, L.; WATKINS, J.F. Evidence against the presence H₂ histocompatibility antigens in Ehrlich ascites tumour cells. **Nature.**, v. 225, p. 734-737, 1970.

CNOP, M.; WELSH, N.; JONAS, J.C.; JORNS, A.; LENZEN, S.; EIZIRIK, D. L. Mechanisms of pancreatic cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. **Diabetes.**, v. 54, p. 97-107, 2005.

COSTELLI, P. A.; ALMENDRO, V.; FIGUERAS, M. T.; REFFO, P.; PENNA, F.; ARAGNO, M.; MASTROCOLA, R.; BOCCUZI, G.; BUSQUETS, S.; BONELLI, G.; LOPEZ-SORIANO, F. J.; ARGILÉS, J. M.; BACCINO, F. M. Modulations of the calcineurin/NF-AT pathway in skeletal muscle atrophy. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1770, p. 1028-36, 2007.

CUNHA, D. A.; IGOILLO-ESTEVE, M.; GURZOV, E. N.; GERMANO, C. M.; NAAMANE, N.; MARHFOUR, I.; FUKAYA, M.; VANDERWINDEN, J. M.; GYSEMANS, C.; MATHIEU, C.; MARSELLI, L.; MARCHETTI, P.; HARDING, H. P.; RON, D.; EIZIRIK, D. L.; CNOP, M. Death protein 5 and p53-upregulated modulator of apoptosis mediate the endoplasmatic reticulum stress- mitochondrial dialog triggering lipotoxic rodent and human beta-cell apoptosis. **Diabetes.**, v. 61, p. 2363-75, 2012.

DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? **Brain. Behav. Immun.**, v. 15, p. 7-24, 2001.

DEANS, C.; WIGMORE, S. J. Systemic inflammation, cachexia and prognosis in patients with cancer. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.**, v. 8, p. 265-69, 2005.

DEANS, D. A. C.; WIGMORE, S. J.; PATERSON-BROWN, S. Tumour cytokine gene expression correlates with aspects of the acute phase response in patients with gastro-esophageal cancer. **Clin. Nutr.**, v. 23, p. 880.

DEI CAS, A.; MUOIO, A.; ZAVARONI, I. Chronic heart failure and cachexia: role of endocrine system. **Minerva. Cardioangiol.**, v. 59, p. 601-12, 2011.

DONATH, M. Y.; BONI-SCHNETZLER, M.; ELLINGSGAARD, H.; HALBAN, P. A.; EHSES, J. A. Cytokine production by islets in health and diabetes: cellular origin, regulation and function. **Trends. Endocrinol. Metab.**, v. 21, p. 261-266, 2010.

DONOHUE, C. L.; RYAN, A. M.; REYNOLDS, J. V. Cancer cachexia: mechanisms and clinical implications. **Gastroenterol. Res. Pract.**, 2011:601434, 2011.

EHRlich, P.; APOLANT, H. Beobachtungen über maligne Mausentumoren. **Berlin Klin Wochenschr.**, v.42, p.871-874, 1905.

EIZIRIK, D. L.; CARDOZO, A. K.; CNOP, M. The role of endoplasmic reticulum stress in Diabetes Mellitus. **Endocr. Rev.**, v. 29, p. 42-61, 2008.

EIZIRIK, D. L.; COLLI, M. L.; ORTIS, F. The role of inflammation in insulinitis and beta cell loss in type 1 diabetes. **Nat. Rev. Endocrinol.**, v. 5, p. 2219-26, 2009.

EIZIRIK, D. L.; COLLI, M.L.; ORTIS, F. The role of inflammation in insulinitis and β -cell loss in type 1 diabetes. **Nat. Rev. Endocrinol.**, v. 5, p. 219-26, 2009.

EIZIRIK, D. L.; MANDRUP-POULSEN, T. A choice of death the signal transduction of immune mediated cell apoptosis. **Diabetologia.**, v. 44, p. 2115-33, 2001.

EIZIRIK, D. L.; MIANI, M.; CARDOZO, A. K. Signalling danger: endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in pancreatic islet inflammation. **Diabetologia.**, 2012. Ins press.

EL RAZI NETO, S.; ZORN, T. M. T.; CURI, R.; CARPINELLI, A. R. Impairment of insulin secretion in pancreatic islets isolated from Walker 256 tumor-bearing rats. **Am. J. Physiol.**, v. 271, p. C804-09, 1996.

ELDOR, R.; RAZ, I. Lipotoxicity versus adipotoxicity: the deleterious effects of adipose tissue on beta cells in the pathogenesis of type 2 diabetes. **Diabetes. Res. Clin. Pract.**, v. 74, p. S3-S8, 2006.

EVANS, W. J.; MORLEY, J. E.; ARGILÉS, J.; BALES, C.; BARACOS, V.; GUTTRIDGE, D.; JATOI, A.; KALANTAR-ZADEH, K.; LOCHS, H.; MANTOVANI, G.; MARKS, D.; MITCH, W. E.; MUSCARITOLI, M.; NAJAND, A.; PONIKOWSKI, P.; FANELLI, F. R.; SCHANBELAN, M.; SCHOLS, A.; SCHUSTER, M.; THOMAS, D.; WOLFE, R.; ANKER, S. D. Cachexia: A new definition. **Clin. Nutr.**, v. 27, p. 793-99, 2008.

EVANS, W.J.; LAMBERT, C.P. Physiological basis of fatigue. **Am. J. Phys. Med. Rehabil.**, v. 86, p. S29-46, 2007.

FEARON, K. C.; MOSES, A. G. Cancer cachexia. **Int. J. Cardiol.**, v. 85, p.73-81, 2002.

FEARON, K. C.; VOSS, A. C.; HUSTEAD, D. S. Definition of cancer cachexia: effect of weight loss, reduced of food intake, and systemic inflammation on functional status and prognosis. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 83, p. 1345-50, 2006.

FEARON, K.; STRASSER, F.; ANKER, S. D.; BOSAEUS, I.; BRUERA, E.; FAINSINGER, R. L.; JATOI, A.; LOPRINZI, C.; MACDONALD, A.; MANTOVANI, G.; DAVIS, M.; MUSCARITOLI, M.; OTTERY, F.; RADBRUCH, L.; RAVASCO, P.; WALSH, D.; WILCOCK, A.; KAASA, S.; BARACOS, V. E. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. **Lancet Oncol.**, v. 12, p. 489-95, 2011.

FERNANDES, L. C.; MACHADO, U. F.; NOGUEIRA, C. R.; CARPINELLI, A. R.; CURI, R. Insulin secretion in Walker 256 tumour cachexia. **Am. J. Physiol.**, v. 258, p. 1033-36, 1990.

FONSECA, S.G.; BURCIN, M.; GROMADA, J.; URANO, F. Endoplasmatic reticulum stress in beta cells and development of diabetes. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v.9, p. 763-770, 2009.

GROSSBERG, A. J.; SCARLETT, J. M.; MARKS, D. L. Hypothalamic mechanisms in cancer cachexia. **Physiol. Behav.**, v. 100, p. 178-89, 2010.

GUPTA, S. C.; KIM, J. H.; KANNAPPAN, R.; REUTER, S.; DOUGHERTY, P. M.; AGGARWAL, B. B. Role of nuclear-kappa B-mediated inflammatory pathways in cancer-

related symptoms and their regulation by nutritional agents. **Exp. Bio. Med.**, v. 236, p. 658-71, 2011.

GURZOV, E. N.; EIZIRIK, D. L. Bcl-2 proteins in diabetes: Mitochondrial pathways of beta cell death and dysfunction. **Trends. Cell. Biol.**, v. 21, p. 424-31, 2011.

GUTTRIDGE, D. C.; MAYO, M. W.; MADRID, L. V.; WANG, C. Y.; BALDWIN, A. S. NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia. **Science.**, v. 289, p. 2363–66, 2000.

HART, B. L. The Behavior of sick animals. **Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.**, v. 21, p. 225-37, 1991.

HART, B.L. Biological bases of the behavior of sick animals. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 12, p. 123-37, 1988.

HULTCRANTZ, M.; HUHN, M. H.; WOLF, M.; OLSSON, A.; JACOBSON, S.; WILLIAMS, B. R.; KORSGREN, O.; FLODSTRÖM-TULLBERG, M. Interferons induce an antiviral state in human pancreatic islet cell. **Virology.**, v. 367, p. 92-101, 2007.

KALANTAR-ZADEH, K.; KOPPLE, J. D. Obesity paradox in patients on maintenance dialysis. **Contrib. Nephrol.**, v. 151, p. 57-69, 2006.

KAZANTZIS, M.; SEELAENDER, M. Cancer cachexia modifies the zonal distribution of lipid metabolism-related proteins in rat liver. **Cell. Biochem. Funct.**, v. 321, p.419-27, 2005.

KHARROUBI, L.; LADRIERE, L.; CARDOZO, A K.; DOGUSAN, Z.; CNOP, M.; EIZIRIK, D. L. Free fatty acids and cytokines induce pancreatic beta-cell apoptosis by different mechanisms: Role of nuclear-κB and endoplasmatic reticulum stress. **Endocrinol.**, v. 145, p. 5087-96, 2004.

KIM, W. H.; LEE, J. W.; GAO, B.; JUNG, M. H. Synergistic activation of JNK/SAPK induced by TNF-alpha and IFN-gamma: apoptosis of pancreatic beta-cell via p53 and ROS

pathway. **Cell. Signal.**, v. 17, p. 1516-32, 2005.

KUMAR, N. B.; KAZI, A.; SMITH, T.; CROCKER, T.; YU, D.; REICH, R. R.; REDDY, K.; HASTINGS, S.; EXTERMAN, M.; BALDUCCI, L.; DATON, K.; BEPLER, G. Cancer cachexia: Traditional therapies and novel molecular mechanism-based approaches to treatment. **Curr. Treat. Options. Oncol.**, v. 11, p. 107-17, 2010.

KUTLU, B.; CARDOSO, A. K.; DARVILLE, M. I.; KRUHØFFER, M.; MAGNUSSON, N.; ØRNTØFT, T.; EIZIRIK, D. L. Discovery of gene networks regulating cytokine-induced dysfunction and apoptosis in insulin-producing INS-1 cells. **Diabetes.**, v. 52, p. 2701-19, 2003.

LANGEN, R. C.; SCHOLS, A. M.; KELDERS, M. C.,; WOUTERS, E. F.; JANSSEN-HEININGER, Y. M. Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor-kappaB. **FASEB J.**, v. 15, p. 1169–80, 2001.

LAURENCIKIENE, J.; VAN HARMELEN, V.; NORDSTROM, E. A.; DICKER, A.; BLOMQVIST, L.; NÄSLUND, E.; LANGIN, D.; ARNER, P.; RYDÉN, M. NF-kB is important for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. **J. Lipid. Res.**, v. 48, p. 1069-77, 2007.

LAVIANO, A.; MEGUID, M. M.; ROSSI-FANELLI, F. Cancer anorexia: clinical implications, pathogenesis, and therapeutic strategies. **The Lancet Oncology.**, v. 4, p. 686–94, 2003.

LUNDHOLM, K.; DANERYD, P.; KIRNER, U.; HYLTANDER, A.; BOSAEUS, I. Evidence of long-term COX-treatment improves energy homeostasis and body composition in cancer patients with progressive cachexia. **Int. J. Oncol.**, v. 24, p. 505-12, 2004.

LUNDHOLM, K.; HOLM, G.; SCHERSTÉN, T. Insulin Resistance in patients with cancer. **Cancer.Res.**,v.38,p.4665-70,1978.

MAKKOUK, A.; ABDELNOOR, A. M. The potential use of Toll-like receptor (TLR agonists) and antagonists as prophylactic and/or therapeutic agents. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, v. 31, p. 331-38, 2009.

MANTOVANI, G.; MACCIO, A.; MURA, L. Serum levels of leptin and proinflammatory cytokines in patients with advanced-stage cancer at different sites. **J. Molec. Med.**, v. 78, p. 554-61, 2000.

MATHUPALA, S. P.; REMPEL, A.; PEDERSEN, P. L. Glucose catabolism in cancer cells. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 16918-25, 1995.

McCARTHY, D. Rethinking nutritional support for persons with cancer cachexia. **Biol. Res. Nurs.**, v. 5, p. 3-17, 2003.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature.**, v.454, p.428-435, 2008.

MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and innate immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 1, p. 135-45, 2001.

MELSTROM, L. G.; MELSTROM, K. A.; DING, X. Z.; ADRIAN, T. E. Mechanisms of skeletal muscle degradation and its therapy in cancer cachexia. **Histol. Histopathol.**, v. 22, p. 805-14, 2007.

MOLFINO, A.; LAVIANO, A.; FANELLI, F. R. Contribution of anorexia to tissue wasting in cachexia. **Curr. Opin. Support. Palliat. Care.**, v. 4, p. 249-53, 2010.

MU, N.; ZHU, Y.; WANG Y.; ZHANG, H.; XUE, F. Insulin resistance: A significant risk factor of endometrial cancer. **Gynecol. Oncol.**, v.125, p.751-757, 2012.

ORTIS, F.; CARDOZO, A. K.; CRISPIM, D.; STORLING, J.; MANDRUP-POULSEN, T.; EIZIRIK, D. L. Cytokine-induced proapoptotic gene expression in insulin producing- cells is

related to rapid, sustained, and nonoscillatory nuclear factor- κ B activator. **Mol. Endocrinol.**, v. 20, p. 1867-79, 2008.

ORTIS, F.; MIANI, M.; COLLI, M. L.; CUNHA, D. A.; GURZOV, E. N.; ALLAGNAT, F.; CHARIOT, A.; EIZIRIK, D. L. Differential usage of NF κ B activating signals by IL-1 β and TNF- α in pancreatic beta-cell. **FEBS let.**, v. 586, p.984-89, 2012.

ORTIS, F.; NAAMANE, N.; FLAMEZ, D.; LADRIÈRE, L.; MOORE, F.; CUNHA, D. A.; COLLI, M. L.; THYKJAER, T.; THORSEN, K.; ORNTOFT, T. F.; EIZIRIK, D. L. Cytokines Interleukin-1 β and tumor necrosis factor regulate different transcriptional and alternative splicing networks in primary-cells. **Diabetes.**, v. 59, p. 358-74, 2010.

PIROT, P.; EIZIRIK, D. L.; CARDOSO, A. K. Interferon-gamma potentiates endoplasmatic reticulum stress-induced death by reducing pancreatic beta cell defense mechanisms. **Diabetologia.**, v. 49, p.1229-36, 2006.

PRESTON, T.; SLATER, C.; McMILLAN, D. C. Fibrinogen synthesis is elevated in fasting cancer patients with an acute phase response. **J. Nutr.**, v. 128, p. 1355-60, 1998.

RAHIER, J.; GUIOT, Y.; LEFEVRE, A.; GOEBBELS, R. M.; SEMPOUX, C.; HEMQUIM, J. C. Pancreatic beta cell mass in European subjects with type 2 diabetes. **Diabetes Obes. Metab.**, v. 10, p. 32-42, 2008.

RAMOS, E. J. B.; SUZUKI, S.; MARKS, D.; INUI, A.; ASAKAWA, A.; MEQUID, M. M. Cancer anorexia-cachexia syndrome: cytokines and neuropeptides. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.**, v. 7, p. 427-34, 2004.

REBECA, R.; BRACHT, L.; NOLETO, G. R.; MARTINEZ, G. R.; CADENA, S. M.; CARNIERI, E. G.; ROCHA, M. E.; DE OLIVEIRA, M.B. Production of cachexia mediators by Walker 256 cells from ascitic tumors. **Cell. Biochem. Funct.**, v. 26, p. 731–38, 2008.

REYES, T. M.; SAWCHENKO, P. E. Involvement of arcuate nucleus of the hypothalamus in interleukin-1 induced anorexia. *J. Neurosci.*, v. 22, p. 5091-5099, 2002.

ROBERTSON, R. P.; HARMON, J.; TRAN, P. O. T.; POITOUT, V. Beta cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. ***Diabetes.***, v. 53, p. 119-24, 2004.

RYDEN, M.; ARVIDSSON, E.; BLOMQVIST, L.; PERBECK, L.; DICKER, A.; ARNER, P. Targets for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. ***Biochem. Biophys. Res. Commun.***, v. 318, p. 168-75, 2004.

SANDLER, S.; EIZIRIK, D. L.; STERNESJO, J; WELSH, N. Role of cytokines in regulation of pancreatic beta-cell function. ***Biochem. Soc. Trans.***, v. 22, p. 26-30, 1994.

SERUGA, B.; ZHANG, H.; BERNSTEIN, L. J.; TANNOCK, I. F. Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. ***Nat. Rev.***, v. 8, p. 887-99, 2008.

SHI, H.; KOKOEVA, M. V.; INOUE, K.; TZAMELI, I.; YIN, H.; FLIER, J. S. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. ***J. Clin. Invest.***, v. 116, p. 3015-25, 2006.

SHIMABUKURU, M.; ZHOU, Y. T.; LEVI, M.; UNGER, R. H. Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA.***, v. 95, p. 2498-2502, 1998.

TAKAO, T.; HASHIMOTO, K.; DE SOUZA, E. B. Modulation of interleukin-1 receptors in the neuro-endocrine-immune axis. ***Int. J. Dev. Neurosci.***, v. 13, p. 167-78, 1995.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. ***Annu. Rev. Immunol.***, v. 21, p. 335-76, 2003.

TAN, B. H.; ROSS, J. A.; KAASA, A.; SKORPEN, F.; FEARON, K. C. Identification of possible genetics polymorphisms involved in cancer cachexia: a systematic review. ***J. Genet.***, v. 90, p. 165-77, 2011.

TISDALE, M. J. Biology of cachexia. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 89, p. 1763-73, 1997.

TISDALE, M. J. Cachexia in cancer patients. **Nat. Rev. Cancer.**, v. 2, p. 862-71, 2002.

TISDALE, M. J. Cancer Cachexia. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 26, p. 146-51, 2010.

TISDALE, M. J. Mechanisms of cancer cachexia. **Physiol. Rev.**, v. 89, p. 381-410, 2009.

TISDALE, M. J. Tumor–Host Interactions. **J. Cell. Biochem.**, v. 93, p. 871-77, 2004.

TUSHUIZEN, M. E.; BUNCK, M. C.; POUWELS, P. J.; BONTEMPS, S.; VAN WAESBERGHE, J. H.; SCHINDHELM, R. K.; MARI, A.; HEINE, R. J.; DIAMANT M. Pancreatic fat content and beta-cell function in men with and without diabetes type II. **Diabetes Care.**, v. 30, p. 2916-21, 2007.

VELD, P. I. Insulinitis in human type 1 diabetes. **Islets.**, v. 3, p. 131-38, 2011.

WANG, C.; GUAN, Y.; YANG, J. Cytokines in the Progression of Pancreatic β -Cell Dysfunction. **Int. J. Endocrinol.**, 2010:515136, 2010.

WELLEN, K. E.; HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, stress and diabetes. **J. Clin. Invest.**, v. 115, p. 1111-19, 2005.

XU, C.; BAILLY-MAITRE, B.; REED, J. C. Endoplasmatic reticulum stress: cell life and death decisions. **J. Clin. Invest.**, v. 115, p. 2656-64, 2005.

YANO, C. L.; VENTRUCCI, G.; FIELD, W. N.; TISDALE, M. J.; GOMES-MARCONDES, M. C. Metabolic and morphological alterations induced by proteolysis-inducing factor from Walker tumour-bearing rats in C2C12 myotubes. **BMC Cancer.**, v. 8, p. 1-11, 2008.

ZUANY-AMORIM, C.; HASTEWELL, J.; WALKER, C. Toll-like receptors as potential therapeutic targets for multiple diseases. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, v. 1, p. 797-807, 2002.

8- APÊNDICES

CONSIDERAÇÕES

O conteúdo do presente manuscrito, submetido à revista *Pancreas*, faz parte de experimentos realizados durante o período de iniciação científica e, foi adicionado a esta dissertação, pois representam os primeiros resultados obtidos para este modelo, onde caracterizamos o estabelecimento da síndrome caquética bem como o perfil glicêmico e insulinêmico dos animais portadores do TSE. Os resultados que aqui se apresentam, serviram de embasamento para a realização dos experimentos da presente dissertação.

MANUSCRITO – 1

ABSTRACT

Objectives: We investigated insulin secretion in solid Ehrlich tumour-bearing mice at 14 (SET14D) days after tumour inoculation in association with cachexia.

Methods: Male adult Swiss mice were subcutaneously inoculated with solid Ehrlich tumour cells and sacrificed at 14 days after tumour implantation, while control mice received saline alone (CTL). The metabolic parameters and insulin secretion following different stimuli, glucose and insulin tolerance and the expression of key proteins involved in insulin secretion were assessed.

Results: The SET14D group showed decreased glycaemia, insulinaemia, hepatic glycogen and body weight and increased plasma free fatty acids, triglycerides, glucose tolerance and insulin sensitivity. The dose-response curve of insulin secretion to increasing glucose concentrations (2.8-22.2 mM) showed an EC₅₀ of 10 mM glucose for CTL mice and 13 mM glucose for SET14D mice. Insulin secretion was also significantly reduced in SET14D islets at 30 mM KCl, 100 µM carbachol, 20 mM arginine and 20 mM leucine. AKT, PKA, PKC and AchRM3 protein expression was reduced by 17% to 24%.

Conclusions: Tumour presence impairs insulin secretion and decreases the expression of key proteins involved in insulin secretion.

Key Words: cachexia, insulin secretion, solid Ehrlich tumour.

INTRODUCTION

Insulin is an important anabolic hormone, and its secretion by pancreatic beta-cells depends on the plasma concentrations of the required fuels, particularly glucose.¹ Insulin secretion is also controlled by hormones and neurotransmitters² in a complex process that involves metabolic, electrical, and mechanical events, with the participation of several proteins.

Alterations in insulin secretion increase the risk and progression of several types of cancer, primarily colorectal,³ breast,⁴ endometrial⁵ and pancreatic⁶ cancers. Walker 256 tumour-bearing rats showed a decrease in insulin secretion compared to a control group, and this was important to the establishment of cancer cachexia.⁷ Moreover, preneoplastic and neoplastic cells have receptors for insulin (IR) or hybrid receptors (IGF-IRs) that allow insulin to exert direct effects on tumour growth.⁸

Interactions between the tumour and the host can increase mortality in tumour-bearing patients. In general, these interactions cause metabolic disorders such as cachexia, which is characterised by progressive weight loss due to muscle loss with or without a loss of fat mass.⁹ This picture is distinct from the loss of muscle mass as a result of starvation, ageing, primary depression and malabsorption, and cachexia is occasionally accompanied by inflammation, anorexia and insulin resistance.

The association between alterations in glucose metabolism and cancer cachexia in cancer patients has been known since 1919.¹⁰ An important aspect of tumour development is the use of glucose as the primary energy source, and approximately 50% of its energy is derived from glycolysis.¹¹ Briefly, tumour cells convert glucose into lactic acid, which stimulates the liver to produce more glucose that is then utilised by the tumour, repeating the process.¹² It is possible that this process, known as the Cori cycle, is responsible for energy depletion in tumour-bearing patients, a common feature in cancer-induced cachexia.

Thus, the disturbance in carbohydrate metabolism plays an important role in the establishment of cancer-induced cachexia,¹³ but the exact role of insulin in the development of cachexia is poorly understood. Glucose intolerance is the earliest recognised metabolic abnormality in cancer patients,¹⁴ leading to type 2 diabetes with insulin resistance.¹⁵ In some cases, glucose intolerance may be due to defective insulin secretion caused by malnutrition. However, in other cases of weight loss in cancer patients, insulin secretion is normal or even increased.¹⁶

An established model for studying tumour effects in the host is the solid Ehrlich tumour. This tumour is derived from mouse breast adenocarcinoma, which is an aggressive and fast-growing carcinoma, and it is able to develop in either ascitic or solid form depending on the site of inoculation, i.e., intraperitoneal or subcutaneous.¹⁷ The advantage of utilising transplanted tumours is the defined amount and initial features of the tumour cells inoculated and the fast progression to neoplasia, thus reducing the duration of the study.¹⁸

Moreover, because glucose is an important fuel for tumour growth and its imbalance can lead to cachexia, understanding the possible alterations in the endocrine pancreas is important. In this study, we investigated the effects of the presence of a solid Ehrlich tumour on general metabolic parameters, insulin secretion by pancreatic islets and the expression of key proteins involved in the mechanism of insulin secretion associated with the establishment of cachexia.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Swiss mice (*Mus musculus* - 45 days old) from São Paulo State University were maintained at 24°C under a 12-h light/dark cycle. The mice were randomly divided into two groups. A saline solution was injected into the control group (CTL), and Ehrlich tumour cells were inoculated into the SET14D group as described below. Mice were killed by CO₂ exposure, followed by decapitation at 14 days after tumour or saline administration. During the experimental period, the mice had free access to food and water. The experiments reported in this study were approved by the Ethics Committee on Animal Experiments (CEEAA), São Paulo State University (UNESP-Bauru).

Solid Ehrlich tumour inoculation

This neoplasia may evolve to an ascitic or solid form depending on the route of inoculation (intraperitoneal or subcutaneous, respectively). In this study, the tumour was maintained in the ascitic form in Swiss mice, and the cells were collected seven days after intraperitoneal (i.p.) inoculation.¹⁹ Tumour cells were collected by aspiration with a Pasteur pipette, centrifuged (Eppendorf Centrifuge 5810R, Hamburg, Germany) for 10 min at 200 xg, and washed twice with phosphate-buffered saline (pH 7.2). Cell viability was evaluated by trypan blue exclusion, and only cell suspensions that presented more than 95% viability were used. Tumour cells ($1 \times 10^7/100 \mu\text{L}$) were inoculated subcutaneously into the SET14D group.

Metabolic, hormonal and biochemical measurements

On day 14 after inoculation, fasted mice (10-12 h) were killed by CO₂ exposure, followed by decapitation. Before sacrifice, the blood glucose concentration was measured at the tail tip using a glucometer (One Touch, Johnson & Johnson, Milpitas, CA, USA). Serum samples obtained after the centrifugation of trunk blood were later used to measure insulin levels by radioimmunoassay (RIA) using a rabbit anti-rat insulin antibody and rat insulin as a standard.²⁰ ¹²⁵I-labeled insulin (human recombinant) was used in the radioimmunoassay (Amersham Biosciences, Chalfont St. Giles, Buckinghamshire, UK). Serum albumin, triglycerides and free fatty acids were also measured according to the manufacturer's instructions (Human do Brasil, São Paulo, SP, Brazil) by ELISA (Power Wave XS, Biotek Instruments, Winooski, VE, USA). Both groups of mice were weighed daily.

Liver glycogen measurement

Hepatic glycogen content was measured as previously described,²¹ with some modifications. Briefly, liver samples (300 to 500 mg) were transferred to test tubes containing 30% KOH (Mallinckrodt Baker, Paris, France) and boiled for 1 h until they were completely homogenised. Na₂SO₄ (Mallinckrodt Baker, Paris, France) was then added, and glycogen was precipitated with 100% ethanol. The samples were centrifuged at 800 g for 10 min, the supernatants were discarded, and the glycogen was dissolved in hot distilled water. Ethanol was added, and pellets were obtained after a second centrifugation. The pellets were then dissolved in distilled water in a final volume of 20 mL. The glycogen content was measured by treating a fixed volume of samples with phenol reagent and H₂SO₄ (Mallinckrodt Baker, Paris, France), and the absorbance was read at 490 nm with a spectrophotometer (Spectronic® 20 Genesys™, Spectronic Unicam, NY, USA).

Intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT)

The intraperitoneal glucose tolerance test was performed as previously described.²² Independent groups of fasted (10-12 h) mice were anaesthetised i.p. with sodium thiopental (60 mg/kg, THIOPEXANTAX®, Cristal Pharma, Contagem, MG, Brazil), and blood samples were obtained from the tail tip to measure glucose levels, after confirming the absence of corneal and pedal reflexes. Subsequently, a 50% glucose solution was administered into the peritoneal cavity at a dose of 2 g/kg body weight. Additional blood samples were obtained to determine glucose concentrations at 15, 30, 60, and 120 minutes after a glucose load.

Intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT)

The intraperitoneal insulin tolerance test was performed as previously described.²² Fed mice were anaesthetised as described above. Human recombinant insulin (Novolin®- 100

IU/mL, Cristal Pharma, Contagem, MG, Brazil) equivalent to 2 U/kg body mass was injected i.p. immediately after the glucose concentration was measured at the tail tip at time 0. Samples were collected at 0, 10, 20 and 30 minutes to measure glycaemia. The glucose disappearance rate (Kitt) was calculated using the formula $0.693/t_{1/2}$. Glucose $t_{1/2}$ was calculated from the slope of the least-squares analysis of the plasma glucose concentrations during the linear decay phase.

Islet isolation, insulin content, and static secretion protocols

Islets were isolated by digesting the pancreas with collagenase type V (Sigma, St. Louis, MO, USA) as previously described²³ but with some modifications.²⁴ For the static incubation, groups of five islets were first incubated for 1 h at 37°C in a Krebs bicarbonate buffer solution of the following composition (in mM): 115 NaCl, 5 KCl, 2.56 CaCl₂, 1 MgCl₂, 24 NaHCO₃, 15 HEPES, and 5.6 glucose supplemented with 0.5% bovine serum albumin and equilibrated with a mixture of 95% O₂:5% CO₂, pH 7.4. The medium was then replaced with fresh buffer containing the following (in mM): 2.8, 5.6, 8.3, 11.1, 16.7, or 22 mM glucose; 8.3 mM glucose plus 100 µM carbachol; or 2.8 mM glucose plus 30 mM KCl (in the experiments with 30 mM KCl, the concentration of NaCl was proportionally decreased to maintain osmolarity), 20 mM arginine, and 20 mM leucine. At the end of a 1-h incubation, the samples were stored at -20°C for the subsequent measurement of insulin content by RIA as described earlier. NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, NaHCO₃ and HEPES were obtained from Mallinckrodt Baker (Paris, France). Arginine, leucine, and carbachol were obtained from Sigma (St. Louis, MO).

Western blotting assay

Groups of 300 freshly isolated islets were pelleted by centrifugation and resuspended in 50 to 100 µL of homogenisation buffer containing protease inhibitors, as previously described.²² The islets were sonicated for 15 seconds (Fisher Scientific/model 100, Pittsburgh, PA, USA), and the total protein content was measured by the Bradford method (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The sample volume was adjusted to ensure the same amount of protein in each lane. Samples containing 50 µg of protein from each experimental group were separated by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes, and stained with Ponceau S to confirm the efficiency of the electro-transference. PKC (protein kinase C), AKT (protein kinase B), PLC (phospholipase C), PKA (AMP-dependent protein kinase), and AchRM3 (muscarinic acetylcholine receptor) were detected in the membrane after two hours of incubation at room temperature with rabbit polyclonal antibodies against AKT (diluted 1:1000), AchRM3 (diluted 1:1000), PLC (diluted 1:500), PKA (diluted 1:1000),

or PKC (diluted 1:1000). All antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) and diluted in TBS-Tween 20 containing 3 g/L non-fat dry milk. Detection was performed using enhanced chemiluminescence (SuperSignal West Pico; Pierce, Rockford, IL) after incubation with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. The band intensities were quantified by the optical densitometry (Scion Image, Frederick, MD) of the developed autoradiogram.

Statistical analysis

The results were reported as the mean $\pm$ S.E.M. of the indicated number of experiments. An unpaired Student's t-test was used to compare two groups, and ANOVA followed by the Tukey post-test was used for multiple comparisons. The adopted significance level was $P < 0.05$.

RESULTS

Solid Ehrlich tumour-bearing mice had alterations in metabolic parameters and a decrease in body weight

In accordance with previous observations,^{10,25} the serum triglyceride and free fatty acid concentrations were significantly higher ($P < 0.05$) in cachectic solid tumour-bearing mice (Table 1). The SET14D group showed an increase of 300% in plasma triglyceride content (CTL-91.64 $\pm$ 6.4, SET14D-302.60 $\pm$ 41 mg/dL) and a 600% increase in plasma free fatty acids (CTL-0.36 $\pm$ 0.13, SET14D-2.41 $\pm$ 0.42 mEq/L) compared with the CTL group. These results indicate the establishment of a cachectic condition, with significant decreases in serum albumin (CTL-2.40 $\pm$ 0.08, SET14D-1.81 $\pm$ 0.33 g/dL), hepatic glycogen (CTL-3.31 $\pm$ 1.6, SET14D-0.33 $\pm$ 0.33 mg/100g tissue), and body weight. In addition, glycaemia (CTL-106 $\pm$ 4.76, SET14D-57.8 $\pm$ 3.7 mg/dL) and insulinaemia (CTL-2.75 $\pm$ 0.4, SET14D-1.84 $\pm$ 0.5 ng/mL) were significantly decreased in the SET14D group.

Glucose tolerance and insulin sensitivity were increased in solid Ehrlich tumour-bearing mice

Unlike most findings, solid Ehrlich carcinoma-bearing mice showed a significant ($n = 10$; $P < 0.05$) increase in glucose tolerance and insulin sensitivity, as assessed by the ipGTT (Fig. 1A) and ipITT (Fig. 2A) tests, respectively, compared to the CTL group. During ipGTT, the maximal concentrations of glucose were 350 mg/dL and 200 mg/dL in the CTL and SET14D groups, respectively, at minute 15. The area under the curve was 10,000 mg/dL.min and 6,000

mg/dL.min for the CTL and SET14D groups, respectively ($P<0.05$) (Fig. 1B). During the ipITT, the glucose decay was faster in the SET14D group than in the CTL group, and the Kitt values showed a 40% increase in the SET14D group (3.5%/min) compared to the CTL group (2.5%/min) ($P<0.05$) (Fig. 2B).

The cachectic group exhibited decreased glucose-, carbachol-, KCl-, arginine-, and leucine-stimulated insulin secretion in vitro

The dose response curve to increasing concentrations of glucose (2.8 mM-22 mM) (Fig. 3) was shifted to the right in SET14D islets compared with CTL islets. The EC_{50} was 32% higher in SET14D islets compared with CTL islets. Insulin secretion stimulated by other secretagogues was also lower in the SET14D group. The reduction in insulin secretion observed following carbachol (100 μ M) (Fig. 4a), KCl (Fig. 4b), arginine (Fig. 4c), and leucine (Fig. 4d) administration was between 65% and 73% compared with CTL islets ($P<0.05$). These findings indicate that the insulin secretion induced by different stimuli was reduced in the SET14D group and that this alteration could be due to cachexia.

Cancer cachexia decreased islet protein expression involved in glucose metabolism

The expression of key proteins involved in the different pathways of insulin secretion, such as AKT, PKA and AchRM3, was significantly reduced ($P<0.05$) in islets from SET14D mice compared with CTL mice (Fig. 5). Importantly, AKT, a protein that inhibits apoptosis, was reduced by 24% (CTL-7823.5 $\pm$ 470, SET14D-5879 $\pm$ 523). PKA, a protein that mediates cAMP actions and controls several cell functions, including insulin secretion, was 20% lower in the SET14D group (CTL-7618.75 $\pm$ 674; SET14D-6064.25 $\pm$ 358). In accordance with the reduction in insulin secretion stimulated by carbachol, the expression of the muscarinic receptor (AchRM3), which mediates the effect of neurotransmitters, was also 17% lower in the SET14D group (CTL-7268 $\pm$ 115, SET14D-6027 $\pm$ 628). A similar reduction in PKC expression (-17%) was observed in SET14D mice compared with CTL mice (CTL-7914 $\pm$ 850, SET14D-6633 $\pm$ 405). However, PLC expression was similar in islets from the SET14D and CTL groups (CTL-5758 $\pm$ 667, SET14D-5203 $\pm$ 362).

DISCUSSION

We investigated the metabolic aspects involved in cancer-induced cachexia and insulin secretion in solid Ehrlich carcinoma-bearing mice. Solid Ehrlich tumour-bearing mice were in a cachectic state 14 days after tumour inoculation, as demonstrated by metabolic

measurements, similar to other models of cancer cachexia.^{26,27} The main indications supporting this assumption were weight loss, increased triglycerides, free fatty acids and albumin plasma content, decreased hepatic glycogen, hypoinsulinaemia, and hypoglycaemia.

Nevertheless, the underlying mechanisms causing cachexia are not well understood.²⁸

A well-established characteristic of cachexia development is weight loss.^{25,29,30} The SET14D group exhibited a significant decrease in body weight starting at day 8 after tumour inoculation. In general, weight loss in cancer-induced cachexia is due to metabolic alterations, including abnormal carbohydrate metabolism, an increase in skeletal muscle protein breakdown, alterations in hepatic protein metabolism and lipid mobilisation.³¹

Although several factors are involved in weight loss, there is no doubt that lipid mobilisation is closely associated with cancer-induced cachexia.³² Lipolysis has been shown to play an instrumental role in the pathogenesis of cancer cachexia, primarily in weight loss.³³ The SET14D group exhibited increased levels of plasma triglycerides and free fatty acids associated with weight loss, which are good indicators of lipolysis.

In addition to weight loss, hepatic glycogen was also reduced in tumour-bearing mice compared with the CTL group. In agreement with these results, glycogenolysis has previously been observed in other tumour models.^{34,35} An increase in the hepatic adenylate cyclase concentration leads to an increase in cyclic AMP, which activates glycogenolysis. Lipid-mobilising factor (LMF), which is stimulated by adenocarcinoma (MAC16)-induced cachexia, has been shown to activate hepatic adenylate cyclase in a GTP-dependent manner, and this mechanism could be responsible for the increase in glycogenolysis.³⁶ We suggest that an increased demand for glucose by the tumour would correlate with a decrease in liver glycogen and increasing weight loss in our tumour-bearing mice.

Alterations in liver metabolism associated with cancer cachexia in the Ehrlich tumour model have been suggested. The inoculation of Ehrlich ascite tumour into the abdominal cavity of mice has been shown to induce marked perturbations in liver PK (pyruvate kinase) isozyme activity and markedly elevated liver SDH (serine dehydratase) and TAT (tyrosine aminotransferase) activities, indicating that liver amino acid metabolism and gluconeogenesis are activated by the presence of a tumor.³⁷

In addition to hepatic glycogen, serum albumin was also decreased in the SET14D group. Hypoalbuminaemia is a well-known feature of cancer-induced cachexia and has been reported in other tumour types.^{38,39} Indeed, all the metabolic features found in the SET14D model led us to believe, at least in part, that cachexia was established.

However, it has previously been demonstrated that cancer cachexia is associated with insulin resistance and glucose intolerance,^{7,27} which contradicts the results found in our tumour model. The SET14D group showed increased insulin sensitivity associated with augmented glucose tolerance, suggesting that factors other than those already studied could be involved in the glucose imbalance observed in tumour models.

The effective role of insulin in tumour growth and cachexia remains unclear and controversial. Nevertheless, it is well known that an anabolic factor is certainly crucial for the establishment of cachexia. The anabolic effects of insulin are in direct opposition to the catabolic processes the tumour uses for total nutritional management,⁴⁰ and the role of insulin in cancer-induced cachexia is therefore important.

Some cancer cells have increased insulin receptor (IR) expression, and some tumour types demonstrate increased IR signalling pathway activation as a consequence of hyperinsulinaemia.^{41,42} By contrast, other tumour types exhibit low plasma insulin levels,^{34,43} as found in the SET14D group.

Associated with increased insulin sensitivity, the major finding of this study was that insulin secretion in isolated islets stimulated by different agents was drastically decreased in the tumour-bearing group. In Walker 256 tumour-bearing rats, insulin secretion in response to glucose was reduced in isolated pancreatic islets,⁷ and alterations in insulinaemia in cancer cachexia have been documented.^{44,45}

Because proteolysis is a common event in cancer cachexia,⁴⁶ we propose that a major event involved in the decrease of insulin secretion in the SET group was caused by the decreased expression of key proteins involved in the control of insulin secretion in β -cells.

The inoculation of Walker 256 tumour cells in rats caused important changes in the mechanism of insulin release, such as a lower response of PLC to a calcium stimulus, due to a decreased calcium fractional outflow rate and diminished PLC activity as well as decreased glucose oxidation.²⁷ By contrast, in our experiments, PLC expression was similar in both groups.

However, the muscarinic receptor M3, which is known to be important for stimulating insulin secretion,⁴⁷ was significantly reduced in the SET14D group, justifying a decrease in insulin secretion stimulated by carbachol. The impairment of insulin secretion with a paradoxical reduction in blood glucose levels has been observed in mice devoid of the M3 receptor.⁴⁸ These data suggest that low M3 receptor expression could be a factor involved in the decrease of insulin secretion by neural pathways. In addition, protein kinase C, which is

activated by the M3 receptor and leads to increased insulin secretion,⁴⁷ was also diminished in the SET14D group, confirming observations that PKC down-regulation decreases carbachol-stimulated insulin release.⁴⁹

Furthermore, protein kinase A, an important amplifier of the stimulus-secretion signals in pancreatic β -cells,⁵⁰ was also decreased in the tumour-bearing group. Similar to PKA, protein kinase B, which acts as a convergence point for the regulation of β -cell mass and function in response to growth stimuli,⁵¹ was also diminished in the β -cells of the SET14D group, supporting the hypothesis that the reduction of key proteins must be involved in the lower insulin secretion observed in these mice.

In conclusion, solid tumour-bearing animals exhibited a severe imbalance in carbohydrate metabolism, which could be the primary stimulus for the development of cachexia. The decreased expression of key proteins, possibly provoked by proteolysis, could be linked to diminished insulin secretion. New studies focusing on proteolysis associated with low insulin secretion are necessary to clarify the mechanisms involved in the impairment of insulin secretion in cancer cachexia models.

DECLARATION OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the reported research.

FUNDING

This research was supported by the São Paulo Research Foundation - FAPESP.

REFERENCES

1. Henquin JC. Triggering and Amplifying Pathways of Regulation of Insulin Secretion by Glucose. *Diabetes*. 2000;49:1751-1760.
2. Henquin JC. The dual control of insulin secretion by glucose involves triggering and amplifying pathways in β -cells. *Diabetes Res Clin Pract*. 2011;93:27-31.
3. Ma J, Giovannuci E, Pollak M, et al. A Prospective Study of Plasma C-peptide and colorectal cancer risk in men. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96:546-553.
4. Healy LA, Ryan AM, Carroll P, et al. Metabolic Syndrome, Central obesity and Insulin Resistance are Associated with Adverse Pathological Features in Postmenopausal Breast Cancer. *Clin Oncol*. 2010;22:281-288.

5. Mu N, Zhu Y, Wang Y, et al. Insulin resistance: A significant risk factor of endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2012;125:751-757.
6. Cui Y, Andersen DK. Diabetes and pancreatic cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2012;19:F9-F26.
7. Fernandes LC, Machado UF, Nogueira CR, et al. Insulin secretion in Walker 256 tumour cachexia. *Am J Physiology*. 1990;258:1033-1036.
8. Hursting SD, Berguer NA. Energy balance, host related factors and cancer progression. *J Clin Oncol*. 2010;28:4058-4065.
9. Tisdale MJ. Cancer Cachexia. *Curr Opin Gastroenterol*. 2010;26:146-151.
10. Asp ML, Tian M, Wendel AA, et al. Evidence for the contribution of insulin resistance to the development of cachexia in tumor-bearing mice. *Int J Cancer*. 2009;126:756-763.
11. Mathupala SP, Rempel A, Pedersen PL. Glucose catabolism in cancer cells. *J Biol Chem*. 1995;270:16918-16925.
12. Tigerina AJ. The Biochemical Basis of Metabolism in Cancer Cachexia. *Dimens Crit Care Nurs*. 2004;23:237-243.
13. Penet MF, Winnard PT, Jacobs MA, et al. Understanding Cancer-induced Cachexia: Imaging the flame and its fuel. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2011;5:327-333.
14. Rohdenburg GL, Bernhard A, Krehbiel O. Sugar Tolerance in cancer. *JAMA*;72:1528-1530.
15. Tayek JA. A review of cancer cachexia and abnormal glucose in humans with cancer. *J Am Coll Nutr*. 1992;11:445-456.
16. Argilés JM, Alvarez B, López-soriano FJ. The metabolic basis of cancer cachexia. *Med Res Rev*. 1997;17:477-498.
17. Sugiura K. Tumor transplantation In: GAY WI Methods of Animal Experimentation. *Academic Press New York and London*. 1965;2:171-222.
18. Vendramini-Costa DB, Castro IBD, Ruiz ALTG, et al. Effect of goniothalamine on the development of Ehrlich solid tumor in mice. *Bioorg Med Chem*. 2010;18:6742-6747.
19. Silva RJ, Silva MG, Vilela LC, et al. Cytokine profile of Ehrlich ascites tumor treated with Bothrops jararaca venom. *Mediators Inflamm*. 2002;11:197-201.
20. Scott AM, Atwater I, Rojas E. A method for the simultaneous measurement of insulin release and B cell membrane potential in single mouse islets of Langerhans. *Diabetologia*. 1981;21:470-475.

21. Lo S, Russel JC, Taylor AW. Determination of glycogen in small tissue samples. *J Appl Physiol*. 1970;28:234-236.
22. Rafacho A, Giozzet AGV, Boschero AC, et al. Functional Alterations in endocrine pancreas of rats with diferents degrees of dexamethasone-induced insulin resistance. *Pancreas*. 2008;36:284-293.
23. Lacy PE, Kostianovsky M. Method for isolation of the intact islet of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*. 1967;16:35-39.
24. Boschero AC, Delattre E, Santos ML. Isolamento de ilhotas de Langerhans de rato. *Anais XII Congresso Sociedade Brasileira Fisiologia*. 1980;117.
25. Tisdale MJ. Mechanisms of cancer cachexia. *Physiol Rev*. 2009;89:381-410.
26. Rebeca R, Bracht L, Noleto GR, et al. Production of cachexia mediators by Walker 256 cells from ascitic tumors. *Cell Biochem Funct*. 2008;26:731-736.
27. El Razi Neto S, Zorn TMT, Curi R, et al. Impairment of insulin secretion in pancreatic islets isolated from Walker 256 tumor-bearing rats. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1996;271:C804-C809.
28. Evans WJ, Morley JE, Argilés JM, et al. Cachexia: a new definition. *Clin Nutr*. 2008;27:793-799.
29. Argilés JM, López-Soriano FJ, Busquets S. Novel approaches to the treatment of cachexia. *Drug Discov Today*. 2008;13:73-78.
30. Carson JA, Baltgalvis KA. Interleukin-6 as a Key Regulator of Muscle Mass during Cachexia. *Exerc. Sport. Sci Rev*. 2011;38:168-176.
31. Argilés JM, López-Soriano FJ, Busquets S. Mechanisms and treatment of cancer cachexia. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2012;epub ahead of print.
32. Arner P. Lipases in Cachexia. *Science*. 2011;333:163-164.
33. Das SK. Adipose Triglyceride Lipase Contributes to Cancer-Associated Cachexia. *Science*. 2011;333:233-238.
34. Pinto JA, Folador A, Bonato SJ, et al. Fish oil supplementation in F1 generation associated with naproxen, clenbuterol, and insulin administration reduce tumor growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing Rats. *J Nutr Biochem*. 2004;15:358-365.
35. Nunes EA, Kuczera D, Brito GAP, et al. β -Hydroxy- β -methylbutyrate supplementation reduces tumor growth and tumor cell proliferation ex vivo and prevents cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats by modifying nuclear factor- κ B expression. *Nutr Res*. 2008;28:487-493.

36. Hirai K, Ishiko O, Tisdale MJ. Mechanism of Depletion of Liver Glycogen in Cancer Cachexia. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;241:49–52.
37. Korekane H, Nishikawa A, Iamamura K. Mechanisms mediating metabolic abnormalities in the livers of Ehrlich ascites tumor-bearing mice. *Arch Biochem Biophys*. 2003;412:216-222.
38. Lohsiriwat V, Lohsiriwat D, Boonnuch W, et al. Pre-operative hypoalbuminemia is a major risk factor for postoperative complications following rectal cancer surgery. *World J Gastroenterol*. 2008;28:1248-1251.
39. Kemik O, Sumer A, Kemik AS, et al. The relationship among acute-phase response proteins, cytokines and hormones in cachectic patients with colon cancer. *World J Surg Oncol*. 2010;8:85.
40. Beck SA, Tisdale MJ. Effect of insulin on weight loss and tumour growth in a cachexia model. *Br J Cancer*. 1989;59:677-681.
41. Papa V, Pezzino V, Costantino A, et al. Elevated insulin receptor content in human breast cancer. *J Clin Invest*. 1990;86:1503–1510.
42. Novosyadlyy R, Lann DE, Vijayakumar A, Rowzee A, et al. Insulin mediated acceleration of breast cancer development and progression in a non obese model of type 2 diabetes. *Cancer Res*. 2010;70:741–751.
43. Rydén M, Agustsson T, Laurencikiene J, et al. Lipolysis—Not Inflammation, Cell Death, or Lipogenesis—Is Involved in Adipose Tissue Loss in Cancer Cachexia. *Cancer*. 2008;113:1695-1704
44. Bing C, Taylor S, Tisdale MJ, et al. Cachexia in MAC16 adenocarcinoma: suppression of hunger despite normal regulation of leptin, insulin and hypothalamic neuropeptide Y. *J Neurochem*. 2001;79:1004-1012.
45. Grossberg AJ, Scarlett JM, Marks DL. Hypothalamic mechanisms in cachexia. *Physiol Behav*. 2010;100:478-489.
46. Monitto CL, Dong SM, Jen J, et al. Characterization of a Human Homologue of Proteolysis Inducing Factor and Its Role in Cancer Cachexia. *Clin Cancer Res*. 2004;10:5862-5869.
47. de Azua IR, Gautam D, Guettier JM, et al. Novel insights into the function of β -cell M3 muscarinic acetylcholine receptors: therapeutic implications. *Trends Endocrinol Metab*. 2011;22:74-80.

48. Gromada J, Hughes TE. Ringing the dinner bell for insulin: Muscarinic M3 receptor activity in the control of pancreatic β cell function. *Cell Metab.* 2006;3:390-392.
49. Ishikawa T, Iwasaki E, Kanatani K, et al. Involvement of novel protein kinase C isoforms in carbachol-stimulated insulin secretion from rat pancreatic islets. *Life Sci.* 2005;77:462-469.
50. Nesher R, Anteby E, Yedovizky M, et al. Cell Protein Kinase and the Dynamics of the Insulin. *Diabetes.* 2002;51:s68-s73.
51. Elghazi L, Balcazar N, Bernal-Mizrachi E. Emerging role of protein kinase B/Akt signaling in pancreatic cell mass and function. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38:157-163

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT) in Solid Ehrlich tumour bearing- and control mice. (A) Blood samples from the tail tip were collected before and 15, 30, 60 and 120 min after glucose load (2 gm/kg body weight). (B) Area under the curve (AUC) during the ipGTT. Data are mean $\pm$ SEM from 10 different mice. *Significantly different from CTL. $P<0.05$.

Figure 2. Intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT) in Solid Ehrlich tumour bearing- and control mice. The glucose disappearance rate (Kitt) was calculated using the formula $0.693/t_{1/2}$. Glucose $t_{1/2}$ was calculated from the slope of the least-squares analysis of plasma glucose concentrations during the linear decay phase. Data are mean $\pm$ SEM of 10 different mice. *Significantly different from CTL, $P<0.05$.

Figure 3. Dose-response curve of insulin secretion from isolated islets from Solid Ehrlich tumour bearing- and control mice. Groups of 5 islets were pre-incubated in 1 mL of Krebs bicarbonate Buffer containing 5.6 mM glucose for 1 h. Then, the islets were washed and further incubated for 1 h in 1 mL of Klebs solution containing increasing concentrations of glucose (2.8 – 22.2 mM). Insulin contained in the supernatant was measured by RIA. Data are mean $\pm$ SEM of 12 independent experiments. *Significantly different from CTL, $P<0.05$.

Figure 4. Insulin secretion from isolated islets from Solid Ehrlich tumour bearing- and control mice stimulated by different agents. Groups of 5 islets were pre-incubated in 1 mL of

Krebs bicarbonate solution containing 5.6 mM glucose for 1 h. Then, the islets were washed and further incubated for 1 h in 1 mL of Klebs solution containing 8.3 mM glucose plus 100µM carbachol (A), 2.8 mM glucose plus 30mM KCl (B), 20mM arginine (C), and 20 mM leucine (D). Insulin contained in the supernatant was measured by RIA. Data are mean±SEM of 12 different experiments. ^aSignificantly different from the respective control, ^{a-d} Mean values with unlike letters were significantly different, N=12, P<0.05.

Figure 5. Expression of AchRM3, PKC, PKA- α and AKT proteins in islets from Solid Ehrlich tumour bearing- and control mice. Protein extracts were processed for Western blotting. The bars represent mean $\pm$ SEM of 10 different experiments. *Significantly different from CTL, P<0.05.

Table

Table 1 Biochemical Parameters obtained from the experimental groups.

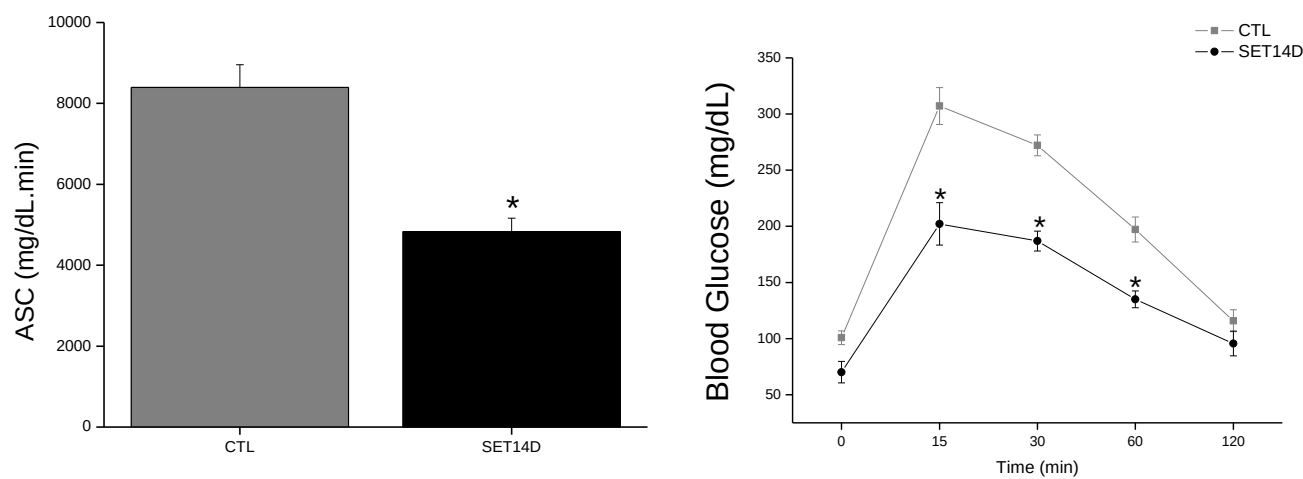
	CTL	SET14D
Glycaemia (mg/dL)	101 $\pm$ 3.46	69.8 $\pm$ 2.7*
Insulinaemia (ng/mL)	2.75 $\pm$ 0.4	1.84 $\pm$ 0.5*
Triglycerides (mg/dL)	91.64 $\pm$ 6.4	302.60 $\pm$ 41*
Free Fatty Acids (mEq/L)	0.36 $\pm$ 0.13	2.41 $\pm$ 0.42*
Hepatic Glycogen (mg/100mg)	3.31 $\pm$ 1.6	0.33 $\pm$ 0.33*
Albumin (g/dL)	2.40 $\pm$ 0.08	1.81 $\pm$ 0.33*
Initial Weight (g)	54.31 $\pm$ 0.7	54.36 $\pm$ 0.7
Final Weight (g)	55.19 $\pm$ 0.7	50.16 $\pm$ 0.7*

Data represent mean $\pm$ SEM. N=10. * Significantly different vs. CTL. P<0.05

FIGURES

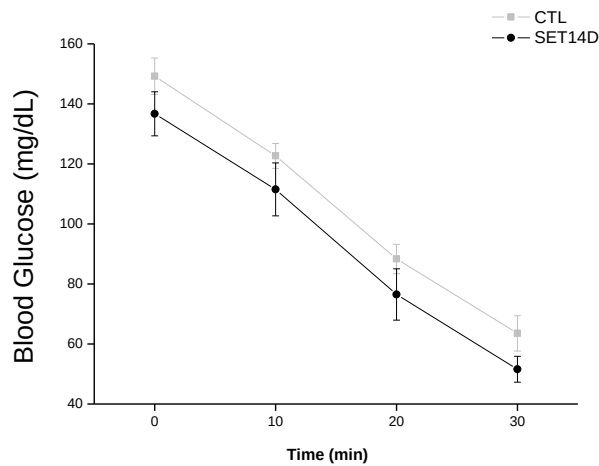
1.

A.

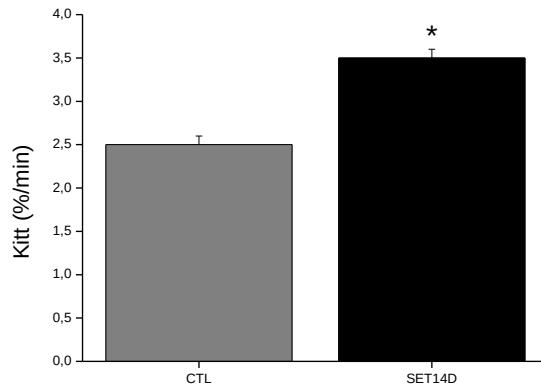


2.

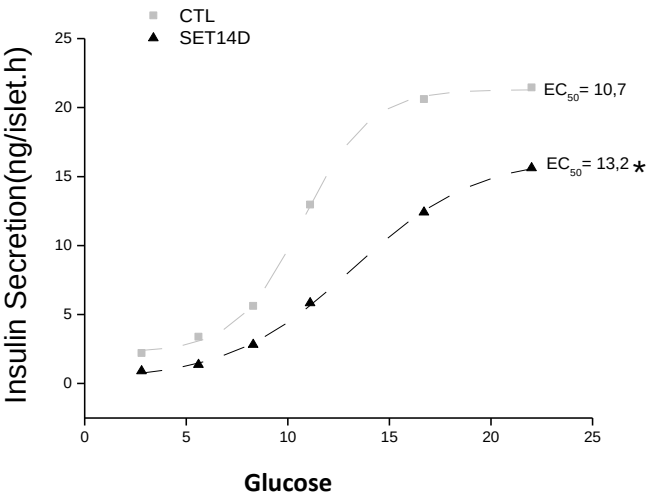
(A)



(B)

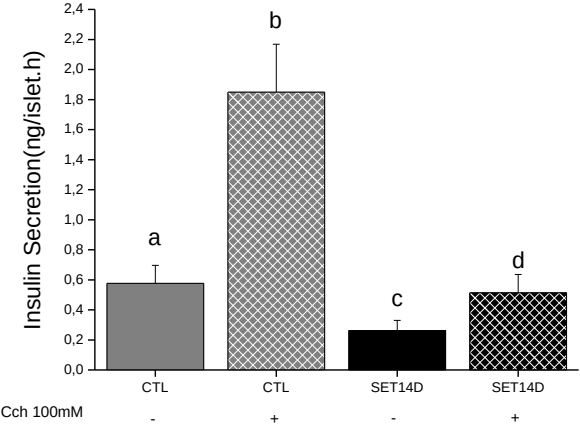


3.

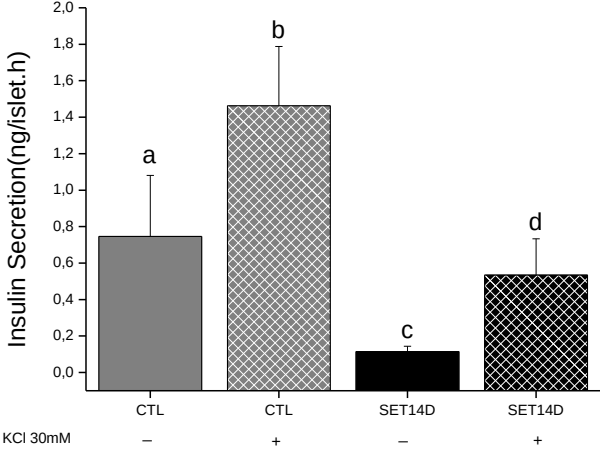


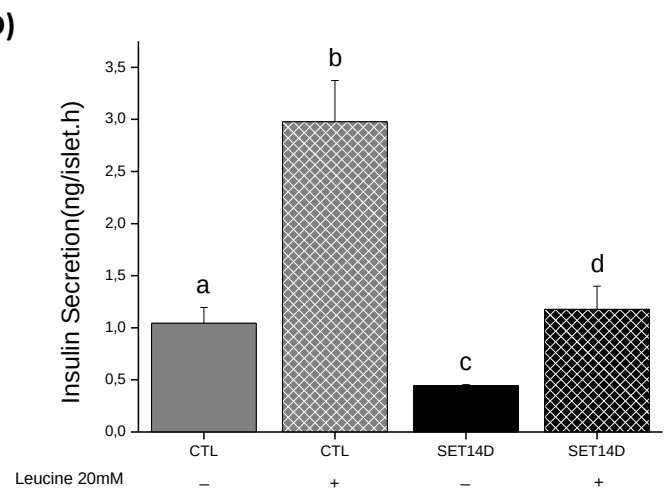
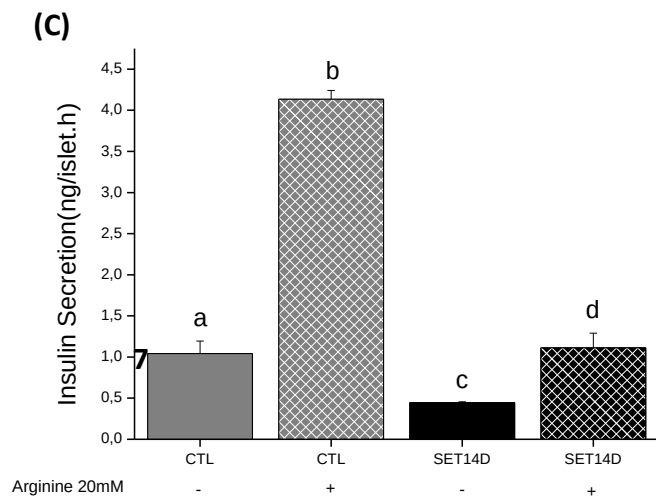
4.

(A)

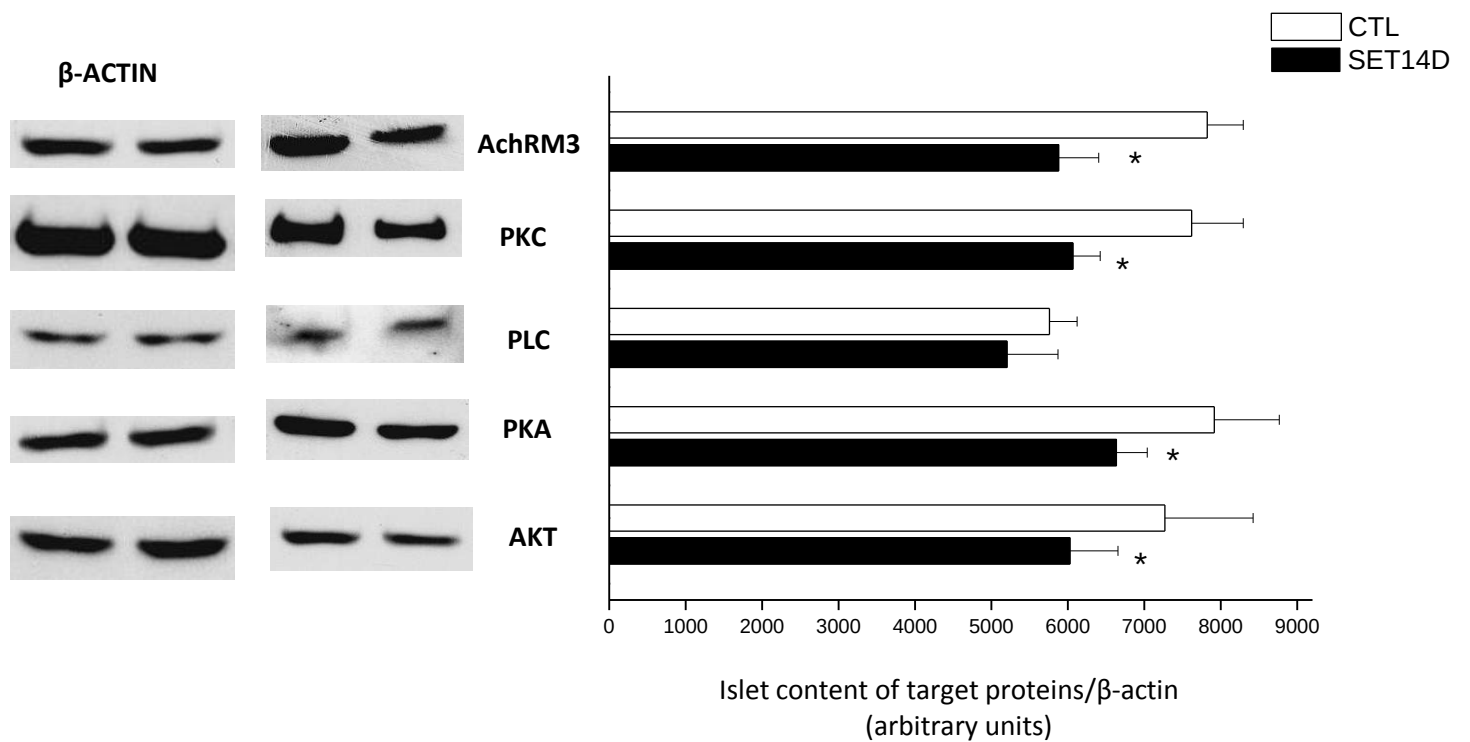


(B)





5.



CHARACTERIZATION OF PANCREATIC ISLET INFLAMMATION STATUS IN CACHECTIC SOLID EHRlich TUMOR-BEARING MICE.

Natalia M Violato, #Paula Oliver, #Andrew Palou, José Roberto Bosqueiro

**Department of Physical Education, Faculty of Sciences, São Paulo State University (UNESP), Bauru, SP, Brazil.*

#Department of Biochemistry and Nutrition, University of Balearic Islands, Palma, Mallorca, Spain.

Corresponding author. Tel.: +55 14 3103 6041

Email address: bosqueir@fc.unesp.br (Bosqueiro, JR)

ABSTRACT

The cachexia syndrome is characterized by several homeostatic perturbations including depletion of muscle and fat tissue, hypoglycemia, accompanied by progressive wasting, weakness and anorexia. The cancer cachexia syndrome, which affects a large proportion of patients with solid tumor, is associated not only with decreasing quality of life but also with a shorter survival time and poor response therapy. The imbalance in glycemic homeostasis and the increase of inflammatory response caused by tumoral development are among the main factors involved in the establishing the cachectic syndrome. In previous studies we noted the establishment of cachexia in solid Ehrlich carcinoma bearing-mice. These animals have reduced insulin secretion and decrease in expression of proteins important in insulin signaling pathway, like PKA- α , M3 and AKT. With all these results, numerous opportunities for study appeared, among them the establishment of inflammatory response in islets. Thus, the purpose of this study was to evaluate components of islet inflammatory response of cachectic solid Ehrlich carcinoma bearing mice. The results showed that SET group exhibited significantly increased cytokines levels as well as over-expression of toll-like receptors 3 and 4 in islet of Langerhans when compared to CTL group. Furthermore, slides with pancreas sections showed lymphocyte infiltrate in islet periphery and lipid accumulation in exocrine

tissue. These results demonstrate that there is an inflammatory status developing in cachectic SET group but additional results are needed to affirm whether the inflammation is responsible for alterations in insulin secretion in SET group.

INTRODUCTION

A shared characteristic of chronic diseases associated with development of cachexia is the establishment of systemic inflammation leading the host to the overproduction of pro-inflammatory cytokines. Cells of innate immune system, such as macrophages and dendritic cells, act as sentinels that detect microbial infection and tissue damage by recognizing common molecular patterns. In response, these cells release pro-inflammatory cytokines, which act in a paracrine and endocrine fashion. In this way, a local signal of damage or danger is amplified and distributed to distal sites of action, resulting in a common immunological and behavioral response to sickness (Grossberg *et al.*, 2010).

Cancer cachexia is characterized as a multifactorial syndrome defined by an ongoing loss of skeletal muscle mass (with or without loss of fat mass) that cannot be fully reversed by conventional nutritional support and leads to progressive functional impairment. The pathophysiology of cancer cachexia is complex but it seems to involve a coordinated series of mechanisms. Among others, profound neuroendocrine changes leading to anorexia and metabolic chaos play an important role in the onset and maintenance of wasting (Seelaender *et al.*, 2012).

In the last decade, it is becoming consistently clear that systemic inflammation could be considered the common denominator of the many clinical and metabolic consequences of cancer cachexia (Deans & Wigmore, 2005). The overproduction of pro-inflammatory cytokines leads to malfunction of several organs as liver, muscle and adipose tissue and act in the progression of cachexia (Argilés *et al.*, 2006). Nevertheless, the lack of information regarding the resolution of chronic inflammation in cachexia have been limited our complete understanding.

Among all the symptoms involved in cancer cachexia establishment, alterations in carbohydrate metabolism play a pivotal role. The association between alterations in glucose metabolism and cancer cachexia has been noted in cancer patients since 1919 (Asp *et al.*, 2010). An important aspect of tumor development is the use of glucose as the primary energy source and about 50% of its energy came from glycolysis (Mathupala *et al.*, 1995).

However, studies involving alterations in carbohydrate metabolism in cancer cachexia are still unclear and contradictory. Glucose intolerance was the earliest recognized metabolic abnormality in cancer patients (Rohdenburg et al., 1919) leading to type II diabetic status with insulin resistance (Tayek, 1992). On the other hand, glucose intolerance also is detected in cancer patients associated with defective insulin secretion and in other cases of weight-losing patients, insulin secretion is normal or increased (Argilés *et al.*, 1997).

The process of pancreatic islet dysfunction and apoptosis has been studied in the context of the pathogenesis of type I and II diabetes mellitus. Death of pancreatic islet in culture, changes in insulin secretion and much of our understanding of the effects of inflammatory cytokines is derived from these studies (Cnop *et al.*, 2005). The islet inflammation status was named “insulitis” and has been already suggest that high levels of cytokines may be responsible for beta cell death by activation of apoptotic pathways (Eizirik & Mandrup-Poulsen, 2001).

Moreover, considering that glucose is an important fuel for tumor growing and its imbalance can lead to cachexia establishment, understand possible alterations in endocrine pancreas became important. In this scenario, there are no studies involving beta cell inflammation and alterations in insulin secretion in cancer cachexia establishment. Therefore, here we investigated the inflammatory status of beta cell in order to clarify possible factors involved in carbohydrate metabolism alterations in cancer cachexia development.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Swiss mice (*Mus musculus* - 45 days of age) from the São Paulo State University were maintained at 24°C on a 12-h light/dark cycle. A total of 80 mice were divided randomly into 2 groups (40 per group). In the control group (CTL) saline solution was injected and in SET14D group Ehrlich tumor cells was inoculated as described below. Animals were killed by CO₂ exposure, followed by decapitation at 14 days of inoculation. During the experimental period, the mice had free access to food and water. The experiments reported here were approved by the Ethics Committee on Animal Experiments (CEEAA), São Paulo State University (UNESP-Bauru).

Solid Ehrlich tumor inoculation

This neoplasia, a spontaneous mammary tumor in mice, does not resolve spontaneously. It may evolve to ascitic or solid forms depending on the route of inoculation (intraperitoneal or subcutaneous respectively). In this study, the tumor was maintained in the ascitic form in Swiss mice and the cells were collected after seven days of intraperitoneal (i.p.) inoculation (Silva *et al.*, 2002). Tumor cells were collected by aspiration with a Pasteur pipette, centrifuged (Eppendorf Centrifuge 5810R, Hamburg, Germany) for 10min at 200g, and washed twice with phosphate-buffered saline (pH7.2). Cell viability was evaluated by trypan blue exclusion test and only cell suspensions that presented more than 95% viability were used. Tumor cells ($1 \times 10^7/100 \mu\text{l}$) were inoculated subcutaneously into the SET14D group.

Islets isolation protocol

Islets were isolated by collagenase type V (Sigma, St Louis, Mo) digestion of the pancreas as described (Lacy & Kostianovsky, 1980) with modifications (Boschero *et al.*, 1980).

Western Blotting assay

After isolation by collagenase digestion and subsequent separation, groups of 300 freshly isolated islets were pelleted by centrifugation and then resuspended in 50 to 100 μL of homogenization buffer containing protease inhibitors, as previously described (Rafacho *et al.*, 2008). The islets were sonicated during 15 seconds (Fisher Scientific/model 100, Pittsburgh, PA, USA), and total protein content was determined by the Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) method. The sample volume was adjusted to provide the same amount of protein added to each lane. Samples containing 50 μg of protein from each experimental group were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to nitrocellulose membranes, and stained with Ponceau S to confirm the efficiency of the electrotransference. IL-8 (interleukin-8), IL-6(interleukin-6), IFN- γ (interferon-gamma), IFN- α (interferon-alpha), TNF- α (tumor necrose factor-alpha) and IL-1 β (interleukin-1beta) proteins were detected in the membrane after 2 hours of incubation at room temperature with a rabbit polyclonal antibody against IL-8 (diluted 1:200), IL-6 (diluted 1:150), IFN- γ (diluted 1:250), IFN- α (diluted 1:200), TNF- α (diluted 1:100), and IL-1 β (1:200). All antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) and were diluted in TBS – Tween 20 containing 3g/L dry skimmed milk. Detection was performed using enhanced chemiluminescence (SuperSignalWestPico; Pierce, Rockford, IL) after incubation with a horseradish peroxidase–conjugated secondary antibody. Bands intensities were quantified by optical densitometry (ScionImage, Frederick, MD) of the developed autoradiogram. The values were normalized by β -actin (1:1000) levels.

Real time RT-PCR

Islets were collected and lysed with Trizol® reagent, mRNA was isolated using Dynabeads mRNA direct kit (Invitrogen) and reverse transcribed as described previously (Moore *et al.*, 2009). Quantitative RT-PCR was done using TAQman kit on a step One plus machine, and values were compared with a standard curve. Expression values of the genes of interest were corrected by the housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and were normalized by the control value in the experimental series considered as 1. Primer sequences for toll-like 3, 4 and 9 were:

TLR3- F-GTTCCACAAGAGCCGGAAGGTT/R-AGATGATGCCAGAGCGGTGC.

TLR4- F-ACGCAGCGCCCAAACCTCTCC/R-GGCCAGGCAGCCAATCTCGG.

TLR-9- F-ACGCAGCGCCCAAACCTCTCC/R-GGCCAGGCAGCCAATCTCGG

Histological analysis

Analysis of HE Slides

The islets of SET14D group and were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) for 24 h and were embedded in Paraplast (Sigma-Aldrich Co, USA). Histological sections (5 µm) were stained with Hematoxylin/Eosin for quantitative and qualitative analysis. A total of 30 microscopic fields (200x magnification) from at least five animals per group were randomly digitalized and analyzed.

Immunohistochemistry

For CD3 detection, paraplast sections (5 µm) from all experimental groups were pretreated with the citric acid monohydrate antigen retrieval method. Next, they were immunostained with mouse monoclonal antibodies against CD3 (Bioss- BSB5141) at 1:10.

Statistical analysis

Results were reported as mean±S.E.M. of the indicated number of experiments. Unpaired Student's t-test was used for comparisons of two groups. The significance level adopted was $P < 0.05$.

RESULTS

Solid Ehrlich tumor bearing mice had increase in protein expression of key cytokines involved on cachexia establishment.

We analyzed the expression of IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-6 and IFN- α . SET14D group showed higher expression of the key cytokines involved on cachexia establishment when compared to CTL group (Table 1). These cytokines are also related with beta cell inflammation in other chronic diseases such as diabetes mellitus. These results suggest an inflammation status in beta cell in this model of cancer cachexia.

Solid Ehrlich tumor bearing mice had increase in mRNA expression of toll-like receptors involved in inflammation development in beta cell.

We analyzed mRNA expression of toll like receptors 3, 4 and 9 in pancreatic islands. The results showed that solid ehrlich tumor-bearing mice exhibited significantly increase ($P < 0.05$) in mRNA expression of toll like receptor 3 (figure 7) and 4 (Figure 8), but no difference in expression of toll like 9 (figure 9). The graphics values represents cycle percent. Toll like receptors are involved in the establishment of inflammatory status. These results associated with high levels of cytokines evidences inflammation development in islets.

Solid Ehrlich tumor bearing mice had lymphocyte infiltration in islets of Langerhans periphery, edema and lipid content.

The slides stained with hematoxilin/eosin showed edema development inside the islets of SET group (figure10), cell infiltration (figure 10) and lipids accumulation in islets periphery. After that, we stained for lymphocyte by immunochemistry and SET group showed lymphocyte infiltration in 90% of the slides (figure 12). We analyzed 30 slides of each group and CTL group showed no changes.

DISCUSSION

Here, we investigate pancreatic islet inflammation status in control and cachectic solid Ehrlich tumor bearing mice. Our results indicate that SET group after 14 days of tumor inoculation had pancreatic islet inflammation status compared to CTL group. The main indications supporting this assumption reside on islet cytokine levels that are enhanced in SET group as well as mRNA levels of toll like receptor (TLR) 3 and 4. More than that, histological analysis showed lymphocyte infiltration in islet periphery associated with fat accumulation and edema development inside islets. The results found here characterize a status named “insulitis” according to Eizirik *et al.* (2009).

It is well understood that systemic inflammation, in particular the high levels of cytokines, play a pivotal role on degradation of tissues like muscle and adipose tissue in cancer cachexia progression. The presence of IL-6 and TNF- α enhanced muscle proteolysis via ubiquitin-proteasome pathway (Melstrom *et al.*, 2007). Moreover, overexpression of TNF- α induced lipolysis and stimulated loss of appetite by acting on hypothalamus (Rydén *et al.*, 2004; Laurencikienė *et al.*, 2007). Nevertheless, there are no studies associating islet inflammation with alterations in carbohydrates metabolism or alterations in pancreatic function.

Pancreatic islet inflammation (insulitis) has been reported in association with other chronic diseases as diabetes mellitus (Eizirik, 2009). In type 1 diabetes, high levels of IL-6 was detected in islets suggesting an action on beta cell death (Neurath *et al.*, 2011). A recent study showed that a combination of high levels of TNF- α + IFN- γ or IL-1 β + IFN- γ induced up-regulation of pro-apoptotic genes as PUMA and inactivation of anti-apoptotic genes as Bcl-XL in isolated islets (Barthson *et al.*, 2011). Islets chronic exposure to some cytokines such as IL-1 β , TNF- α and IFN- γ inhibits insulin secretion and induces apoptosis of normal beta cells in the presence or absence of stimulatory glucose concentration (Wang, 2010).

Increased cytokines levels in SET group could be explained by lymphocyte infiltration in islet periphery. Lymphocyte and macrophages are the most important cytokines producers and tissue chronic exposure to these cells can lead to severe inflammation (Steinke & Borish, 2006). However, islets cells also can produce cytokines against injury (Wang *et al.*, 2010), and these cytokines overexpression on SET group could be the sum of islet and lymphocyte cytokine production.

Another found that supports the hypothesis of islet inflammation in SET islets reside on overexpression of TLRs. SET group showed increased mRNA levels of TLR3 and TLR4. Pancreatic islets express TLR2, TLR3, TLR4 and TLR9, and TLR3 and TLR4 are expressed at high levels (Eizirik, 2009). The islet expression of TLRs is normally up-regulated by virus presence and infection but high levels of IL-1 β and IFN- γ have already been demonstrated up-regulate TLR3 and TLR4 (Hultcrantz *et al.*, 2007). This data suggest that cytokine overexpression in SET group could be responsible for TLRs up-regulation. Furthermore, as cytokines, TLR3 can induce beta cell apoptosis and cytokine production by islet when in association with dsRNA, which is derived from damage or dying cells (Rasschaert *et al.*, 2005).

In this scenario, the lipid concentration found in islets periphery of SET group became important. Several studies have been suggested that high levels of TLR3 are involved in the

imbalance of lipid and cholesterol homeostasis (Castrillo et al., 2003; Wu *et al.*, 2012). Moreover, a recent study demonstrated that mice lacking for TLR3 in association with high fat diet exhibited improve in liver steatosis and inflammation (Wu *et al.*, 2012).

Furthermore, pancreatic steatosis caused anomalies of pancreas islet cell leading to alterations in glycemia (Yin *et al.*, 2004). Some authors suggested that pancreatic islet cell damage is accompanied by hyperlipidemia that plays an important role in the generation of type 2 diabetes mellitus (Lee *et al.*, 2009). Besides, SET group exhibited edema inside islets, a common characteristic of “insulitis”.

Together, these data support the fact that cachectic solid bearing animals develop an inflammatory status in pancreatic tissue, mainly in islets. It is well clear that inflammation plays a pivotal role in islet damage. The most important cytokines involved in “insulitis” development as IL-1 β , IFN- γ and TNF- α are enhanced on SET group. Moreover, lipid accumulation associated with high levels of TLR3 could act in the progression of inflammation and damage of the islets.

In summary, islets from cachectic SET animals showed inflammation status. Inflammation is an important factor associated with cancer cachexia progression and this knowledge may contribute to clarify possible factors involved in the alterations of insulin secretion and carbohydrate metabolism observed in these animals.

TABLES

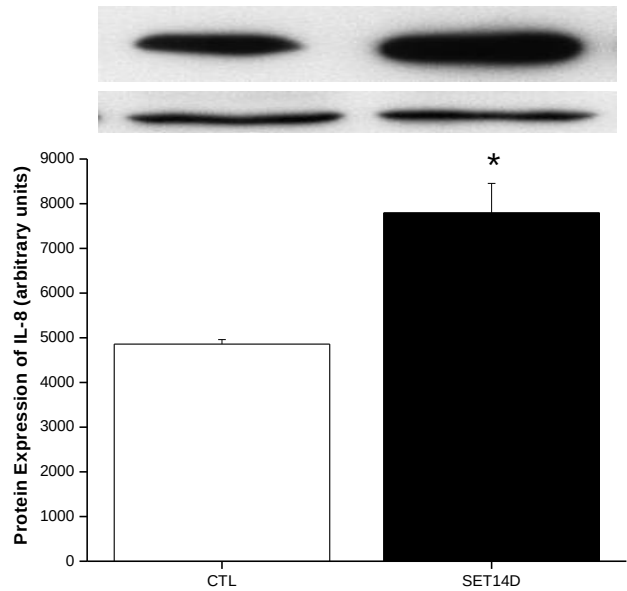
Table 1- Values of protein expression in islets from control and solid Ehrlich tumor bearing mice.

CYTOKINES	CTL (a.u)	SET14D (a.u)
IL-8	4856.2 $\pm$ 703.2	7792.2 $\pm$ 661.7*
IL-6	3332.7 $\pm$ 742.9	7382.2 $\pm$ 1239.0*
IFN- γ	5427.5 $\pm$ 219.2	7699 $\pm$ 371.0*
IFN- α	3749.7 $\pm$ 628.4	6752.2 $\pm$ 672.0*
TNF- α	5486.6 $\pm$ 430.3	7078 $\pm$ 372.9*
IL-1 β	3250.7 $\pm$ 336.5	5256.2 $\pm$ 378.3*

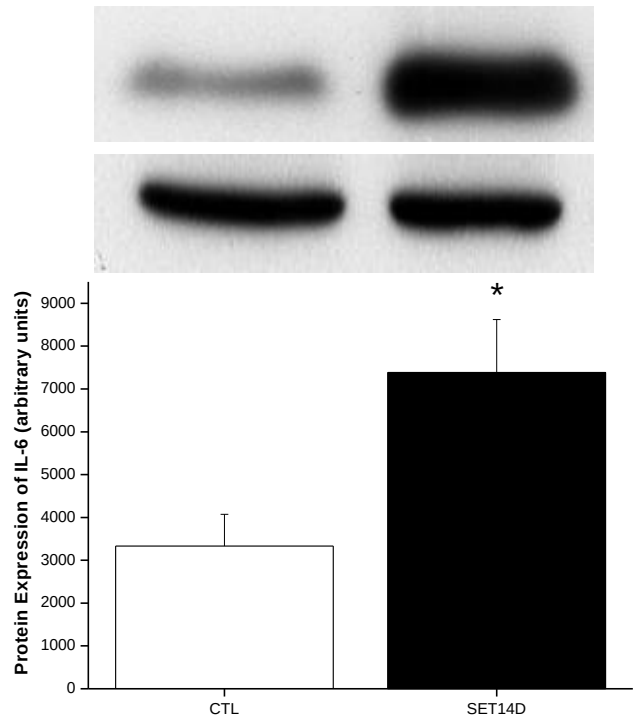
Data represented in arbitrary units (a.u.)/ β -actin. Mean $\pm$ S.E.M. * Significantly different vs. CTL (P<0.05 using student's t-test. N=4).

FIGURES

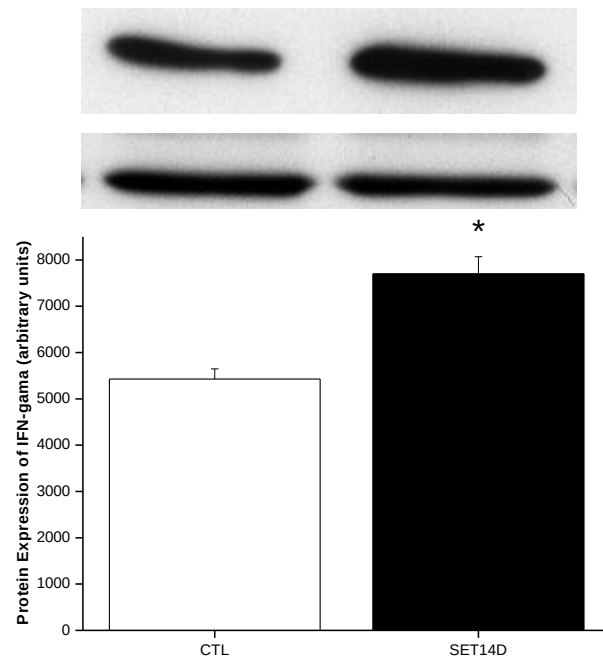
1.



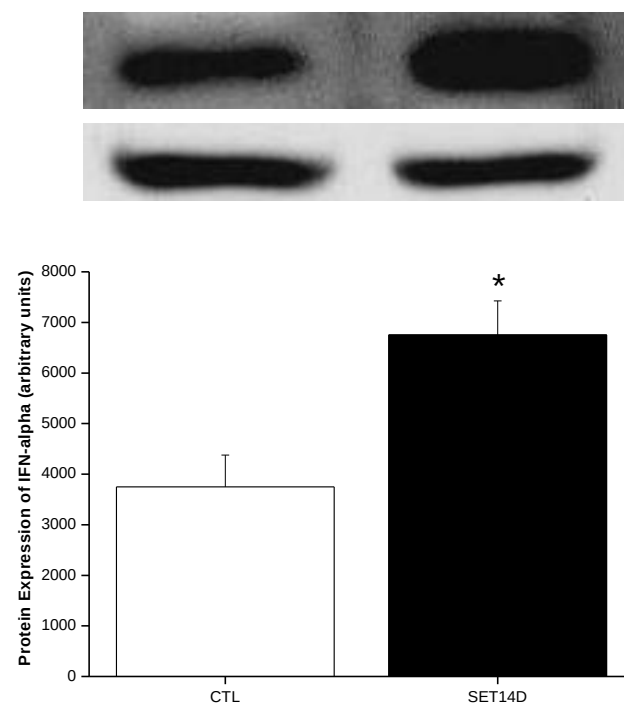
2.



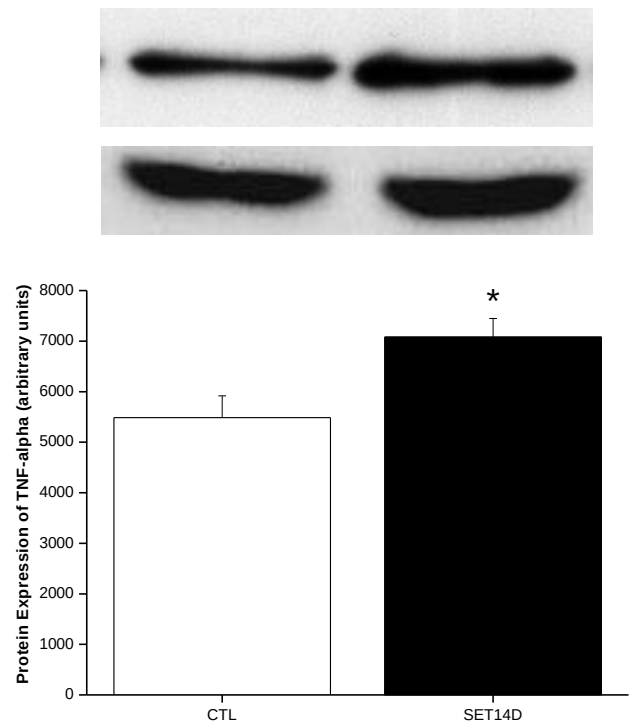
3.



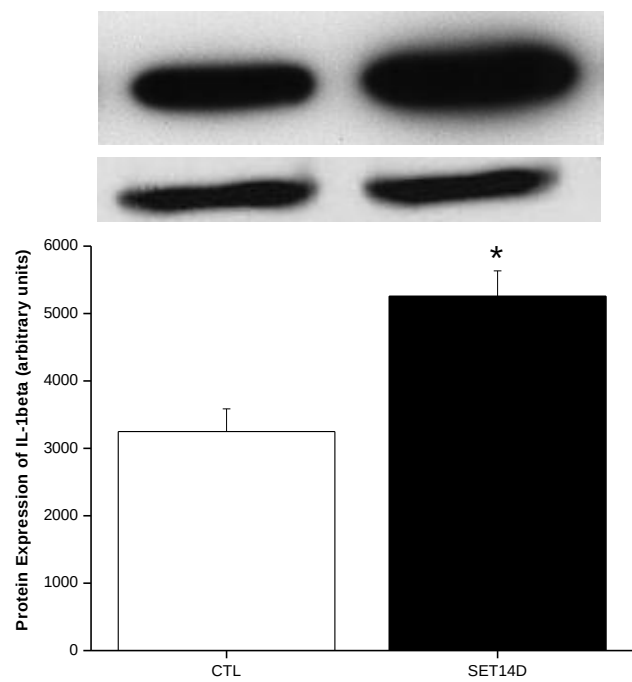
4.



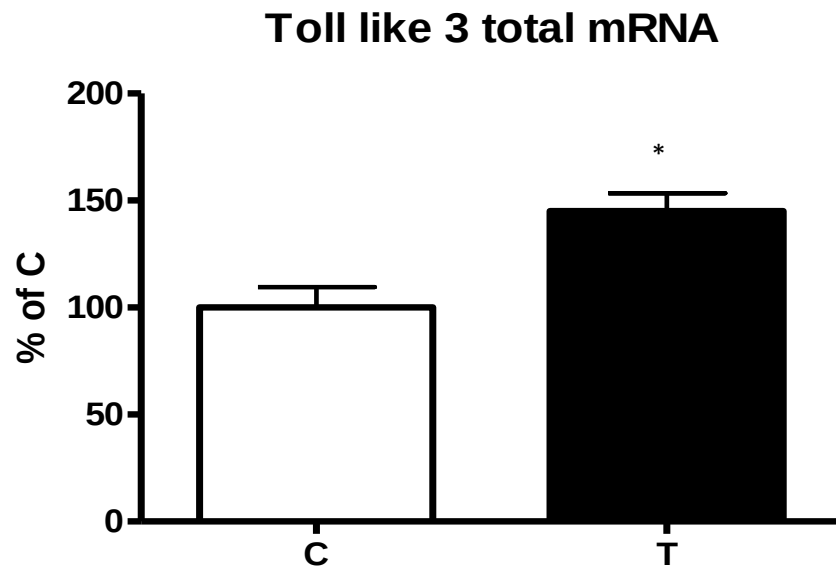
5.



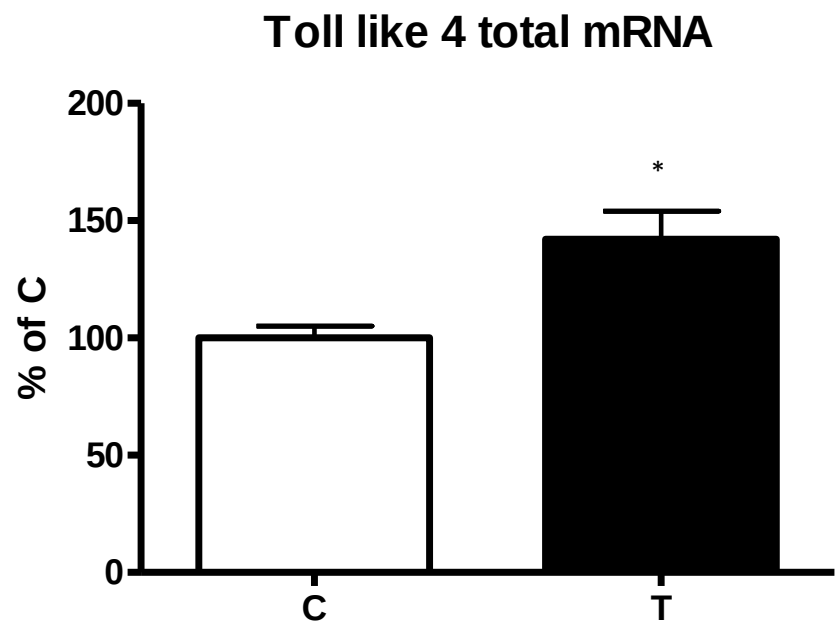
6.



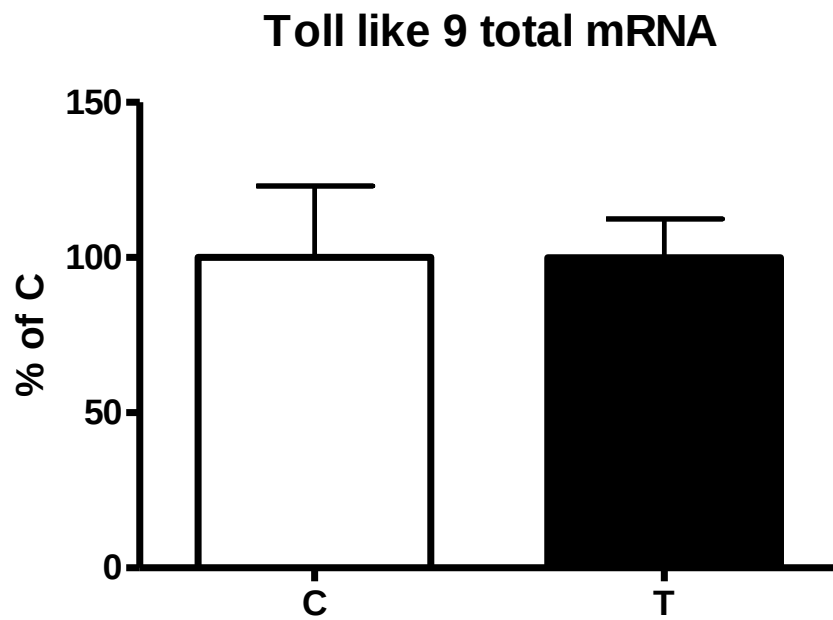
7.



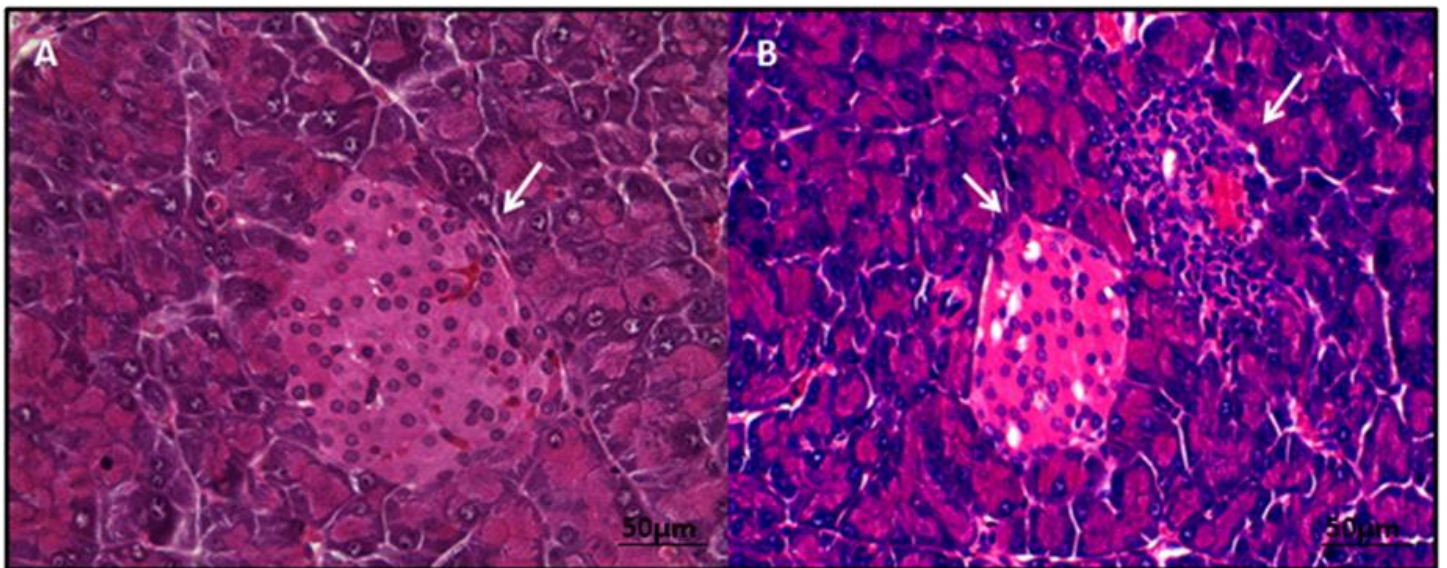
8.



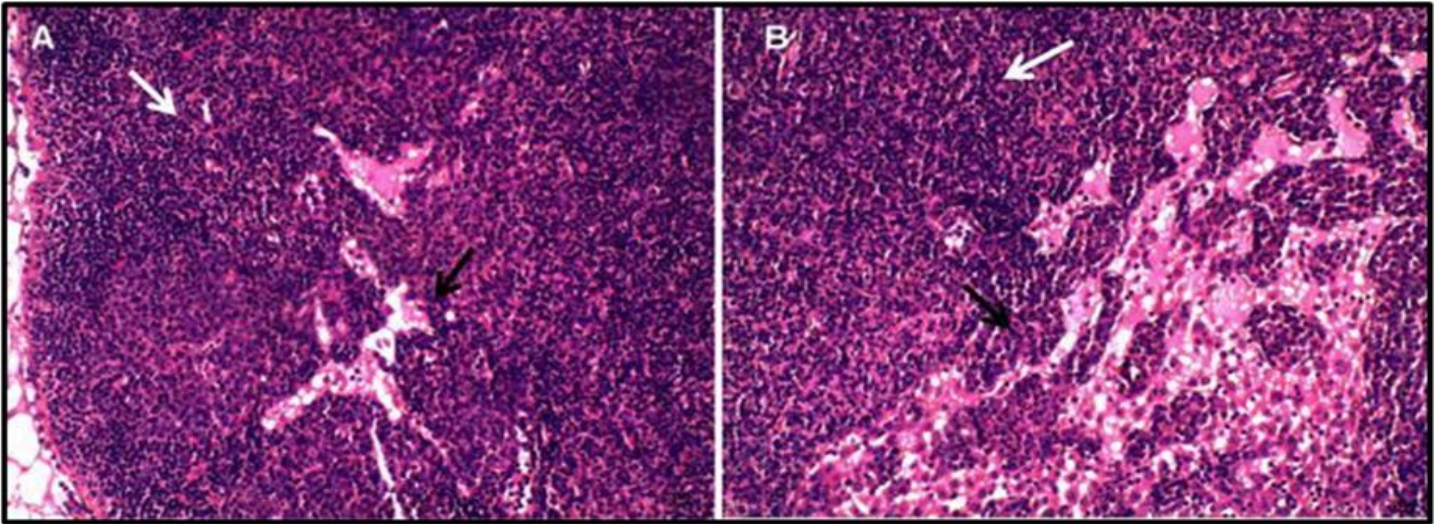
9.



10.



11.



12.

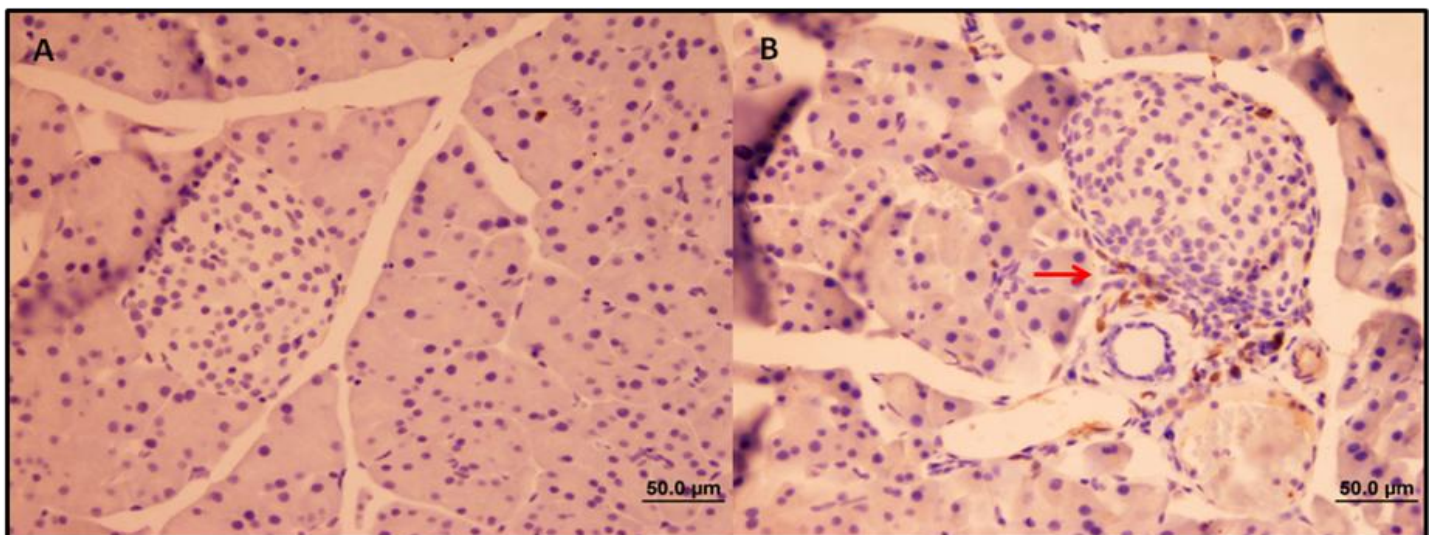


FIGURE LEGENDS

1. Effect of Solid Ehrlich tumor presence in protein expression of IL-8 by Western blotting. Expression of IL-8 is increased in islets from SET14D mice compared with CTL. Data are mean $\pm$ SEM. *Significantly different versus CTL. $P<0.05$, $N=4$, Student's t-test.
2. Effect of Solid Ehrlich tumor presence in protein expression of IL-6 by Western blotting. Expression of IL-6 is increased in islets from SET14D mice compared with CTL. Data are mean $\pm$ SEM. *Significantly different versus CTL. $P<0.05$, $N=4$, Student's t-test.
3. Effect of Solid Ehrlich tumor presence in protein expression of IFN- γ by Western blotting. Expression of IFN- γ is increased in islets from SET14D mice compared with CTL. Data are mean $\pm$ SEM. *Significantly different versus CTL. $P<0.05$, $N=4$, Student's t-test.
4. Effect of Solid Ehrlich tumor presence in protein expression of IFN- α by Western blotting. Expression of IFN- α is increased in islets from SET14D mice compared with CTL. Data are mean $\pm$ SEM. *Significantly different versus CTL. $P<0.05$, $N=4$, Student's t-test.
5. Effect of Solid Ehrlich tumor presence in protein expression of TNF- α by Western blotting. Expression of TNF- α is increased in islets from SET14D mice compared with CTL. Data are mean $\pm$ SEM. *Significantly different versus CTL. $P<0.05$, $N=4$, Student's t-test.
6. Effect of Solid Ehrlich tumor presence in protein expression of IL-1 β by Western blotting. Expression of IL-1 β is increased in islets from SET14D mice compared with

CTL. Data are mean $\pm$ SEM. *Significantly different versus CTL. $P<0.05$, $N=4$, Student's t-test.

7. Effect of Solid Ehrlich tumor presence in mRNA total expression of toll-like receptor 3. Expression is increased in islets of SET14D group compared with CTL. Data are mean $\pm$ SEM. *Significantly different versus CTL. $P<0.05$, $N=4$, Student's t-test.
8. Effect of Solid Ehrlich tumor presence in mRNA total expression of toll-like receptor 4. Expression is increased in islets of SET14D group compared with CTL. Data are mean $\pm$ SEM. *Significantly different versus CTL. $P<0.05$, $N=4$, Student's t-test.
9. Effect of Solid Ehrlich tumor presence in mRNA total expression of toll-like receptor 9. Expression is not different between groups. Data are mean $\pm$ SEM, $N=4$, Student's t-test.
10. Representative images of pancreas sections. SET14D showed cell infiltration around vessel and edema inside the islets (B), (arrows indicate infiltration and edema). CTL group not show infiltration and edema (A), (arrow indicate islet). Scale bars-50 μ m, Hematoxilin/Eosin, $N=7$, $P<0.05$, Student's t-test.
11. Representative images of pancreas sections of SET14D group (A and B). Black arrows indicate lipid accumulation in exocrine pancreas. White arrows indicate severe infiltration in exocrine pancreas around lipid accumulation. Scale bars-50 μ m (A and B), Hematoxilin, $N=7$, $P<0.05$, Student's t-test.
12. Representative images of pancreas sections stained for CD3 cells. SET14D showed CD3 infiltration around the islet (B), (arrows indicate infiltration by CD3). CTL group not show infiltration (A). Scale bars-50 μ m, Hematoxilin, $N=7$, $P<0.05$, Student's t-test.

REFERENCES

- Argilés JM, Alvarez B, López-soriano FJ. The metabolic basis of cancer cachexia. *Med Res Rev.* 1997;17:477-498.
- Argilés JM, Busquets S, López-Soriano FJ. Cytokines as mediators and targets for cancer cachexia. **Cancer Treatment and Research**, v.130, p.199-217, 2006.
- Asp ML, Tian M, Wendel AA, et al. Evidence for the contribution of insulin resistance to the development of cachexia in tumor-bearing mice. *Int J Cancer.* 2009;126:756-763.
- Barthson J, Germano CM, Moore F *et al.* Cytokines tumor necrosis factor alpha and interferon gamma induce pancreatic beta cell apoptosis through-STAT1 mediated Bim protein activation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.286, p.39632-39643, 2011.
- Boschero AC, Delattre E, Santos ML. Isolamento de ilhotas de Langerhans de rato. *Anais XII Congresso Sociedade Brasileira Fisiologia.* 1980;117.
- Castrillo A, Joseph SB, Vaidya SA *et al.* Crosstalk between LXR and toll like receptor signalling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. **Molecular cell**, v.12, p.805-816, 2003.
- Cnop, M. Welsh, N. Jonas, J.C. *et al.* Mechanisms of pancreatic cell death in type1and type 2 diabetes: many differences, few similarities. **Diabetes**, v. 54, p.97-107, 2005.
- Deans C, Wigmore SJ. Systemic inflammation, cachexia and prognosis in patients with cancer. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v.8, p.265–269, 2005.
- Eizirik DL, Colli ML, Ortis F. The role of inflammation in insulinitis and β -cell loss in type 1 diabetes. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 5, p. 219-226, 2009.
- Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T. A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis. *Diabetologia*, v.44, p.2115-2133, 2001.

- Grossberg, A.J. Scarlett, J.M. Marks, D.L. Hypothalamic mechanisms in cachexia. **Physiology & Behavior**, v. 100, p. 478-489, 2010.
- Hultcrantz M, Huhn MH, Wolf M *et al.* Interferons induce an antiviral state in human pancreatic islet cell. **Virology**, v.367, p.92-101, 2007.
- Lacy PE, Kostianovsky M. Method for isolation of the intact islet of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes*. 1967;16:35-39.
- Laurencikiene J, van Harmelen V, Nordstrom EA, *et al.* NF- κ B is important for TNF- α -induced lipolysis in human adipocytes. **Journal of Lipid Research**, v.48, p.1069-1077, 2007.
- Lee JS, Kim SH, Jun DW *et al.* Clinical implications of fatty pancreas: Correlations between fatty pancreas and metabolic syndrome. **World Journal of gastroenterology**, v.15, p.1869-1875.
- Mathupala SP, Rempel A, Pedersen PL. Glucose catabolism in cancer cells. *J Biol Chem*. 1995;270:16918-16925.
- Melstrom LG, Melstrom KA, Ding XZ, Adrian TE. Mechanisms of skeletal muscle degradation and its therapy in cancer cachexia. **Histology and Histopathology**, v.22, p.805-814, 2007.
- Moore E, Colli ML, Cnop M, *et al.* PTPN2, a candidate gene for type 1 diabetes, modulates interferon-gamma-induced pancreatic beta-cell apoptosis. *Diabetes*. 2009, 58:1283-1291.
- Neurath, FM & Finotto S. IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine and growth factor reviews*, v.22, p.83-89, 2011.
- Rafacho A, Giozzet AGV, Boschero AC, *et al.* Functional Alterations in endocrine pancreas of rats with different degrees of dexamethasone-induced insulin resistance. *Pancreas*. 2008;36:284-293.

- Rasschaert J, Ladriere L, Urbain M *et al.* Toll like receptor 3 and STAT1 contribute to double-standard RNA + interferon gamma-induced apoptosis in primary pancreatic beta-cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v.280, p.33983-33991, 2005.
- Rohdenburg GL, Bernhard A, Krehbiel O. Sugar Tolerance in cancer. *JAMA*;72:1528-1530, 1919.
- Ryden M, Arvidsson E, Blomqvist L, *et al.* Targets for TNF-alpha-induced lipolysis in human adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.318, p.168–175, 2004.
- Seelaender M, Junior MB, Lira F, *et al.* Inflammation in cancer cachexia: To resolve or not to resolve (is that the question?). **Clinical Nutrition**, v.31, p.562-566, 2012.
- Silva RJ, Silva MG, Vilela LC, *et al.* Cytokine profile of Ehrlich ascites tumor treated with Bothrops jararaca venom. *Mediators Inflamm*. 2002;11:197–201.
- Steinke JW, Borish L. 3. Cytokines and chemokines. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v.117, p.S441–S445, 2006.
- Tayek JA. A review of cancer cachexia and abnormal glucose in humans with cancer. *J Am Coll Nutr*. 1992;11:445-456.
- Wang C, Guan Y, Yang J. Cytokines in the Progression of Pancreatic β -Cell Dysfunction. **International Journal of Endocrinology**, v.2010, p.1-10.
- Wu LH, Huang CC, Adhikarakunnatu S *et al.* Loss of toll like receptor 3 function improves glucose tolerance and reduces liver steatosis in obese mice. **Metabolism**, v.61, p.1633-1645.
- Yin W, Liao D, Kusunoki M *et al.* NO decreases ectopic lipid deposition and protects pancreatic beta cells in diet-induced diabetic swine. *J Endocrinology*, v.180, p.399-408.

9- ANEXOS

PARECER

Protocolo n°: 2012-06467

Interessado: José Roberto Bosqueiro

Assunto: Protocolo para uso de animais em EXPERIMENTAÇÃO CIENTÍFICA

1. A utilização de animais na atividade proposta está claramente apresentada e justificada? SIM
2. Os procedimentos experimentais, incluindo dados sobre espécie, sexo, número de animais ser utilizado, condições de alojamento, manipulações experimentais estão claramente descritos? NÃO
Não há especificações quanto ao ambiente (luz, temperatura, etc.) e não foi citada a marca da ração a ser utilizada no tratamento dos animais (item 5.4).
3. Número total de animais solicitados: 60
A quantidade de animais solicitada é adequada para o desenvolvimento dos protocolos experimentais ou das aulas práticas? SIM
4. Os procedimentos têm o potencial de causar dor ou desconforto aos animais? SIM
5. Em caso de resposta afirmativa para o item anterior serão empregados métodos para alívio destas condições? NÃO
6. Caso não esteja previsto o emprego destes métodos, existem justificativas para tal fato?
SIM
Você considera essa justificativas válidas e/ou pertinentes? SIM
A avaliação de reações orgânicas em experimentação com inoculação de tumores implica na sua instalação e progressão com manifestação de quadros clínicos de caquexia e morte dos animais. Entretanto, para a realização dos estudos justificados não foram encontrados meios de suprimir ou aliviar tais condições sem comprometer os dados a serem coletados e ocorrer em possível erro nos resultados.
7. Existem referências recentes em revistas de bom nível na área empregando metodologia semelhante no que concerne à experimentação animal?
SIM
8. Avaliação geral da solicitação
O projeto de pesquisa está bem fundamentado e excetuando pequenas correções não observamos motivos para sua desaprovação.

Esta Comissão solicita e compromete-se a manter total sigilo ao conteúdo da solicitação enviada e do parecer gerado.

Araçatuba, 11 de dezembro de 2012

Parecer emitido por: Renata Callestini Felipini

Renata Callestini Felipini
Assinatura