



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Clarice Fraga Esteves Maciel Osorio

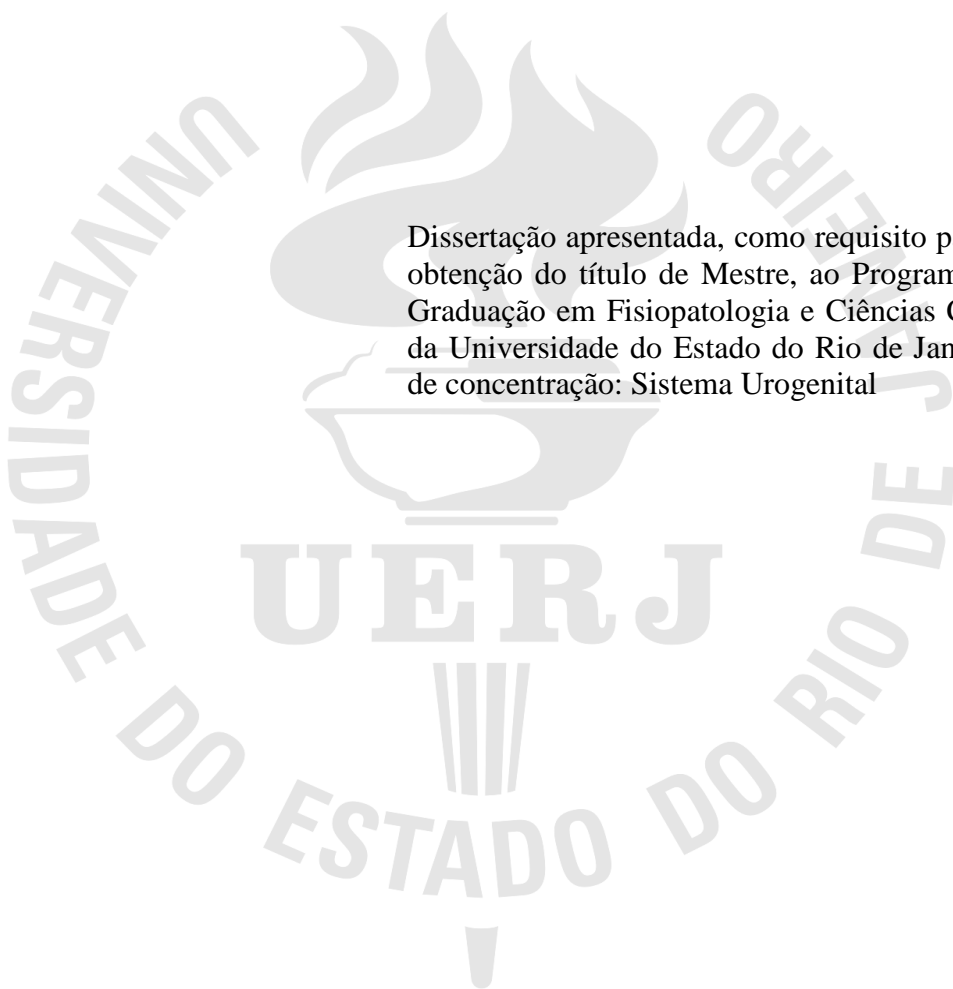
Expressão da leptina e seu receptor no câncer de próstata

Rio de Janeiro

2014

Clarice Fraga Esteves Maciel Osorio

Expressão da leptina e seu receptor no câncer de próstata



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema Urogenital

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio

Coorientador: Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza

Rio de Janeiro

2014

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

O84 Osorio, Clarice Fraga Esteves Maciel.
Expressão da leptina e seu receptor no câncer de próstata / Clarice Fraga
Esteves Maciel Osorio. – 2014.
77 f.

Orientador: Francisco José Barcellos Sampaio.
Coorientador: Diogo Benchimol de Souza.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências
Cirúrgicas.

1. Próstata - Câncer – Teses. 2. Leptina – Teses. 3. Receptores para
Leptina. 4. Prognóstico – Teses. I. Francisco José Barcellos Sampaio. II.
Souza, Diogo Benchimol. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 611.637

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Clarice Fraga Esteves Maciel Osorio

Expressão da leptina e seu receptor no câncer de próstata

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema Urogenital

Aprovada em 12 de março de 2014.

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Diogo Benchimol de Souza

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Waldemar Silva Costa

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Carla Braga Mano Gallo

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Maurício Gonçalves Rubinstein

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2014

DEDICATÓRIA

Ao meu marido Luiz Felipe Fernandes Osorio.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores e professores da pós-graduação.

RESUMO

OSORIO, Clarice Fraga Esteves Maciel. **Expressão da leptina e seu receptor no câncer de próstata**. 2014. 77f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

O câncer de próstata é o tumor não cutâneo mais comum entre homens e responsável pela segunda maior mortalidade entre os tumores neste sexo. Diferentes métodos são utilizados com o objetivo de determinar o prognóstico do paciente portador de câncer de próstata, contudo existe grande heterogeneidade quando estes são usados individualmente. A leptina é um hormônio peptídico envolvido na regulação da ingestão alimentar, do metabolismo, do gasto energético, além de função neuroendócrina. Este hormônio parece estar envolvido na patogênese de alguns tipos de tumores, inclusive os adenocarcinomas de próstata. Até o presente não se tem certeza se a leptina e seu receptor possam ser utilizados como fatores prognósticos no câncer de próstata. O objetivo do trabalho foi correlacionar os perfis de imunomarcagem da leptina e seu receptor em adenocarcinomas de próstata com diferentes fatores prognósticos e comparar as análises de imunomarcagem da leptina e seu receptor em adenocarcinomas de próstata por métodos semiquantitativos e quantitativos (morfometria). Foram analisadas 532 peças cirúrgicas de prostatectomias radicais por câncer prostático. A partir destas amostras, após estudo histopatológico, foi montado um arranjo de matriz tecidual, contendo fragmentos de áreas tumorais e não tumorais (peritumorais) destas amostras. Estas foram imunomarcadas com anticorpos antileptina e antirreceptor de leptina. Análises subjetivas (feitas por dois observadores) e objetivas (através da contagem de pontos) foram realizadas em cada uma das imunomarcações. Estes resultados foram comparados e correlacionados com os seguintes fatores prognósticos: invasão perineural, embolização neoplásica vascular, comprometimento bilateral da próstata, invasão das vesículas seminais, comprometimento de margem vesical, de margem uretral e de margem cirúrgica de ressecção. Houve diferença significativa entre as análises subjetivas dos dois observadores e, portanto, estas não foram utilizadas para as demais comparações. Em relação às análises objetivas, foi verificado que a expressão do receptor de leptina estava diminuída nos tumores com comprometimento de margem cirúrgica, de margem uretral e de vesículas seminais. Ainda foi observado correlação entre a expressão desse receptor e o somatório dos fatores prognósticos analisados. Para as demais análises não foi verificada diferença significativa. Métodos semiquantitativos podem ter grande variação e devem ser preteridos em relação a métodos quantitativos para as análises realizadas neste estudo. Nem a leptina nem o seu receptor apresentaram alterações de sua expressão em amostras neoplásicas de próstata quando comparado àquelas não neoplásicas. O receptor de leptina apresentou uma diminuição da sua expressão em tumores com margem cirúrgica comprometida, margem uretral comprometida e com vesículas seminais comprometidas. Houve correlação negativa entre o percentual de área imunomarcada com o anticorpo antirreceptor de leptina e o somatório dos fatores prognósticos analisados.

Palavras chave: Câncer de próstata. Leptina. Receptor de leptina. Fatores prognósticos.

ABSTRACT

OSORIO, Clarice Fraga Esteves Maciel. **Leptin and leptin receptor expression in prostate cancer**. 2014. 77f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Prostate cancer is the most common non-cutaneous tumor among men and accounted for the second highest mortality rate among tumors in this sex. Different methods are used to determine the prognosis of patients with prostate cancer, yet there is great heterogeneity when they are used individually. Leptin is a peptide hormone, involved in the regulation of food intake, metabolism, energy expenditure, and neuroendocrine function. This hormone appears to be involved in the pathogenesis of some types of tumors, including prostate adenocarcinomas. Up to the present, it is uncertain if leptin and its receptor may be used as prognostic factors in prostate cancer. The objective of this study was correlate the profiles of immunostaining of leptin and its receptor in prostate adenocarcinomas with different prognostic factors and compare the analysis of immunostaining of leptin and its receptor in prostate adenocarcinomas by semi quantitative and quantitative methods (morphometry). A total of 532 surgical specimens from radical prostatectomies from prostate cancer had been studied. After pathological examination, these samples were included in a tissue microarray containing fragments of tumoral and non-tumoral areas (peritumoral areas). These were immunostained with antibodies antileptin and antileptin receptor. Subjective analysis (made by two observers) and objective (by counting points) were performed on each sample. These results were compared and correlated with the following prognostic factors: perineural invasion, neoplastic vascular embolization, bilateral involvement of the prostate, seminal vesicle invasion, involvement of vesical margin, involvement of urethral margin and involvement of resection surgical margin. There were significant differences between subjective analyses of the two observers, and, therefore, they were not used for other comparisons. Regarding the objective analysis, it was found that leptin receptor expression was reduced in tumors with involvement of the surgical margin, urethral margin and seminal vesicles invasion. Further, there were correlation between the expression of this receptor and the sum of prognostic factors. For the other analyses, it was not observed any significant difference. Semi quantitative methods can have great variation and should be passed over in relation to quantitative methods for the analysis performed in this study. Neither leptin nor its receptor exhibited changes in their expression in neoplastic prostatic samples compared to those that are not neoplastic. The leptin receptor showed a decreased expression in tumors with positive surgical margin, positive urethral margin and involvement of seminal vesicles. There were a negative correlation between the percentage of immunostaining area with antibody antileptin receptor and the sum of prognostic factors.

Keywords: Prostate cancer. Leptin. Leptin receptor. Prognostic factors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Preparados histopatológicos de próstatas corados em H-E (a e c) e seus respectivos blocos parafinados com a mesma marcação (b e d) ...	22
Figura 2 –	Construção do microarranjo tecidual.....	23
Figura 3 –	Mapa de um TMA.....	23
Figura 4 –	Fotomicrografia de carcinoma de próstata imunomarcada com antirreceptor de leptina.....	25
Figura 5 –	Fotomicrografias de áreas prostáticas não tumorais, imunomarcadas com antileptina (a) e antirreceptor de leptina (b).....	27
Figura 6 –	Fotomicrografias de áreas prostáticas tumorais, imunomarcadas com antileptina e antirreceptor de leptina.....	28
Figura 7 –	Percentual de área imunomarcada com antileptina em tecido prostático em áreas não tumorais e tumorais.....	30
Figura 8 –	Percentual de área imunomarcada com antirreceptor de leptina em tecido prostático em áreas não tumorais e tumorais.....	30
Figura 9 –	Percentual de área imunomarcada com antileptina em amostras com comprometimento unilateral ou bilateral da próstata.....	31
Figura 10 –	Percentual de área imunomarcada com antileptina em amostras com ou sem invasão perineural.....	31
Figura 11 –	Percentual de área imunomarcada com antileptina em amostras com ou sem embolização neoplásica vascular.....	32
Figura 12 –	Percentual de área imunomarcada com antileptina em amostras com margem cirúrgica comprometida ou não.....	32
Figura 13 –	Percentual de área imunomarcada com antileptina em amostras com margem vesical comprometida ou não.....	33
Figura 14 –	Percentual de área imunomarcada com antileptina em amostras com margem uretral comprometida ou não.....	33
Figura 15 –	Percentual de área imunomarcada com antileptina em amostras com vesículas seminais comprometidas ou não.....	34
Figura 16 –	Percentual de área imunomarcada com antirreceptor de leptina em amostras com margem uretral comprometida ou não.....	34
Figura 17 –	Percentual de área imunomarcada com antirreceptor de leptina em amostras com margem cirúrgica comprometida ou não.....	35

Figura 18 – Percentual de área imunomarcada com antirreceptor de leptina em amostras com vesículas seminais comprometidas ou não.....	35
Figura 19 – Percentual de área imunomarcada com antirreceptor de leptina em amostras com comprometimento unilateral ou bilateral da próstata....	36
Figura 20 – Percentual de área imunomarcada com antirreceptor de leptina em amostras com ou sem invasão perineural.....	36
Figura 21 – Percentual de área imunomarcada com antirreceptor de leptina em amostras com ou sem embolização neoplásica vascular.....	37
Figura 22 – Percentual de área imunomarcada com antileptina em amostras com margem vesical comprometida ou não.....	37
Figura 23 – Percentual de área imunomarcada com antileptina em amostras com diferentes graus de Gleason.....	38
Figura 24 – Percentual de área imunomarcada com antirreceptor de leptina em amostras com diferentes graus de Gleason.....	39
Figura 25 – Correlação entre o percentual de área imunomarcada com antileptina e grau de Gleason.....	39
Figura 26 – Correlação entre o percentual de área imunomarcada com antirreceptor de leptina grau de Gleason.....	40
Figura 27 - Correlação entre o percentual de área imunomarcada com antileptina e o somatório dos fatores prognósticos.....	40
Figura 28 - Correlação entre o percentual de área imunomarcada com antirreceptor de leptina e o somatório dos fatores prognósticos.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Distribuição de casos novos de neoplasias e mortes estimadas para 2013 nos Estados Unidos da América.....	13
Tabela 2 –	Média, desvio padrão e distribuição do número de amostras segundo o grau de Gleason.....	29
Tabela 3 –	Média, desvio padrão e distribuição do numero de amostras segundo os fatores prognósticos do carcinoma de próstata.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

H-E	Hematoxilina-Eosina
OB-RA	Isoforma curta de leptina
OB-RB	Isoforma longa de leptina
PAP	Fosfatase alcalina prostática
PBS	Tampão fosfato-salina
PSA	Antígeno prostático específico
RE-	Receptor estrogênio negativo
RE+	Receptor estrogênio positivo
RNA _m	RNA mensageiro
TMA	Arranjo em matriz tecidual ou <i>tissue microarray</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

kDa	Kilodaltons
Ng/ml	Nanograma/mililitro
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	13
1	OBJETIVO	19
2	MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1	Seleção dos casos	20
2.2	Processamento anatomo-patológico e histológico	20
2.3	Construção do arranjo em matriz tecidual (TMA)	21
2.4	Análises microscópicas	24
2.4.1	<u>Imuno-histoquímica</u>	24
2.4.2	<u>Análise semiquantitativa</u>	24
2.4.3	<u>Análise quantitativa</u>	25
2.5	Análise estatística	26
3	RESULTADOS	27
4	DISCUSSÃO	42
	CONCLUSÕES	47
	REFERÊNCIAS	48
	APÊNDICE - Artigo submetido.....	52
	ANEXO A – Documento de aprovação do comitê de ética.....	75
	ANEXO B - Método de coloração de hematoxilina-eosina(H-E).....	76
	ANEXO C - Método de imuno-histoquímica.....	77

INTRODUÇÃO

Adenocarcinoma de próstata

O câncer de próstata é o tumor não cutâneo mais comum entre homens e responsável pela segunda maior mortalidade entre os tumores no sexo masculino (1,2). A probabilidade de um homem, independente de qualquer fator de risco, ter câncer de próstata durante sua vida é de 16%, ou seja, um em cada seis homens terá esta doença em algum momento da vida (1).

Financeiramente, os custos com o tratamento do câncer de próstata representam 11% dos custos com todos os tipos de tumores nos Estados Unidos da América, o que soma algo em torno de oito bilhões de dólares por ano. Representa, ainda, um custo médio de mais de oitenta mil dólares por paciente, desde o diagnóstico até a sua morte (3).

Tabela 1 - Distribuição de casos novos de neoplasias e mortes estimadas para 2013 nos Estados Unidos da América segundo a distribuição por sítios

Casos novos estimados			Mortes estimadas		
Próstata	238.590	28%	Pulmões e brônquios	87.260	28%
Pulmões e brônquios	118.080	14%	Próstata	29.720	10%
Colo-retal	73.680	9%	Colo-retal	26.300	9%
Bexiga urinária	54.610	6%	Pâncreas	19.480	6%
Melanoma cutâneo	45.060	5%	Fígado e vias biliares	14.890	5%
Rim e pelve renal	40.430	5%	Leucemia	13.660	4%
Linfoma não Hodgkin	37.600	4%	Esôfago	12.220	4%
Cavidade oral e faringe	29.620	3%	Bexiga urinária	10.820	4%
Leucemia	27.880	3%	Linfoma não Hodgkin	10.590	3%
Pâncreas	22.740	3%	Rim e pelve renal	8.780	3%
Todos os sítios	854.790	100%	Todos os sítios	306.920	100%

Nota: Origem: adaptado de SIEGEL, 2013 (1)

O impacto social causado pelo câncer de próstata também deve ser considerado. Além das desordens específicas causadas pela neoplasia, pacientes diagnosticados com esta doença comumente sofrem desordens de ordem psicológica como depressão, ansiedade e diferentes formas de estresse (4).

Frequentemente os sintomas associados ao câncer de próstata são notados apenas em fases avançadas da doença e, por isso, vários países adotaram sistemas de exames preventivos para diagnóstico precoce (5). Neste sentido, a palpação da próstata pelo toque retal, o nível sérico do antígeno prostático específico (PSA) e a análise histopatológica de biópsia guiada por ultrassom transretal têm sido usados como métodos de triagem e diagnóstico da lesão (6).

Ainda assim, novas evidências questionam o papel dos exames preventivos para o câncer de próstata, sobretudo em pacientes idosos (7).

O estadiamento dos tumores de próstata pode ser feito de diferentes maneiras. Tradicionalmente, os carcinomas prostáticos eram divididos em clínicos, latentes e ocultos. Os carcinomas clínicos produzem sintomas e sinais locais. Os carcinomas latentes (incidentais) não têm expressão clínica e são achados incidentais em necropsias ou em peças de prostatectomia por hiperplasia nodular ou outra condição. Os carcinomas ocultos se manifestam por metástases distantes, não sendo detectado clinicamente o tumor primário. Alguns dos critérios desta classificação antiga foram absorvidos pela classificação atual TNM (8).

Diferentes métodos são utilizados com o objetivo de determinar o prognóstico do paciente portador de câncer de próstata. Entre eles, a classificação histológica pelo grau de Gleason é amplamente utilizada por ter uma boa correlação com a extensão patológica da doença (9).

Sabemos que a classificação de Gleason representa o somatório de dois padrões (scores) histopatológicos, cada qual com um grau de Gleason. O grau de Gleason é baseado no grau de diferenciação glandular e no padrão de crescimento do tumor em relação ao estroma, sendo avaliado pelo microscópio de luz em pequeno aumento. O padrão predominante do tumor, referido como padrão ou score primário, é graduado de 1 a 5 e o padrão ou score secundário, caso presente, é graduado de modo semelhante, de 1 a 5. Deste modo, ter-se-ão dois números cuja soma resulta no grau de Gleason. Caso o tumor tenha o mesmo padrão histopatológico, isto é, apenas o padrão primário, o valor numérico é multiplicado por dois para se obter o grau final (9).

A classificação de Gleason é utilizada tanto em amostras de biópsias guiadas por ultrassom quanto em peças cirúrgicas, já que a relação entre a graduação na biópsia e aquela

encontrada na peça de prostatectomia é satisfatória. Contudo, em 30 a 45% ocorre *upgrading* do grau e, em 5% deles, *downgrading* (10).

O grau de Gleason 7, independente se o padrão primário é 3 ou 4, isto é, 3+4 ou 4+3, é um indicador clinicamente significativo da doença, mesmo quando restrita a um foco microscópico (10).

A graduação microscópica de Gleason apresenta correlação com os níveis de PSA e de PAP, o estadiamento clínico e patológico da doença, a frequência de corpúsculos apoptóticos, a *overexpression* de p53, a incidência de metástases linfonodais e ósseas, o grau de sobrevida e a resposta à terapia (11,12).

Ainda, a correlação entre a graduação de Gleason e o grau de mortalidade é particularmente importante, pois pacientes com grau até 4 quase nunca desenvolvem doença agressiva, ao passo que aqueles com grau 8 a 10 comumente morrem de câncer de próstata. Esta correlação se mantém em cada estágio clínico da doença. Portanto, a combinação de estadiamento clínico e graduação de Gleason é o melhor valor preditivo obtido da doença (10).

Embora o grau de Gleason seja o melhor método isolado para determinação prognóstica populacional, individualmente existe grande heterogeneidade quando o prognóstico é traçado com base apenas no grau de Gleason. Por isso, são aplicados diversos outros critérios.

Além da graduação histopatológica são de importância prognóstica e útil na conduta clínica do paciente os níveis pré e pós-operatórios de PSA, o estadiamento TNM e a avaliação de comprometimento neoplásico da margem cirúrgica de ressecção da peça de prostatectomia. Ainda por ter importância prognóstica validada, tem-se o volume tumoral, tipo histopatológico e ploidia de DNA (13).

A invasão perineural, diferenciação neuroendócrina do tumor, densidade de microvasos, contorno nuclear, textura de cromatina, marcadores de proliferação celular, derivados do PSA e outros fatores como oncogenes, genes supressores tumorais, genes apoptóticos, etc ainda não contam com evidências suficientes para demonstrar valor prognóstico (13,14).

Sabe-se que o volume tumoral, quando medido em secções inteiras por técnica morfométrica, correlaciona-se com a graduação de Gleason, a infiltração capsular, o comprometimento da margem cirúrgica de ressecção, a invasão de vesículas seminais e a metástase linfonodal.

Entretanto, existe dúvida se a mensuração do volume tumoral provê alguma informação prognóstica adicional, além dos parâmetros acima citados, principalmente da classificação de Gleason. Por isso, é difícil justificar a prática dessa técnica, que envolve secções completas da próstata e mensuração do tumor a intervalos de 3mm de espessura com análise de imagem por computador. Por isso, é importante para o patologista referir o valor quantitativo estimado do tumor nas amostras de biópsias prostáticas por agulha (10).

Existe correlação entre o prognóstico e o conjunto de fatores que determinam o estadiamento patológico, como invasão da cápsula prostática, comprometimento da margem cirúrgica de ressecção, comprometimento de margens uretral e vesical, invasão de vesículas seminais e dos linfonodos. Há forte associação entre o nível da invasão tumoral para ou através da cápsula prostática e a graduação, o volume tumoral e o grau de recorrência do tumor. Em casos com metástase linfonodal, o prognóstico é pior quando múltipla; se detectada macroscopicamente, do que microscopicamente; se o volume é grande e quando há extensão extracapsular da doença. O significado prognóstico parece ser semelhante, quer a doença seja localizada na pelve, quer ao redor da próstata/vesículas seminais (15,16).

Leptina

A obesidade é um problema de saúde pública mundial. A prevalência e a incidência de obesidade e doenças a ela relacionadas têm aumentado dramaticamente nas últimas décadas. Globalmente, a população com sobrepeso excedeu um bilhão, e dados coletados epidemiologicamente demonstraram claramente que a obesidade em adultos está associada a risco aumentado de doença cardiovascular, de diabetes, como também de muitos tumores (17).

Sabe-se que existe uma associação entre obesidade e câncer prostático e as bases moleculares pelas quais estas doenças estão interligadas são pouco conhecidas (17).

A descoberta do gene da obesidade humana e sua proteína, a leptina, levaram a estudos relacionando leptina a obesidade. O tecido adiposo é responsável pelo armazenamento de energia no organismo, mas sabe-se que este tecido também exerce importantes funções endócrinas, orquestradas por uma rede complexa de vários fatores solúveis derivados dos adipócitos, denominados adipocitocinas. Esse grupo de moléculas altamente ativas, abundantemente secretadas pelos adipócitos, atua tanto em nível local, como sistêmico (18). Foram identificadas, desde sua descoberta no início dos anos 1990,

aproximadamente vinte famílias de adipocitocinas, sendo a leptina a principal representante (19).

A leptina é um hormônio peptídico com um peso molecular de 16kDa, codificado pelo gene *ob* do cromossoma 7 humano, (20) responsável pela regulação da massa gordurosa corporal. Está envolvida na regulação da ingestão alimentar, do metabolismo, do gasto energético, além da função neuroendócrina. É secretada na corrente sanguínea por adipócitos maduros e seu nível sérico varia conforme a massa corporal e com a atividade física. Indivíduos magros possuem uma média de 4ng/ml de leptina plasmática circulante, enquanto nos obesos chega a 40ng/ml (21).

Em humanos e roedores predominam dois receptores isofórmicos de leptina: o receptor com isoforma longa (Ob-Rb) e curta (Ob-Ra) de leptina. Ob-Rb é considerado a forma principal por possuir domínio em todo comprimento intracelular. Já o Ob-Ra possui um domínio intracelular truncado. O significado fisiológico de cada isoforma e a relação com a obesidade e o câncer são, ainda, desconhecidos (22).

Como a maioria dos hormônios, a leptina precisa se ligar a um de seus receptores para exercer seus efeitos. Dessa forma, não só os níveis de leptina são importantes, mas a quantidade de receptores nas suas células-alvo (23).

Estudos *in vitro* mostraram que a leptina é mitogênica em várias linhagens de células malignas incluindo endotélio, mama, cólon, esôfago e próstata. A leptina aumenta a proliferação de células cancerosas prostáticas via supressão da apoptose, apesar de ainda não se saber claramente como isso acontece (21).

Em algumas linhagens celulares de tumores de próstata androgênio-independentes, a leptina estimula a proliferação celular, contudo isso não foi verificado em linhagens de carcinomas androgênio-dependentes, apesar de ambos expressarem isoformas de receptores de leptina funcionais (24).

Sabe-se ainda que este hormônio desempenha papel no desenvolvimento do câncer de próstata através da testosterona e de fatores relacionados à obesidade, influenciando também a diferenciação celular e a progressão do câncer de próstata (25, 26).

Outras citocinas produzidas pelos adipócitos, também importantes no controle do peso corporal, cooperam com a leptina na proliferação das células neoplásicas prostáticas, tais como a interleucina-6 e fator de crescimento insulina-*like*, que mostraram efeitos aditivos e sinérgicos, respectivamente (24).

Há evidências de que a leptina, xenoestrogênios, cortisol e estradiol são regulados pela aromatase RE-alfa e 17 β -hidroxiesteroide-dehidrogenase para induzir neoplasia prostática,

como o fazem na carcinogênese da mama. Paradoxalmente, o estrogênio, e não a testosterona, está relacionado a doenças prostáticas, incluindo as neoplasias e, tipicamente nestes casos, os níveis de testosterona são baixos (27).

A obesidade e os altos índices de leptina elevam a incidência e a agressividade do câncer prostático. Homens com índice de massa corporal superior a 30 têm risco aumentado de desenvolver câncer prostático de alto grau, com Gleason superior a 8, o que não ocorre com o de baixo grau (28,29).

O pré-requisito para a invasão de células tumorais e formação de metástases é a capacidade de migração ativa de tais células. Este processo celular é regulado por uma série de sinalizadores externos, como as citocinas e neurotransmissores. A leptina e adiponectina, as mais abundantes adipocitocinas produzidas por adipócitos, estimulam o crescimento e a migração de células neoplásicas *in vitro*, portanto corroborando a capacidade de promover um comportamento biológico maligno (30).

Kim et al. (2008) (31) estudaram a presença de leptina em próstatas neoplásicas e com hiperplasia benigna e observaram que, em tecidos neoplásicos a expressão de leptina é maior que em tecidos hiperplásicos. A expressão de leptina estava proporcionalmente aumentada em tumores metastáticos e localmente avançados em comparação aos tumores localizados. Dessa forma, os autores sugeriram um aumento da expressão de leptina em relação à progressão e grau de malignidade da doença (31).

Neste trabalho procurou-se investigar o papel da leptina como fator prognóstico, relacionando-a com outros fatores prognósticos do câncer de próstata.

1 OBJETIVOS

O presente trabalho se propõe a identificar as possíveis variações da leptina e seus receptores em adenocarcinomas de próstata e se estas variações poderiam constituir um fator prognóstico preciso, quando avaliado por métodos quantitativos computacionais.

Como corolário correlacionar os perfis de imunomarcção da leptina e seu receptor com os seguintes fatores prognósticos: comprometimento bilateral dos lobos prostáticos, invasão perineural, embolização neoplásica vascular, comprometimento de margem cirúrgica, comprometimento de margem vesical, comprometimento de margem uretral e comprometimento de vesículas seminais.

Os resultados da leptina obtidos por métodos computacionais foram comparados com os obtidos por métodos semiquantitativos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção dos casos

Foram estudados 532 casos de adenocarcinomas prostáticos diagnosticados em peças cirúrgicas de prostatectomias radicais a céu aberto realizadas em diferentes instituições e por diferentes cirurgiões. A utilização destas amostras foi submetida ao Comitê de Ética (CAAE número 12685413.6.0000.5259 – ANEXO A).

Todas as peças foram encaminhadas para diagnóstico ao Laboratório Heitor Paiva Clarice Fraga Anatomia Patológica e Citopatologia e seus blocos de parafina doados à Unidade de Pesquisa Urogenital – Universidade do Estado do Rio de Janeiro para a realização deste estudo. Cada peça foi encaminhada acompanhada de informações clínicas do paciente, que incluíam idade e PSA pré-operatório.

2.2 Processamento anatomo-patológico e histológico

Após a retirada cirúrgica, as peças foram encaminhadas ao Laboratório de Anatomia Patológica, fixadas em bloco por imersão em formaldeído a 8% por 24 horas. As margens cirúrgicas foram marcadas com tinta nanquim e a peça clivada em oito quadrantes, dos quais foram retirados amostras para análise histológica. Foram, ainda, retirados fragmentos dos limites vesical (superior) e uretral (inferior).

Os fragmentos retirados foram acomodados em cassetes plásticos e processados de maneira rotineira para inclusão em parafina. De maneira resumida, as amostras sofreram desidratação em banhos crescentes de etanol, diafanização em xilol e impregnação em parafina líquida com posterior endurecimento a temperatura ambiente.

Foram obtidos cortes histológicos de 5 μ m de espessura em micrótomo rotativo. Estes foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (H-E - ANEXO B) e observados em microscópio óptico binocular Nikon YS100. Nestes cortes foi confirmado o diagnóstico de adenocarcinoma prostático e classificados pelo grau de Gleason. Foi, ainda analisada a presença de invasão perineural, embolização neoplásica vascular, comprometimento bilateral

da próstata, invasão das vesículas seminais (glândulas vesiculares), comprometimento de margem vesical, de margem uretral e de margem cirúrgica de ressecção.

A partir desta análise, foram identificadas áreas tumorais e áreas não tumorais (hiperplasia fibroadenomatosa prostática).

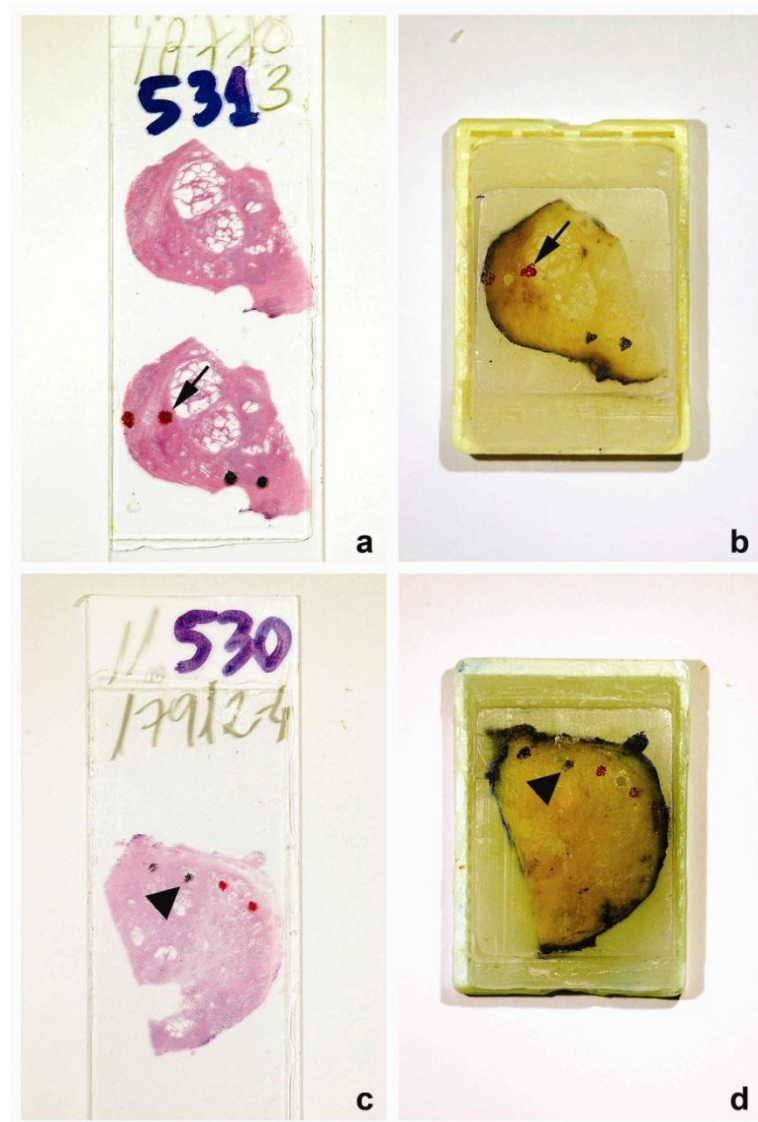
2.3 Construção do arranjo em matriz tecidual (TMA)

A partir dos blocos parafinados (blocos doadores), foram selecionados e marcados um campo tumoral e um campo não tumoral, conforme a prévia determinação das lâminas correspondentes. Estipulou-se que o campo marcado em azul corresponderia ao campo de adenocarcinoma e campo marcado em vermelho corresponderia ao campo não tumoral da mesma amostra (Figura 1).

De cada área selecionada do bloco doador, foi coletado um fragmento por punção direta sobre a área marcada com uma agulha de 1mm (Figura 2). Estes fragmentos foram incluídos em um novo bloco (bloco receptor). Este bloco receptor recebeu até 288 fragmentos (16 colunas e 18 linhas) orientados de forma que se soubesse a origem de cada um deles (Figura 3). Deste modo, foram confeccionados 4 blocos de arranjo de TMA com 1.064 fragmentos (532 tumorais e 532 não tumorais).

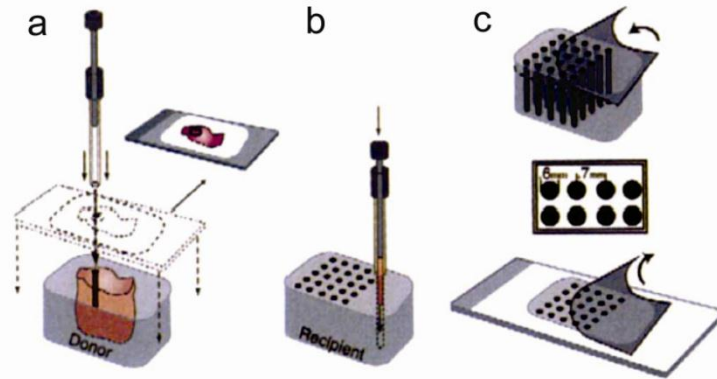
Destas quatro matrizes de TMA foram obtidos cortes histológicos com 4µm de espessura, utilizando-se micrótomo rotativo.

Figura 1 - Preparados histopatológicos de próstata corados pela H-E



Legenda: (a e c) com as áreas de carcinoma marcadas em azul (cabeça de seta) e áreas não tumorais em vermelho (seta) e seus respectivos blocos parafinados com a mesma marcação, indicando de onde foram coletadas as amostras para confecção do bloco receptor de TMA (b e d).

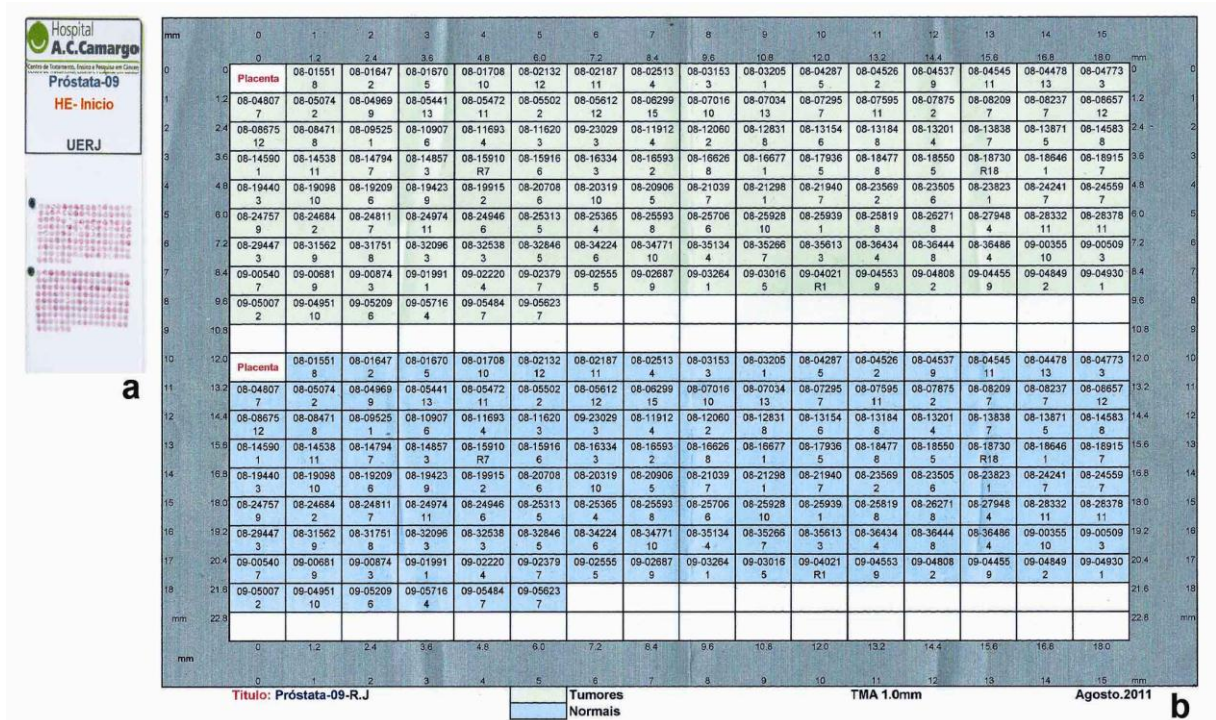
Figura 2 - Construção do microarranjo tecidual



Legenda: a) Biópsias de agulha coletadas de regiões selecionadas do bloco doador. As regiões para coleta da amostra são baseadas em cortes histológicos previamente analisados. b) As amostras são transferidas da agulha de biópsia para o bloco receptor. c) O material é cortado com auxílio de uma fita adesiva de forma que as amostras não se percam e mantenham-se equidistantes uma das outras.

Fonte: KONONEM, J. ET AL., 1998 (32).

Figura 3 - Mapa de um TMA



Legenda: a) Cortes histológicos corados por H-E obtidos a partir de um bloco de microarranjo tecidual. b) Matriz do microarranjo tecidual correspondente à lâmina. Cada fragmento corresponde a uma peça previamente selecionada e devidamente mapeada.

2.4 Análises microscópicas

2.4.1 Imuno-histoquímica

A leptina e seu receptor foram evidenciados pelo método da Avidina Biotina utilizando-se microscopia de luz para a identificação da marcação dos anticorpos específicos: antileptina (*Policlonal Anti-Leptin product numer L3410. Developed in Rabbit. SIGMA.®*) e antirreceptor de leptina (*Policlonal Anti-Ob-R product number SC-1834. Developed in Goat Santa Cruz.®*).

Os cortes foram desparafinados, hidratados em uma série decrescente de álcool etílico até água destilada. Em seguida, tratados uma solução de peróxido de hidrogênio em metanol para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Após esta etapa, as lâminas foram submetidas a uma câmara de pressão elétrica (*heat-induced epitope retrieval*) para recuperação antigênica em tampão citrato. Na sequência, foram incubados por uma hora com o anticorpo primário.

Para todos os anticorpos primários utilizados foram realizados simultaneamente controles negativos, onde o anticorpo primário foi substituído por PBS, e controles positivos, usando fragmentos de tecido placentário que apresentam os antígenos pesquisados.

Após este período, os cortes foram marcados com o anticorpo secundário biotilado (Biocare, código M4BD534L), conforme orientação do fabricante. A revelação foi feita com solução de 5 diamino-benzidina tetrahydroclorido (Biocare, código M4BD534L), conforme orientação do fabricante (ANEXO C).

2.4.2 Análise semiquantitativa

Os cortes foram analisados de maneira subjetiva por dois patologistas, em microscópio de luz, com aumento aproximado de 400x. A imunomarcação foi interpretada e classificada de maneira semiquantitativa segundo o seguinte escore: negativa (0); marcação positiva fraca

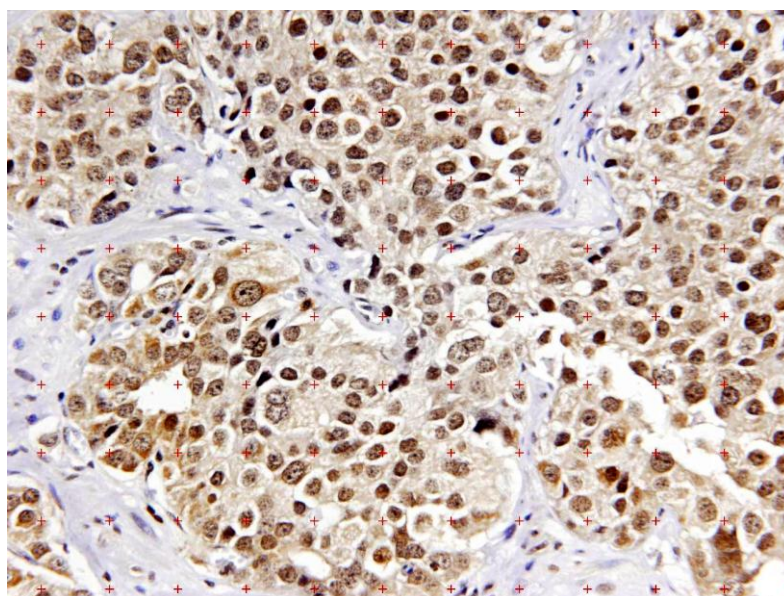
(1), marcação positiva (2) e marcação fortemente positiva (3). Foi, então, feita a média da análise dos dois observadores.

2.4.3 Análise quantitativa

Todos os campos, tumorais e não tumorais das lâminas de TMA foram fotografados em aumento aproximado de 400x com uma câmera digital (DP70) acoplada a microscópio Olympus (BX51). As imagens foram capturadas pelo programa Image Pro Plus.

As imagens foram analisadas pelo software ImageJ, utilizando-se as ferramentas *grid crosses* e *cell counter*. Os núcleos foram contados utilizando-se uma grade com 100 cruzes, resultando em um valor percentual de células marcadas (Figura 4).

Figura 4 - Fotomicrografia de carcinoma de próstata, Gleason 4, imunomarcada com anticorpo antirreceptor de leptina, utilizando-se o programa ImageJ com a ferramenta *grid crosses*



Nota: Aumento de 400x.

2.5 Análise estatística

Com o objetivo de avaliar os resultados de imunomarcção da leptina e seu receptor em adenocarcinomas de próstata por métodos semiquantitativos e quantitativos (morfometria), foram comparadas as médias obtidas dos dois patologistas utilizando teste T de Student.

Com o objetivo de correlacionar os perfis de imunomarcção da leptina e seu receptor em adenocarcinomas de próstata com diferentes fatores prognósticos, foram realizadas regressões lineares entre os resultados quantitativos e os diferentes fatores prognósticos estudados.

Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) comparando os resultados quantitativos entre os espécimes com Gleason baixo (≤ 6), intermediário (7) e alto (≥ 8).

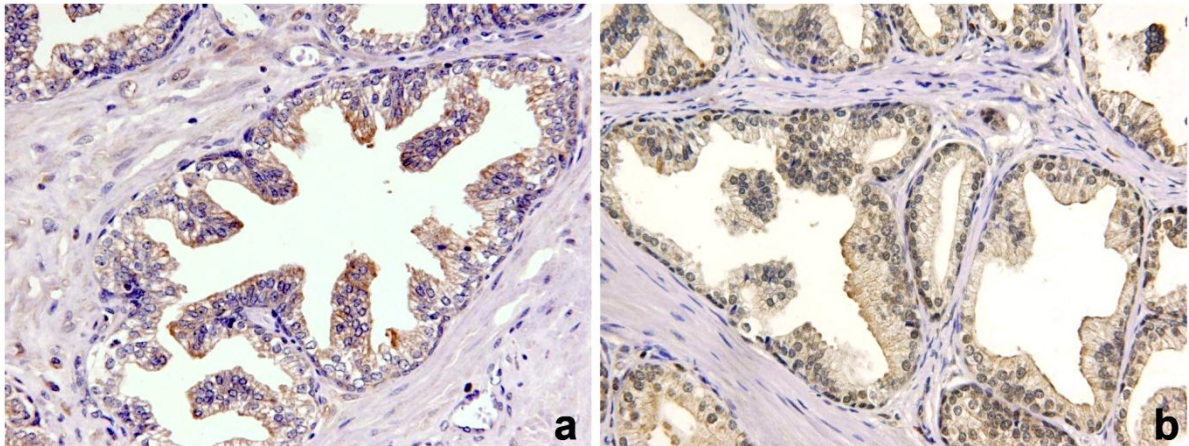
3 RESULTADOS

A média da idade dos pacientes foi de 63 ± 8 , com variação de 40 a 86 anos. A média do PSA sérico foi de $7,2 \pm 4,7$.

A expressão da leptina na área tumoral avaliada pelo método quantitativo foi de $59,7\% \pm 17,4$ e pela análise semiquantitativa foi de $0,44 \pm 0,52$. A expressão da leptina na área não tumoral avaliada pelo método quantitativo foi de $58,6\% \pm 20,2$ e pela análise semiquantitativa foi de $0,11 \pm 0,23$.

A expressão do receptor de leptina na área tumoral avaliada pelo método quantitativo foi de $74,4\% \pm 17,1$ e pela análise semiquantitativa foi de $1,4 \pm 0,5$. A expressão do receptor de leptina na área não tumoral avaliada pelo método quantitativo foi de $75,4\% \pm 17,1$ e pela análise semiquantitativa foi de $1,1 \pm 0,4$.

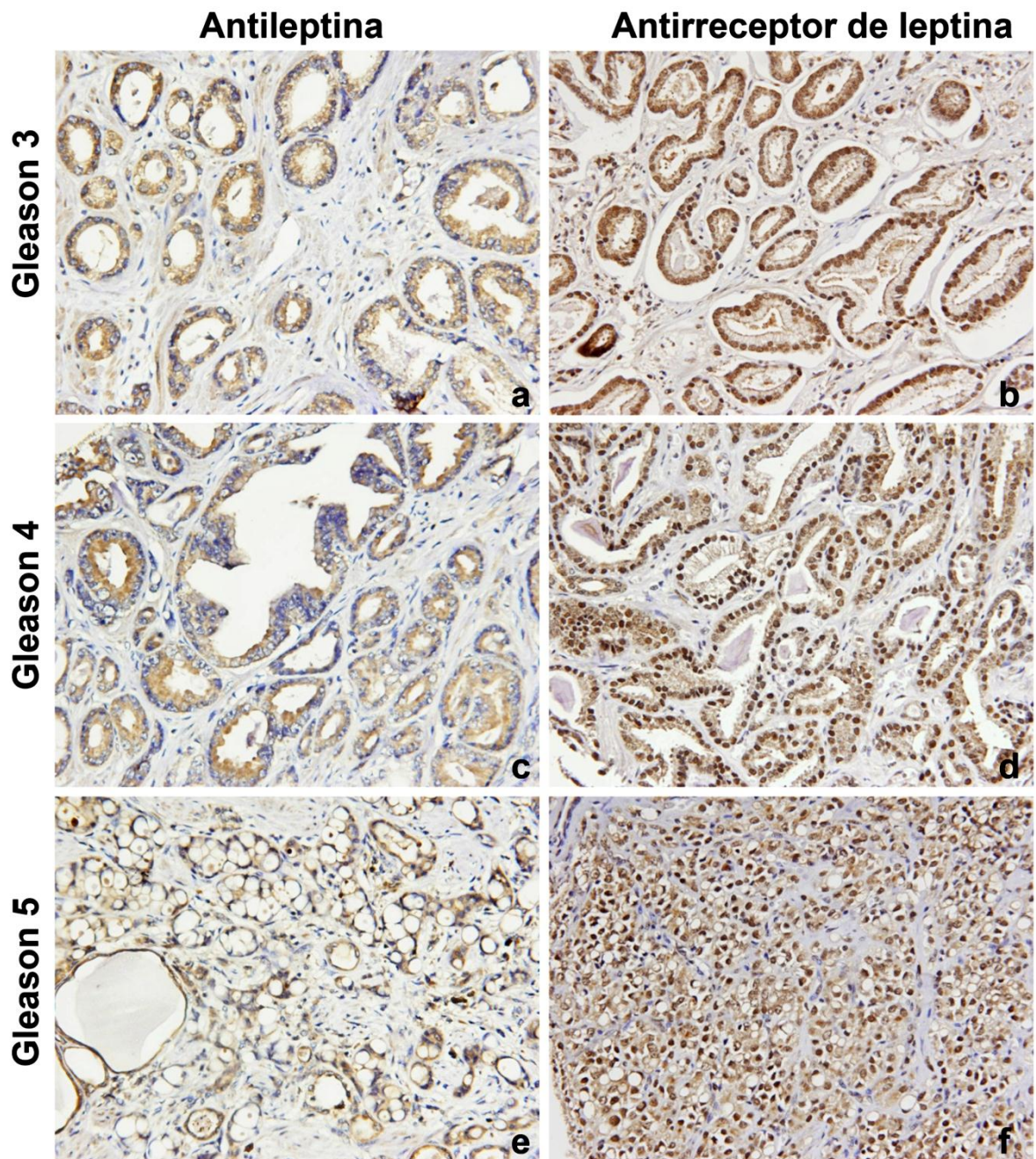
Figura 5 - Fotomicrografias de áreas prostáticas não tumorais



Legenda: imunomarcadas com os anticorpos antileptina (a) e antirreceptor de leptina (b).

Nota: Aumento de 400x.

Figura 6 - Fotomicrografias de áreas prostáticas tumorais



Legenda: Imunomarcadas com anticorpo antileptina em escores de Gleason 3(a), 4(c) e 5(e) e imunomarcadas com anticorpo antirreceptor de leptina em escores de Gleason 3(b), 4(d) e 5(f).

Nota: Aumento de 400x.

Os graus de Gleason e os fatores prognósticos dos carcinomas estão apresentados nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 - Média, desvio padrão e distribuição do número de amostras segundo o grau de Gleason

	Média	Desvio Padrão	Estratificação						
			4	5	6	7	8	9	10
Grau de Gleason	6,98	0,93	2	1	163	261	54	46	5

Tabela 3 - Média, desvio padrão e distribuição do número de amostras segundo os fatores prognósticos do carcinoma de próstata avaliados neste estudo

	Média	Desvio Padrão	Estratificação	
			0	1
Comprometimento bilateral dos lobos	0,82	0,38	94	438
Invasão perineural	0,71	0,45	157	375
Embolização neoplásica vascular	0,05	0,21	507	25
Margem cirúrgica	0,35	0,47	347	185
Margem vesical	0,03	0,17	509	23
Margem uretral	0,07	0,24	489	43
Comprometimento de vesículas seminais	0,12	0,32	462	70

Foi verificada diferença estatística para todos os parâmetros analisados quando comparadas as análises subjetivas dos dois observadores. Para a análise da expressão da leptina na área tumoral, a diferença entre as médias dos observadores foi de $0,14 \pm 0,03$ ($p < 0,05$) e na área não tumoral de $0,05 \pm 0,01$ ($p < 0,05$). Para a análise da expressão do receptor de leptina na área tumoral a diferença entre as médias dos observadores foi de $0,37 \pm 0,03$ ($p < 0,05$) e na área não tumoral de $0,27 \pm 0,02$ ($p < 0,05$).

Não foi encontrada diferença significativa entre a expressão da leptina nas áreas tumoral e não tumoral (Figura 7). Não foi encontrada diferença significativa entre a expressão do receptor de leptina nas áreas tumoral e não tumoral (Figura 8).

Figura 7 - Percentual de área imunomarcada com o anticorpo antileptina em áreas não tumorais e tumorais de próstata. $p=0,5967$, $r^2 = 0,0006$

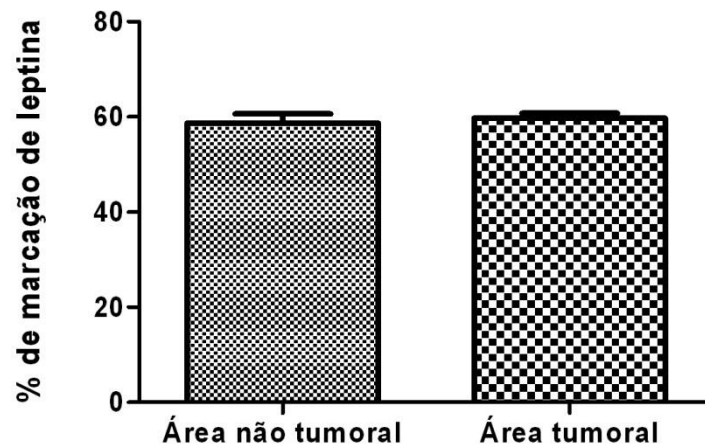
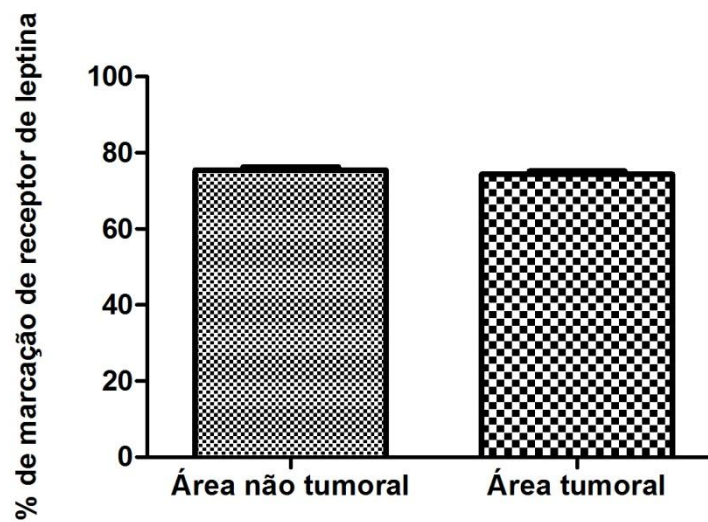


Figura 8 - Percentual de área imunomarcada com o anticorpo antirreceptor de leptina em áreas não tumorais e tumorais de próstata



Não houve diferença na expressão de leptina quando comparada aos fatores prognósticos. Os fatores prognósticos analisados foram: comprometimento bilateral dos lobos prostáticos, invasão perineural, embolização neoplásica vascular, comprometimento de margem cirúrgica, comprometimento de margem vesical, comprometimento de margem uretral e comprometimento de vesículas seminais (Figuras 9 a 15).

Figura 9 - Percentual de área imunomarcada com o anticorpo antileptina em amostras com comprometimento unilateral e bilateral dos lobos prostáticos. $p=0,9811$, $r^2=0,0000$

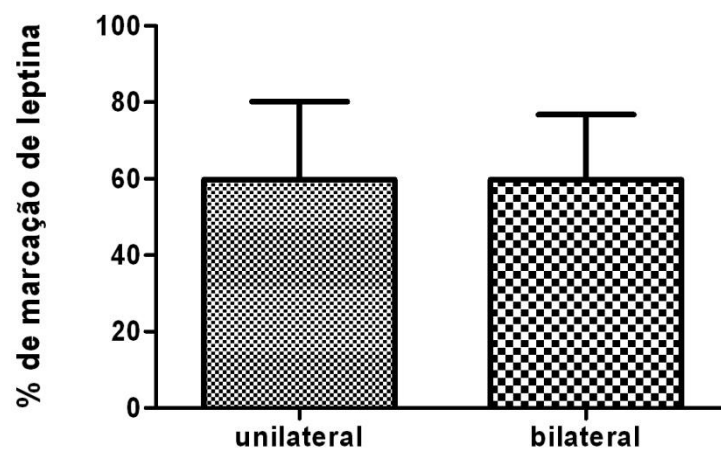


Figura 10 - Percentual de área imunomarcada com o anticorpo antileptina em amostras sem e com invasão perineural. $p=0,8608$, $r^2=0,0000$

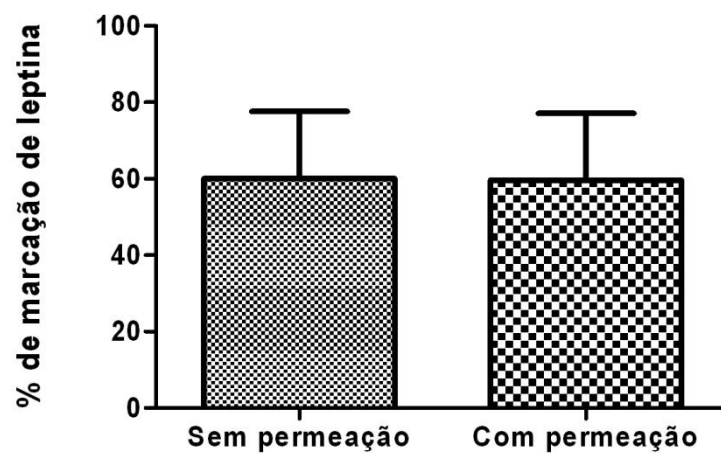


Figura 11 - Percentual de área imunomarcada com o anticorpo antileptina em amostras sem e com embolização neoplásica vascular. $p=0,6835$, $r^2=0,0005$

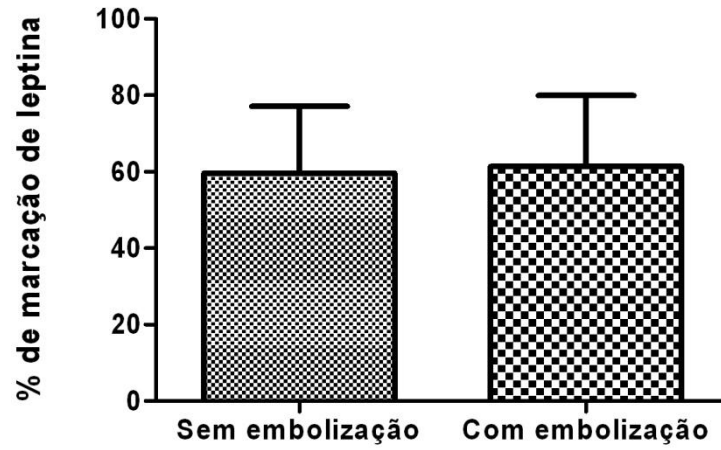


Figura 12 - Percentual de área imunomarcada com o anticorpo antileptina em amostras com margem cirúrgica não comprometida e comprometida. $p=0,4981$, $r^2=0,0014$

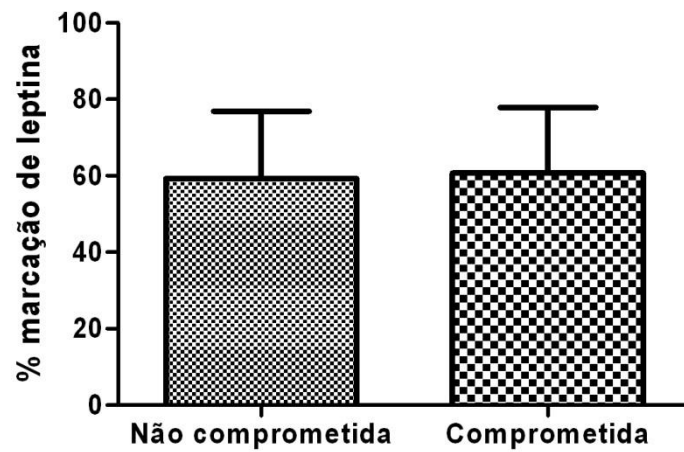


Figura 13 - Percentual de área imunomarcada com o anticorpo antileptina em amostras com margem vesical não comprometida e comprometida. $p=0,4461$, $r^2=0,0018$

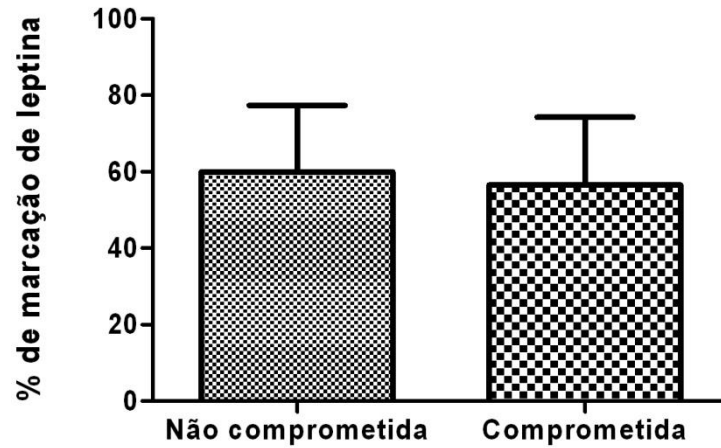


Figura 14 - Percentual de área imunomarcada com o anticorpo antileptina em amostras com margem uretral não comprometida e comprometida. $p=0,5393$, $r^2=0,0012$

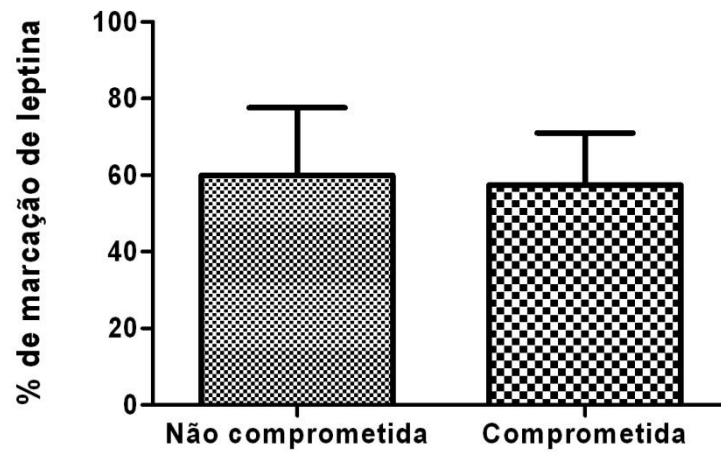
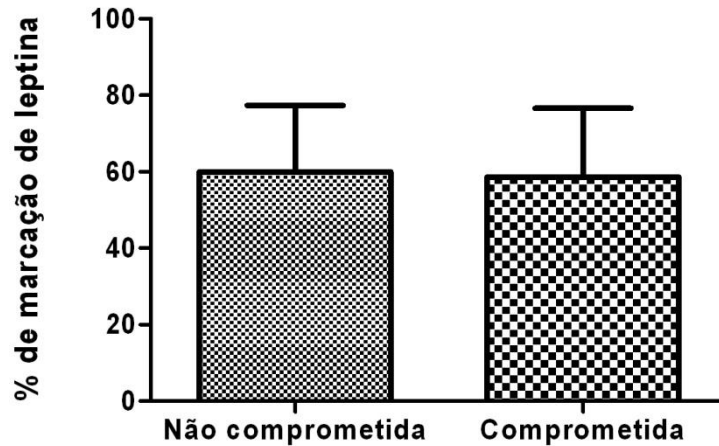


Figura 15 - Percentual de área imunomarcada com o anticorpo antileptina em amostras com vesículas seminais não comprometidas e comprometidas. $p=0,6074$, $r^2=0,0008$



Foi verificada uma diminuição de 11,3% na expressão do receptor de leptina nas amostras com margem uretral comprometida (Figura 16). Houve uma diminuição de 4,6% na expressão do receptor de leptina nas amostras com a margem cirúrgica comprometida (Figura 17) e de 6,4% quando havia comprometimento de vesículas seminais (Figura 18). Não houve diferença na expressão do receptor de leptina para os demais fatores prognósticos: comprometimento bilateral dos lobos prostáticos, invasão perineural, embolização neoplásica vascular e margem vesical comprometida (Figuras 19, 20, 21e 22).

Figura 16 - Percentual de área imunomarcada com o anticorpo antirreceptor de leptina em amostras com margem uretral não comprometida e comprometida. * $p < 0,05$, $r^2=0,0178$

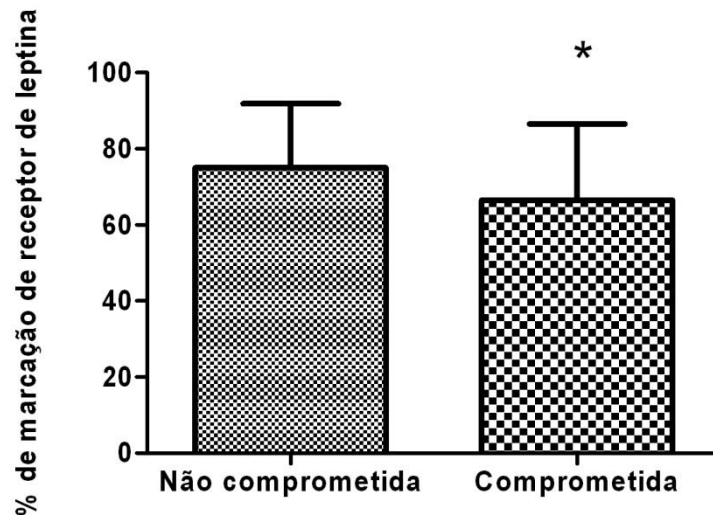


Figura 17 - Percentual de área imunomarcada com o anticorpo antirreceptor de leptina em amostras com margem cirúrgica não comprometida e comprometida. * $p < 0,05$, $r^2 = 0,0095$

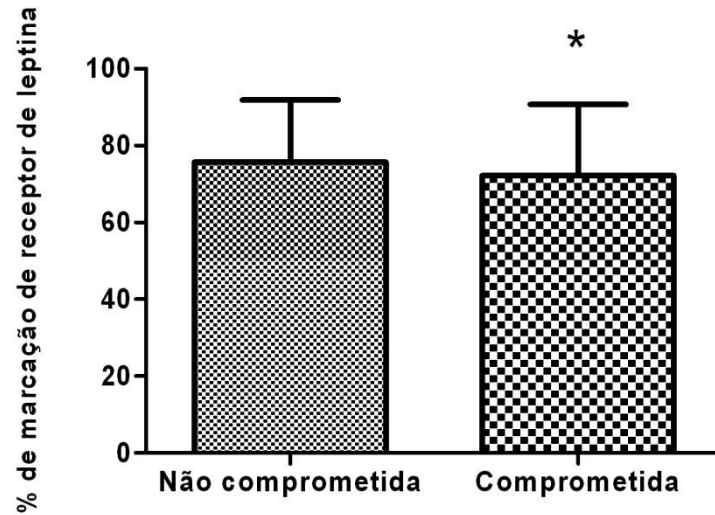


Figura 18 - Percentual de área imunomarcada com o anticorpo antirreceptor de leptina em amostras com vesículas seminais não comprometidas e comprometidas. * $p < 0,05$, $r^2 = 0,0095$

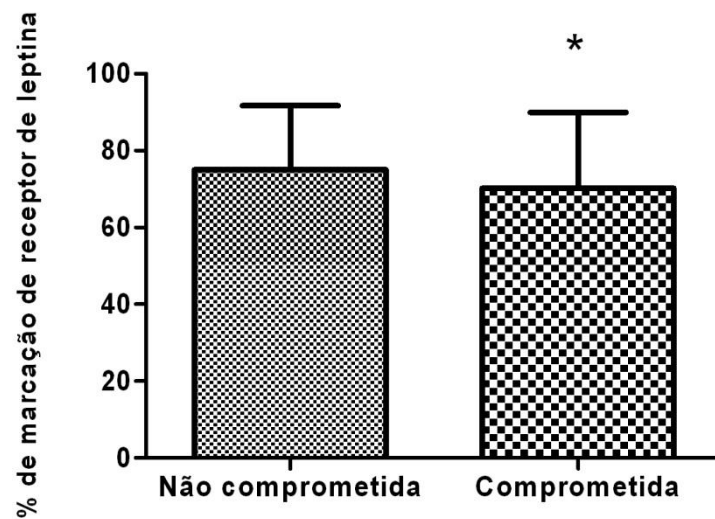


Figura 19 - Percentual de área imunomarcada com o anticorpo antirreceptor de leptina em amostras com comprometimento bilateral e unilateral dos lobos prostáticos. $p=0,7152$, $r^2=0,0003$

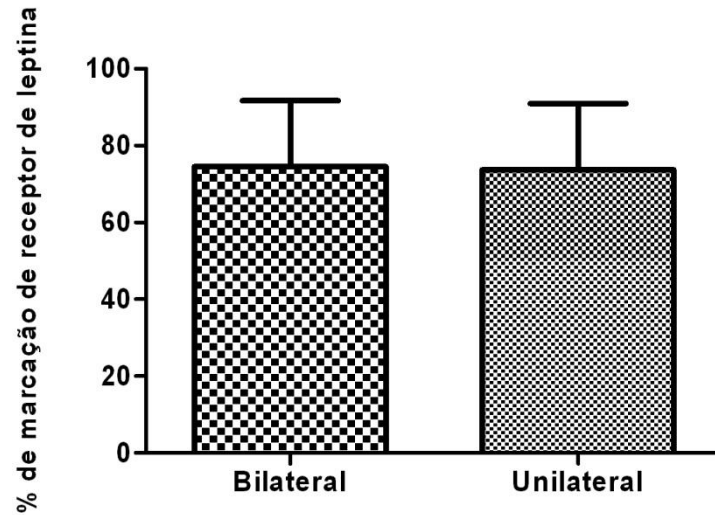


Figura 20 - Percentual de área imunomarcada com o anticorpo antirreceptor de leptina em amostras sem e com permeação perineural. $p=0,0886$, $r^2=0,0069$

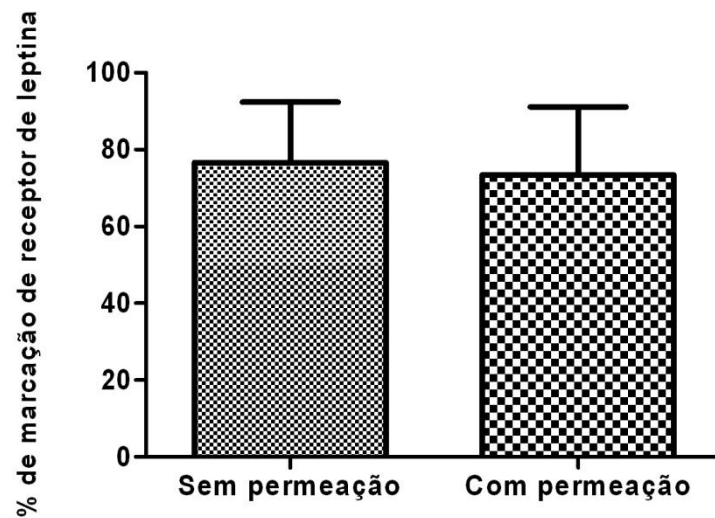


Figura 21 - Percentual de área imunomarcada com o anticorpo antirreceptor de leptina em amostras sem e com embolização neoplásica vascular. $p=0,1253$, $r^2=0,0055$

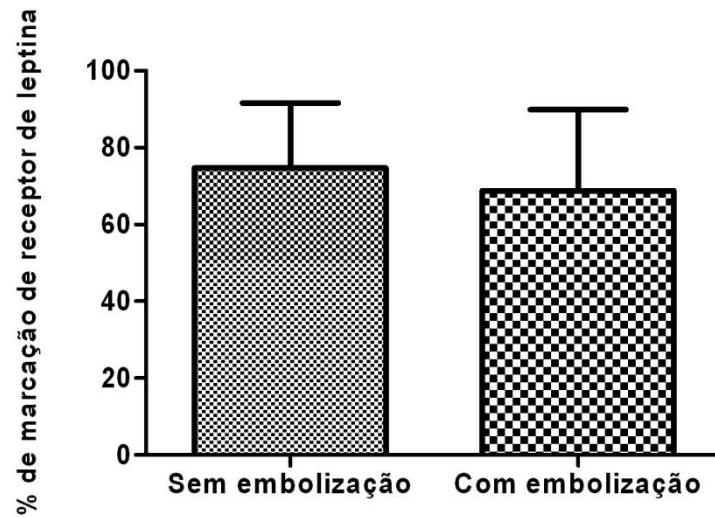
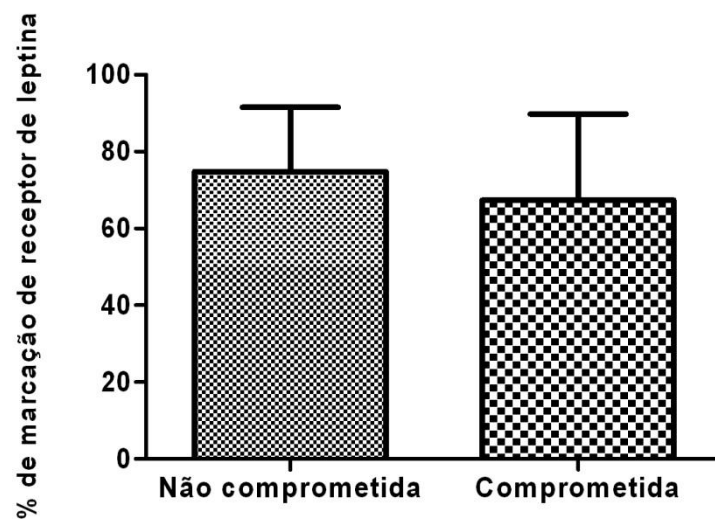


Figura 22 - Percentual de área imunomarcada com o anticorpo antirreceptor de leptina em amostras com margem vesical não comprometida e comprometida. $p=0,0541$, $r^2=0,0088$.



Não foi encontrada diferença significativa entre a expressão da leptina quando comparado com os graus de Gleason baixo (≤ 6), intermediário (7) e alto (≥ 8) (Figura 23). Não foi encontrada diferença significativa entre a expressão do receptor de leptina quando comparado aos graus de Gleason baixo (≤ 6), intermediário (7) e alto (≥ 8) (Figura 24).

Figura 23 - Percentual de área imunomarcada com o anticorpo antileptina em diferentes graus de Gleason

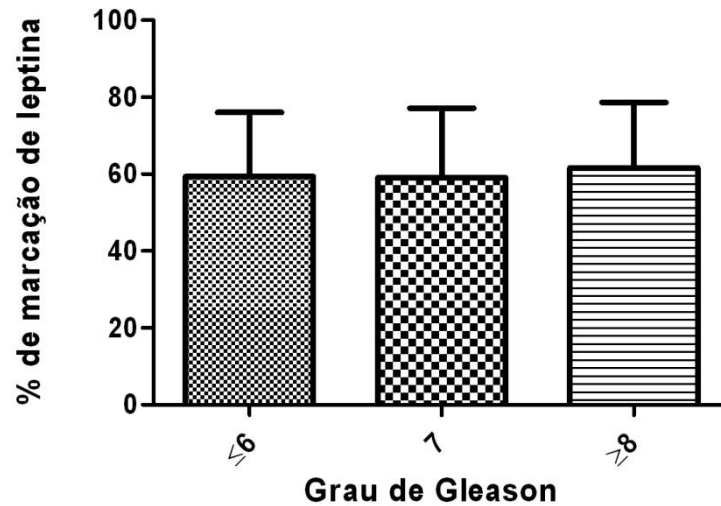
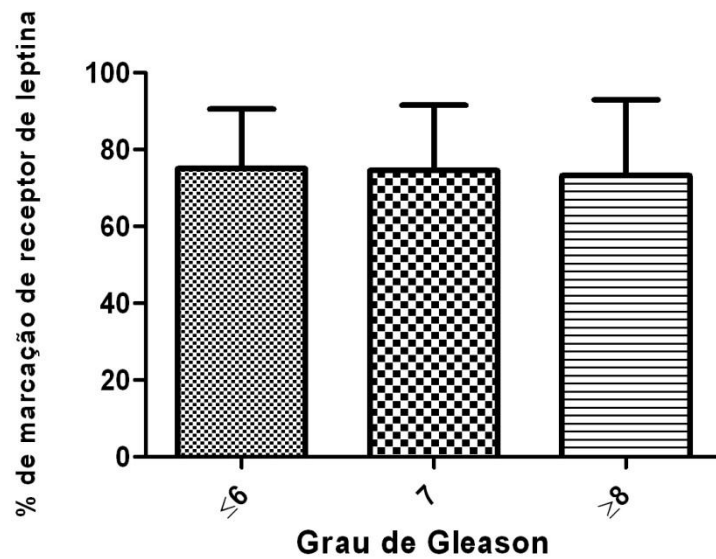


Figura 24 - Percentual de área imunomarcada com o anticorpo antirreceptor de leptina em diferentes graus de Gleason



Não houve correlação entre o percentual de área imunomarcada com o anticorpo antileptina e o escore de Gleason ($p < 0,05$; $r^2 = 0,002$, Figura 25). Não foi observado correlação entre o percentual de área imunomarcada com o anticorpo antirreceptor de leptina e o escore de Gleason ($p < 0,05$; $r^2 = 0,001$, Figura 26).

Figura 25 - Correlação entre o percentual de área imunomarcada com o anticorpo antileptina e o grau de Gleason. $p=0,4314$, $r^2=0,0019$, $y=0,8386x + 53,77$.

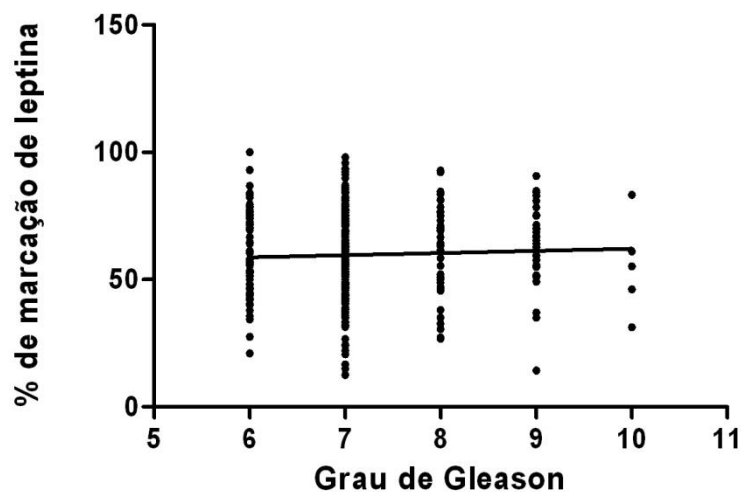
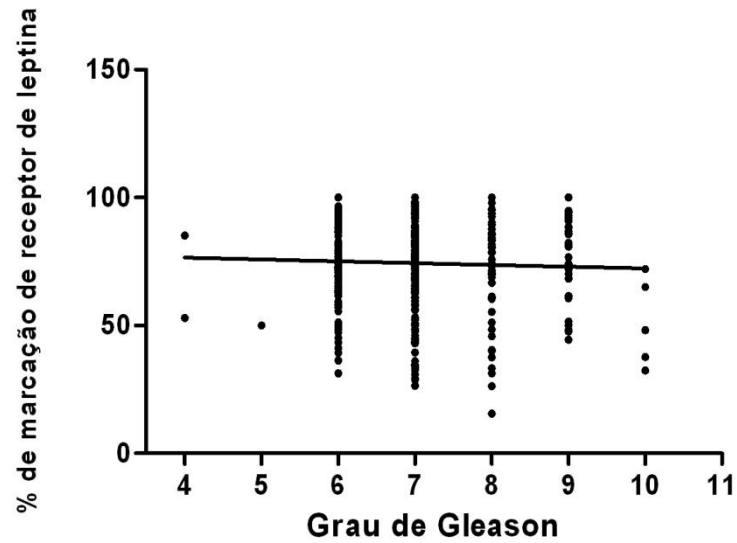


Figura 26 - Correlação entre o percentual de área imunomarcada com o anticorpo antirreceptor de leptina e o grau de Gleason. $p=0,4200$, $r^2=0,0015$, $y = -0,7194x + 79,45$



Não foi observado correlação entre o percentual de área imunomarcada com o anticorpo antileptina e o somatório dos fatores prognósticos analisados ($p < 0,05$; $r^2 < 0,001$, Figura 27).

Foi verificada correlação entre o percentual de área imunomarcada com o anticorpo antirreceptor de leptina e o somatório dos fatores prognósticos analisados ($p = 0,01$; $r^2 = 0,025$, Figura 28).

Figura 27 - Correlação entre o percentual de área imunomarcada com o anticorpo antileptina e o somatório dos fatores prognósticos. $p=0,8543$, $r^2=0,0001$

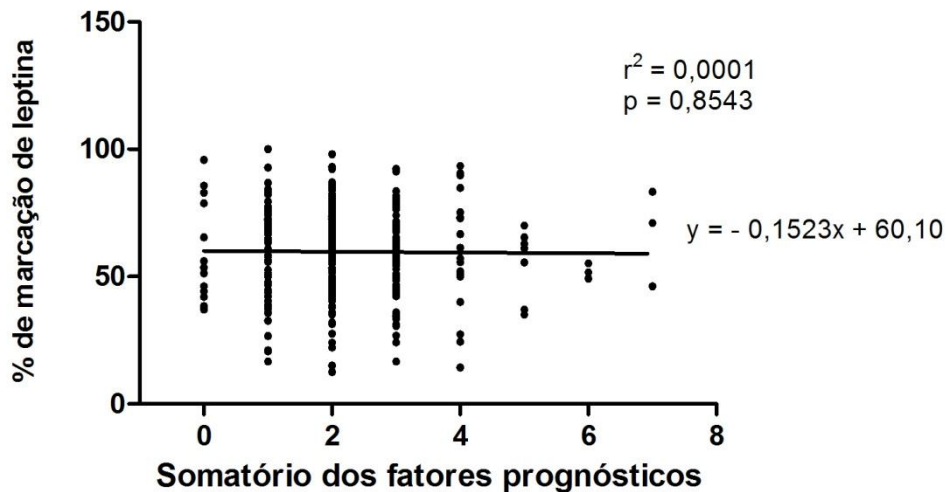
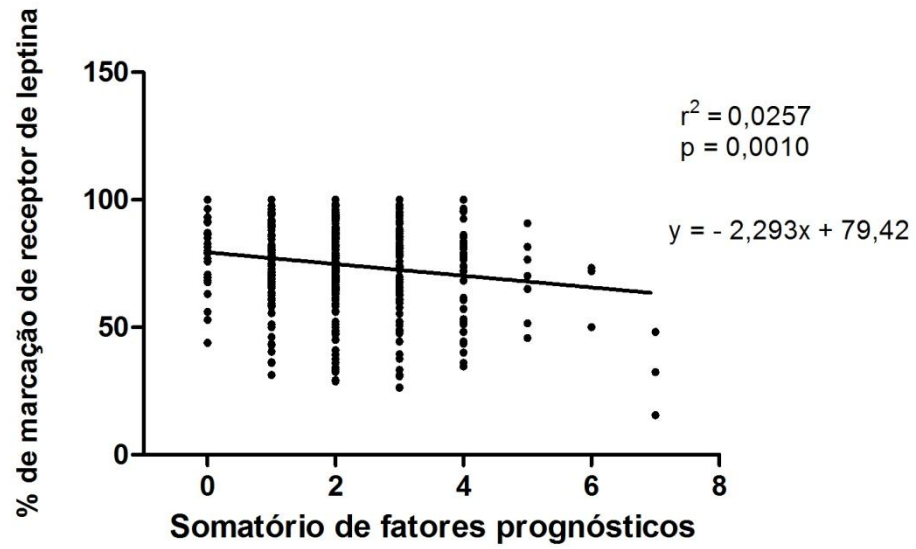


Figura 28 - Correlação entre o percentual de área imunomarcada com o anticorpo antirreceptor de leptina e o somatório dos fatores prognósticos



4 DISCUSSÃO

A leptina é um hormônio considerado chave na fisiopatologia da obesidade (33). A concentração desse hormônio no sangue e nos tecidos está relacionada com a progressão de alguns tipos de tumores que acometem órgãos como a mama, a tireóide e o cólon.

A obesidade é um fator de risco para o câncer de mama na pós-menopausa. Sabe-se que a obesidade está envolvida na patogênese do câncer de mama receptor de estrogênio positivo (RE+), usualmente de melhor prognóstico que aquele receptor de estrogênio negativo (RE-). Por outro lado, mulheres obesas geralmente apresentam pior prognóstico. Nas pacientes pós-menopausa com câncer de mama RE+ os níveis séricos de leptina apresentam correlação significativa com o estadiamento da doença. Tais níveis elevados de leptina também se correlacionam com níveis elevados de RNAm intratumoral nas duas isoformas de Ob-R, longa e curta, com alto grau do tumor, metástase e prognóstico ruim da doença (34).

A relação entre leptina sérica e risco de câncer de tireóide também está documentada, pois nos carcinomas papilíferos tireoidianos, o nível da leptina sérica mostra-se significativamente elevado, decrescendo após a tireoidectomia total. Receptores de leptina estão expressos no carcinoma papilífero da tireóide assim como a proteína Ob-R. Tal proteína está associada à idade avançada, extensão extratireoideana da doença, tamanho tumoral maior, metástase linfonodal, estadiamento avançado da doença e a variante histológica *tall cell* do carcinoma de tireóide. A *overexpression* da Ob-R identifica um fenótipo agressivo de carcinoma papilífero tireoidiano, podendo ser usado com marcador de recorrência ou persistência da doença (35).

As células epiteliais do cólon normalmente expressam receptores de leptina e nos tumores de cólon há alteração no padrão dessa expressão. A expressão do receptor de leptina fornece informação fenotípica dos subtipos de tumor de cólon e a sua *overexpression* está associada a prognósticos melhores, entretanto, a codificação do RNAm da leptina nos pacientes com câncer colônico não está definida. Existem trabalhos conflitantes entre os níveis séricos de leptina e o câncer de cólon, pois alguns estudos apontam diminuição e outros aumento, só em homens e não em mulheres. Provavelmente esses conflitos se devam, em parte, a caquexia e anorexia, comuns em paciente com câncer colo-retal. Por outro lado, a gordura do omento nos pacientes com esse tipo de câncer mostra-se comumente aumentada, o que poderia justificar aumento nos níveis de leptina (36).

Especificamente com relação ao câncer de próstata, sabe-se que pacientes que apresentam este tipo de tumor têm níveis séricos elevados de leptina, apesar da associação da

leptina sérica e o câncer prostático permanecer sem um entendimento claro (37). Sabe-se, ainda, que o nível sérico deste hormônio se correlaciona com o volume tumoral, classificação histológica, recorrência bioquímica, ocorrência de metástases e progressão da doença, assim como aumento na mortalidade. Existe, ainda, uma forte correlação entre o nível sérico de leptina e de PSA (38).

Neste estudo, a expressão da leptina e seu receptor não apresentaram alteração entre as áreas tumorais e não tumorais. Deste modo, podemos supor que a influência da leptina no desenvolvimento do câncer de próstata não ocorra do mesmo modo que em outros tipos de tumores. Ainda, deve-se levar em consideração que, neste estudo a presença de leptina imunomarcada nos tecidos foi quantificada por métodos morfométricos, e não sua concentração sérica. Deste modo, não se sabe se os pacientes com maior grau de Gleason, ou piores resultados nos outros fatores prognósticos analisados, tinham alteração no nível sérico de leptina.

Kim et al. (2008) (31) observaram que em tecidos neoplásicos a expressão de leptina é maior que em tecidos hiperplásicos. É possível que tais achados, que são diferentes dos observados no presente estudo, seja devido à metodologia empregada para quantificação da leptina no tecido. Enquanto em nosso estudo foi empregada uma análise computacional, o estudo de Kim et al. (2008) utilizou um escore de cruzes semiquantitativo e subjetivo, já que depende da interpretação direta do observador, que estima a maior ou menor intensidade da imunomarcção. Nossos resultados comparando os achados de dois observadores distintos utilizando métodos semiquantitativos apresentou diferença significativa. Métodos subjetivos para análise de alterações morfológicas são altamente influenciáveis pelo observador e dessa forma são fracamente reprodutíveis (39,40).

Inicialmente, neste estudo, também foram utilizados métodos semiquantitativos para análise da expressão da leptina e seu receptor. A comparação entre os resultados de dois observadores distintos mostrou que poderia haver grande variação nos resultados aferidos para a mesma amostra. Assim sendo, foi empregado um método objetivo para esta análise.

No trabalho de Kim et al. (2008), a expressão de leptina estava proporcionalmente aumentada em tumores metastáticos e localmente avançados em comparação aos tumores localizados. Dessa forma, os autores sugerem um aumento da expressão de leptina em relação à progressão e grau de malignidade da doença. No presente estudo a leptina não estava alterada em tumores com invasão dos órgãos anexos, com margem cirúrgica comprometida, com embolização neoplásica vascular ou que apresentavam permeação neural, ou seja, nos tumores de pior prognóstico. Entretanto, não foi possível classificar os tumores em

localizados, localmente avançados ou metastáticos, uma vez que não tínhamos dados clínicos para descartar ou confirmar a presença de metástases (41).

No entanto, o presente estudo teve acesso a dados anatomopatológicos importantes e caracterizados como presente ou ausente. Cada peça cirúrgica foi analisada microscopicamente quanto à invasão perineural, embolização neoplásica vascular, comprometimento bilateral dos lobos prostáticos, invasão das glândulas vesiculares (vesículas seminais), invasão da margem vesical, invasão da margem uretral e invasão da margem cirúrgica de ressecção. Cada um destes parâmetros foi classificado como 0 (ausente ou negativo) ou 1 (presente ou positivo), além de analisado o somatório dos resultados destes fatores, que variaram de 0 (quando não havia positividade em nenhum destes fatores) a 7 (quando todos estes fatores estavam positivos). Sabemos que além do grau de Gleason, cada um desses fatores, individualmente analisados são, de alguma forma, importantes para a determinação do prognóstico (14,15). Sendo assim, era de se supor que, caso a expressão de leptina fosse um fator diretamente importante para o prognóstico do câncer de próstata, esta deveria estar alterada quando se estratificou as amostras em função destes fatores prognósticos. Deste modo, pode-se supor que a expressão de leptina não está diretamente relacionada com os demais fatores prognósticos analisados.

Contudo, foi verificado que o receptor de leptina está presente em tecidos de câncer de próstata, mas que estava menos expresso em tecidos neoplásicos que apresentavam positividade em alguns fatores prognósticos (comprometimento da margem uretral, comprometimento da margem cirúrgica e comprometimento de vesículas seminais).

Ainda foi observado que existe uma correlação entre o somatório dos fatores prognósticos analisados e a expressão do receptor de leptina nos tecidos neoplásicos. Segundo esta correlação, quanto maior a soma dos fatores prognósticos (maior agressividade do tumor) menor a expressão dos receptores de leptina no tecido.

Desta forma a leptina pode estar envolvida com a agressividade do câncer de próstata, não de uma forma direta e sim indireta, através de uma alteração no seu receptor. Neste caso, podemos sugerir que as amostras com menor expressão de receptor de leptina são as mais agressivas.

Como qualquer hormônio ou sinalizador celular, a leptina precisa de um receptor para se acoplar e atuar. A atividade da leptina é mediada por receptores teciduais específicos, expressos de maneira diferente nos diversos órgãos, como a próstata. A cascata molecular desencadeada pela ligação da leptina com o seu receptor resulta em diferentes alterações do ciclo celular e gerando novas sinalizações para outras células (42). Dessa forma a alteração no

receptor de leptina encontrado nos tecidos neoplásicos mais agressivos, pode estar ligada ao prognóstico do tumor.

Em diferentes tumores a expressão de receptores de membrana pode ser alterada. Sabe-se que em carcinomas hepatocelulares, a presença de alguns receptores transmembrana do tipo *toll* estão ligados a pior prognóstico da doença (43). Em tumores de pulmão e de próstata, o aumento da expressão de receptores ligados à proteína G está relacionado a uma progressão acelerada do tumor, enquanto a expressão diminuída deste mesmo tipo de receptor em câncer de ovário indica tumor resistente ao tratamento quimioterápico (44). Dessa forma, fica claro que em tecidos neoplásicos, a alteração na expressão de alguns receptores pode ter um papel chave na fisiopatologia da doença. No caso do câncer de próstata é possível que a alteração da expressão do receptor de leptina esteja de alguma forma vinculada ao prognóstico da doença.

A leptina, quando ligada ao seu receptor estimula a proliferação celular e inibe a apoptose das células neoplásicas prostáticas *in vitro*. A nível molecular, adipocitocinas necessitam de uma rede de tirosina-quinases para realizar efeitos mitogênicos e antiapoptóticos nas células prostáticas (37). Alguns autores que estudaram a associação da leptina com a motilidade de células neoplásicas prostáticas, mostraram que esta aumenta a migração de células neoplásicas prostáticas humanas e a expressão da $\alpha\beta3$ integrina nessas células (45).

No presente estudo, foi observado que nos casos de maior agressividade tumoral (comprometimento da margem uretral, comprometimento da margem cirúrgica, comprometimento de vesículas seminais e somatório dos fatores prognósticos) a expressão do receptor de leptina estava diminuída. É possível que nestes casos uma menor interação entre a leptina e seu receptor seja um fator que de alguma forma estimule a agressividade tumoral. Outra explicação seria a de que em tumores mais agressivos, a menor diferenciação celular poderia levar a uma diminuição na expressão desse receptor.

De qualquer modo, para que se possa correlacionar diretamente a leptina ou seu receptor com o prognóstico da doença, estudos que avaliem a expressão destes e as correlacione com o prognóstico da doença (através da taxa de sobrevida, taxa de sobrevida câncer-específica, taxa de recorrência do tumor, ocorrência de metástases, etc.) são necessários para se entender realmente qual o papel da leptina e seu receptor no prognóstico do câncer de próstata.

Embora alguns dados clínicos e o acompanhamento dos pacientes sejam ausentes neste estudo, pode-se estudar um grande número de amostras, coletadas por diferentes

cirurgiões, em diferentes hospitais, que, portanto, se tornam bastante representativas, suportando as análises e conclusões deste estudo.

CONCLUSÕES

Nossos resultados mostraram que no câncer de próstata a leptina e o seu receptor não podem ser utilizados como parâmetros para avaliar a agressividade do tumor por não apresentarem alterações de sua expressão em amostras neoplásicas de próstata quando comparado a frações não neoplásicas. Também não houve alteração da expressão da leptina em relação a nenhum dos fatores estudados, incluindo o grau de Gleason.

Entretanto, o receptor de leptina apresentou diminuição da sua expressão em tumores com margem cirúrgica comprometida, margem uretral comprometida e com vesículas seminais comprometidas.

Houve correlação negativa entre o percentual de área imunomarcada com o anticorpo antirreceptor de leptina e o somatório dos fatores prognósticos analisados.

Métodos quantitativos computacionais devem ser escolhidos em relação a métodos semiquantitativos, os quais podem apresentar grande variação.

REFERÊNCIAS

1. Siegel R, Deepa N, Ahmedin J. Cancer Statistics, 2013. *Câncer J Clin* 2013; 63:11–30.
2. Hsing A W, Reichardt J K V, Stanczyk F Z. Hormones and prostate cancer: Current perspectives and future directions. *The Prostate* 2002; 213-235.
3. Racioppi M, Palermo G, D'addressi A, Pint F, Sacco E., D'agostino D., Vittori M., et al. Hot topics in urological health economics. A mini review. *Arch Ital Urol Androl.* 2012 Jun; 84(2):47-52.
4. De Souza A., Sonavane S., Mehta J. Psychological aspects of prostate câncer: a clinical review. *Prostate Câncer Prostatic Dis.* 2012 Jun; 15(2):120-7. doi: 10.1038/pcan.2011.66. Epub 2012 Jan 3.
5. Mocarska A., Staroslawska E., Iwonna Z.C., Brzozowska A., Losicki M., Stasiewicz D., et al. Diagnostic imaging of the prostate cancer. *Pol Merkur Lekarski*, 2012 Dec; 33 (198):357-63.
6. De Visschere P., Ooterlinck W., De Meerleer G., Villeirs G. Clinical and imaging tools in the early diagnosis of prostate cancer, a review. *JBR-BTR*, 2010 Mar-Apr; 93(2):62-70.
7. Ilic D., Neuberger M.M., Djulbegovic M., Dahm P. Screening for prostate cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013 Jan 31; 1:CD004720. doi: 10.1002/14651858.CD004720.pub3.
8. INCA. Classificação TNM. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/tratament/tnm/exibe.asp?ID=8> Acesso: 7 mar. 2013
9. Gleason D.F. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep.* 1966; 50:125-8.
10. Sabiston D.C. Rosai & Ackerman's Surgical Pathology. Philadelphia, W. B. Saunders: 2004; 1:1382-1387.
11. Partin A.W., Yoo J., Carter H.B., Pearson J.D., Chan D.W., Epstein J.I., et al. The use of prostate specific antigen, clinical stage and Gleason score to predict pathological stage in men with localized prostate cancer. *J Urol.* 1993; 150(1):110-4.

12. Hack E.E., Siemens D.R., Groome P.A. The relationship between adiposity and gleason score in men with localized prostate cancer. *The prostate* 2010; 70(15):1683-1691.
13. Gleason D.F., Mellinger G.T. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 1974; 111:58-64.
14. Yee D.S., Shariat S.F., Lowrance W.T., Maschino A.C., Savage C.J., Cronin A.M., et al. Prognostic significance of lymphovascular invasion in radical prostatectomy specimens. *BJU Int.* 2011 Aug; 108(4):502-7. doi: 10.1111/j.1464-410X.2010.09848.x. Epub 2010 Nov 2.
15. Lee J.T., Lee S., Yun C.J., Jeon B.J., Kim J.M., Ha H.K., et al. Prediction of Perineural Invasion and Its Prognostic Value in Patients with Prostate Cancer. *Korean J Urol.* 2010 November; 51(11):745–751.
16. Bostwick D.G., Qian J., Bergstralh E., Dundore P., Dugan J., Myers R.P., et al. Prediction of capsular perforation and seminal vesicle invasion in prostate cancer. *J Urol.* 1996 Apr; 155(4):1361-7.
17. De Nunzio C., Freedland S.J., Miano R., Trucchi A., Cantiani A., Carluccini A. et al. Metabolic syndrome is associated with high grade gleason score when prostate cancer is diagnosed on biopsy. *Prostate* 2011; 71:1492–1498.
18. Bray G.A. The underlying basis for obesity: relationship to cancer. *J Nutr* 2002; 132: 3451s–3455s.
19. Coelho M., Oliveira T., Fernandes R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci.* 2013 Apr 20; 9(2):191-200. doi: 10.5114/aoms.2013.33181. Epub 2013 Feb 10.
20. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman J.M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994 Dec 1; 372(6505):425-32. Erratum in: *Nature* 1995 Mar 30; 374(6521):479.
21. Ray A. Adipokine leptin in obesity-related pathology of breast cancer. Mini-review. *J. Biosci.* 37(2), June 2012, 289–294.
22. Somasundar P., Frankenberry K.A., Skinnner H., Vedula G., Mcfadden D.W. Prostate cancer cell proliferation is influenced by leptin. *Journal of Surgical Research* 2004; 118:71-82.

23. Sweeney G. Leptin signalling. *Cell Signal*. 2002 Aug; 14(8):655-63.
24. Frühbeck G. Review Article Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem. J.* (2006) 393,7–20.
25. Onuma M., Bud J.D., Rummel T.L., Iwamoto Y. Prostate cancer cell-adipocyte interaction. *The Journal of Biological Chemistry* 2003; 278:42660-42667.
26. Saglam K., Aydur E., Yilmaz M., Göktas S. Leptin influences cellular differentiation and progression in prostate cancer. *J. Urol.* 2003 Apr;169(4):1308-11.
27. Chang S., Hursting S.D., Contois J. H., Strom S.S., Yamamura Y., Babaian R. J. et al. Leptin and prostate cancer. *The prostate* 2001; 46:62-67.
28. Williams G. P. The role of oestrogen in the pathogenesis of obesity, type 2 diabetes, breast cancer and prostate disease. *European Journal of Cancer Prevention* 2010; 19:256-271.
29. Gong Z., Neuhouser M.L., Goodman P.J., Albanes D., Chi C., Hsing A.W., et al. Obesity, diabetes and risk of prostate cancer: results from the prostate cancer prevention trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006; 15:1977-1983.
30. Lang K., Ratke J. Leptin and Adiponectin: new players in the field of tumor cell and leukocyte migration. *Cell Commun Signal.* 2009; 7:1-10.
31. Kim J.H., Lee S.Y., Myung S.C., Kim Y.S., Kim T-H., Kim M.K. Clinical significance of leptin and leptin receptor expressions in prostate tissues, *Asia J. Androl.* 2008; 10(6): 923-928.
32. Kononem, J. et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumour specimens. *Nature Medicine*, 4: 844-847, 1998.
33. Donohoe C.L., Doyle S.L., Reynolds J.V. Visceral adiposity, insulin resistance and cancer risk. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 2011, 3:1-12.
34. Ray A. Adipokine leptin in obesity-related pathology of breast cancer. Mini-review. DOI 10.1007/s12038-012-9191-9.

35. Uddin S., Hussain A.R., Siraj A.K. Khan O.S., Bavi P.P., Al-Kuraya K.S. Role of leptin and its receptors in the pathogenesis of thyroid cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2011; 4(7):637-643.
36. Drew J.E. Symposium 3: Obesity-related cancers Molecular mechanisms linking adipokines to obesity-related colon cancer: focus on leptin. *Proceedings of the Nutrition Society* (2012); 71,175–180.
37. Singh S.K., Grifson J.J., Mavuduru R.S., Agarwal M.M., Mandal A.K., Jha V. Serum leptin: a marker of prostate cancer irrespective of obesity, *Cancer Biomark*. 2010; 7(1):11-5. doi: 10.3233/CBM-2010-0136.
38. Hoda M.R., Mohammed N., Theil G., Fischer, K., Fornara P. Obesity and prostate cancer. Role of adipocytokines and clinical implications. *Urologe A*. 2012; Sep; 51(9):1253-60. doi: 10.1007/s00120-012-2878-6.
39. Mandarim-De-Lacerda C.A. Stereological tools in biomedical research. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* (200375(4): 469-486.
40. Mandarim-De-Lacerda C.A. *Métodos Quantitativos em Morfologia*. Rio de Janeiro: EdUERJ. 1995. 131p.
41. Ribeiro R., Vasconcelos A., Costa S., Pinto D., Morais A., Oliveira J. et al. Overexpressing leptin genetic polymorphism (-2548G/A) is associated with susceptibility to prostate cancer and risk of advanced disease. *The prostate*. 2004; 59(3): 268-274.
42. Ribeiro R., Lopes C., Medeiros R. Leptin and prostate: implications for cancer prevention-overview of genetics and molecular interactions. *Eur J Cancer Prev*. 2004 Oct; 13(5):359-68.
43. Eiró N., Altadill A., Juárez L.M., Rodríguez M., González L.O., Atienza S., et al. Toll-like Receptors 3, 4 and 9 in Hepatocellular Carcinoma: Relationship with Clinicopathological Characteristics and Prognosis. *Hepatol Res*. 2013 Jun 6. doi: 10.1111/hepr.12180.
44. Bodle C.R., Mackie D.I., Roman D.L. RGS17: an emerging therapeutic target for lung and prostate cancers. *Future Med Chem*. 2013 Jun; 5(9):995-1007. doi: 10.4155/fmc.13.91.
45. Huang C.Y., Yu H.S., Lai T.Y., Yeh Y.L., Su C.C., Hsu H.H., et al. Leptin increases motility and integrin up-regulation in human prostate cancer cells, *J Cell Physiol*. 2011 May; 226(5):1274-82. doi: 10.1002/jcp.22455.

APENDICE – Artigo submetido

PLOS ONE
Leptin and leptin receptor expression in prostate cancer
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PONE-D-14-07886
Article Type:	Research Article
Full Title:	Leptin and leptin receptor expression in prostate cancer
Short Title:	Leptin and leptin receptor in prostate cancer
Corresponding Author:	Francisco J. Sampaio, M.D.; Ph.D. State University of Rio de Janeiro Rio de Janeiro, RJ BRAZIL
Keywords:	prostate cancer, leptin, leptin receptor.
Abstract:	Background: Leptin is secreted by adipocytes into the bloodstream and its serum level varies with body weight and physical activity. This hormone is proportionately increased in patients with locally advanced and metastatic prostatic tumors in comparison to those with localized tumors, suggesting a relationship with the progression and malignancy of the disease. The aim of this work is to evaluate the expression of leptin and its receptor in histological sections of prostate cancer, and correlate with prognostic factors. Methodology/Principal Findings: A total of 532 surgical specimens from prostate cancer were studied. After histopathological diagnosis, the samples were included in tissue microarrays containing fragments of tumoral and non-tumoral (benign prostatic hyperplasia) areas. These were immunostained with anti-leptin and anti-leptin-receptor antibodies. Objective and subjective analysis were performed. Student's t-test and ANOVA were used for mean comparison and linear regression evaluated the correlation between the histological results with prognostic indicators. Leptin receptor expression was reduced in tumors with positive surgical margin, urethral margin involvement and seminal vesicles invasion. Further, there were a negative correlation between the expression of leptin receptor in tumoral areas and the sum of prognostic factors. For the other analyses, it was not observed any significant difference. Conclusions: The expression of leptin receptor is linked with prognostic factors in tumoral areas of prostatic tumors. Further investigation should be performed to support its use as a novel biomarker. On the other hand, the expression of leptin cannot be used as a parameter for the aggressiveness of prostate cancer.
Order of Authors:	Clarice F. Osorio Diogo B. de Souza Carla B. M. Gallo Waldemar S. Costa Francisco J. Sampaio, M.D.; Ph.D.
Suggested Reviewers:	Shine Chang University of Texas M.D. Anderson Cancer Center Schang@mdanderson.org STEPHEN FREEDLAND The Johns Hopkins Medical Institutions sfreed11@jhmi.edu
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
Competing Interest For yourself and on behalf of all the authors of this manuscript, please declare	The authors have declared that no competing interests exist

<p>below any competing interests as described in the "PLoS Policy on Declaration and Evaluation of Competing Interests."</p> <p>You are responsible for recognizing and disclosing on behalf of all authors any competing interest that could be perceived to bias their work, acknowledging all financial support and any other relevant financial or competing interests.</p> <p>If no competing interests exist, enter: "The authors have declared that no competing interests exist."</p> <p>If you have competing interests to declare, please fill out the text box completing the following statement: "I have read the journal's policy and have the following conflicts"</p> <p>* typeset</p>	
<p>Financial Disclosure</p> <p>Describe the sources of funding that have supported the work. Please include relevant grant numbers and the URL of any funder's website. Please also include this sentence: "The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript." If this statement is not correct, you must describe the role of any sponsors or funders and amend the aforementioned sentence as needed.</p> <p>* typeset</p>	<p>This work was financially supported by grants from the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq), Coordination for Improvement of Post-Graduate Students (CAPES) and Foundation for Research Support of Rio de Janeiro (FAPERJ), Brazil.</p> <p>The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.</p>
<p>Ethics Statement</p> <p>All research involving human participants must have been approved by the authors' institutional review board or equivalent committee(s) and that board must be named by the authors in the manuscript. For research involving human participants, informed consent must have been obtained (or the reason for lack of consent explained, e.g. the data were analyzed anonymously) and all clinical investigation must have been conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. Authors</p>	<p>A total of 532 cases of prostatic adenocarcinoma diagnosed in surgical samples of open radical prostatectomy were evaluated. These samples were obtained from a tissue bank from the "Laboratório HPCF Anatomia Patológica e Citopatologia Ltda." The Ethics Committee of Pedro Ernesto University Hospital (State University of Rio de Janeiro) approved the project and waived the need of informed consent.</p>

should submit a statement from their ethics committee or institutional review board indicating the approval of the research. We also encourage authors to submit a sample of a patient consent form and may require submission of completed forms on particular occasions.

All animal work must have been conducted according to relevant national and international guidelines. In accordance with the recommendations of the Weatherall report, "[The use of non-human primates in research](#)" we specifically require authors to include details of animal welfare and steps taken to ameliorate suffering in all work involving non-human primates. The relevant guidelines followed and the committee that approved the study should be identified in the ethics statement.

Please enter your ethics statement below and place the same text at the beginning of the Methods section of your manuscript (with the subheading Ethics Statement). Enter "N/A" if you do not require an ethics statement.

ABSTRACT

Background: Leptin is secreted by adipocytes into the bloodstream and its serum level varies with body weight and physical activity. This hormone is proportionately increased in patients with locally advanced and metastatic prostatic tumors in comparison to those with localized tumors, suggesting a relationship with the progression and malignancy of the disease. The aim of this work is to evaluate the expression of leptin and its receptor in histological sections of prostate cancer, and correlate with prognostic factors. **Methodology/Principal Findings:** A total of 532 surgical specimens from prostate cancer were studied. After histopathological diagnosis, the samples were included in tissue microarrays containing fragments of tumoral and non-tumoral (benign prostatic hyperplasia) areas. These were immunostained with anti-leptin and anti-leptin-receptor antibodies. Objective and subjective analysis were performed. Student's-t-test and ANOVA were used for mean comparison and linear regression evaluated the correlation between the histological results with prognostic indicators. Leptin receptor expression was reduced in tumors with positive surgical margin, urethral margin involvement and seminal vesicles invasion. Further, there were a negative correlation between the expression of leptin receptor in tumoral areas and the sum of prognostic factors. For the other analyses, it was not observed any significant difference. **Conclusions:** The expression of leptin receptor is linked with prognostic factors in tumoral areas of prostatic tumors. Further investigation should be performed to support its use as a novel biomarker. On the other hand, the expression of leptin cannot be used as a parameter for the aggressiveness of prostate cancer.

Key words: prostate cancer, leptin, leptin receptor.

INTRODUCTION

Leptin is a hormone responsible for regulating body fat. It is secreted by adipocytes, and its serum level varies depending on body weight and physical activity. Like other hormones, leptin needs to bind a receptor to exert its effects [1,2]. Therefore, not only the amount of leptin but also leptin receptors in the target cells is important.

In vitro studies have shown that leptin is a mitogenic factor in several malignant cellular strains including endothelial, breast, colon, prostate and esophageal cancers [3,4]. Also, *in vitro*, leptin stimulates the growth and migration of neoplastic cells and increases the proliferation of prostatic cancer (PCa) cells via the suppression of apoptosis, thus growing the possibility of worse biological behavior [3,4].

In some cellular strains of androgen-independent PCa, leptin stimulates cell proliferation. However, this fact did not occur in androgen-dependent tumors, although both express functional leptin receptor isoforms [5]. It is known that leptin has a role in the development of PCa via testosterone and obesity-related factors, also influencing the cellular differentiation and progression of PCa [6,7].

The analysis of leptin in PCa and benign prostatic hyperplasia (BPH) shown that its expression is greater in neoplastic than in hyperplastic tissues. The leptin expression is proportionately increased in metastatic and locally advanced prostatic tumors when compared to localized tumors. Therefore, it has been suggested that an increase in the expression of leptin is related to the progression and degree of malignancy of the disease [8,9].

Different methods have been used to determine the prognosis of PCa. Among these methods, the histopathological classification by Gleason's score is widely used

due to its correlation with the pathologic extension of the disease [10,11]. The Gleason's score correlates with the levels of PSA, clinical and pathological staging of the disease, frequency of corpuscle apoptosis, overexpression of p53, incidence of lymph node and bone metastases, surveillance and response to therapy [12, 13].

Although the Gleason's score is the best-isolated method for determining a prognosis in PCa, differences scores may occur when different pathologists analyze the same sample.

Correlations have also been observed between the prognosis and the set of factors that determine the pathological staging, such as capsular penetration, positive surgical margin, involvement of urethral and vesical margins, seminal vesicle invasion and lymph node involvement [13-15].

The present work aims to evaluate, by quantitative computational methods, the expression of leptin and leptin receptor in PCa. For this, we intended to correlate the immunolabelled profiles of leptin and its receptor with the following prognostic factors: positive surgical margin, vesical margin involvement, seminal vesicle invasion, bilateral involvement of the lobes and perineural invasion. We also correlate with vesical margin involvement and vascular embolization. The results could be used as a prognostic factor.

MATERIALS AND METHODS

A total of 532 cases of prostatic adenocarcinoma diagnosed in surgical samples of open radical prostatectomy were evaluated. These samples were obtained from a tissue bank from the “Laboratório HPCF Anatomia Patológica e Citopatologia Ltda.” The Ethics Committee of Pedro Ernesto University Hospital (State University of Rio de Janeiro) approved the project and waived the need of informed consent.

The samples were fixed in formaldehyde for 8 to 12 hours. The surgical margins were labeled with India ink. Fragments of the vesicle (higher) and urethral (lower) limits were removed to histological techniques. The slides were stained with Hematoxylin & Eosin and visualized by light microscopy (Nikon YS100). The diagnosis confirmed prostatic adenocarcinoma, and the samples were classified by Gleason scores [10]. From this analysis, tumor areas and non-tumor areas, benign prostate hyperplasia (BPH), were identified.

We analyzed the following parameters: perineural invasion, vascular embolization, bilateral involvement of the lobes, seminal vesicle invasion, vesical margin involvement, urethral margin involvement and surgical resection margin. Each of these parameters was classified as 0 (absent) or 1 (present). The sum of the results for these different factors was analyzed. A score of 0 was given when there was no positivity in any of the factors, and a score of 7 was given when all of the factors were present.

Samples embedded in paraffin (donor block) were selected and labeled in blue, corresponding to a tumor field and red, corresponding to a non-tumoral field. The labeled blue fields corresponded to adenocarcinoma, while the labeled red fields, corresponded to the BPH field of the same sample.

From each selected area of the donor block, a fragment was collected by direct puncture of the marked area with a needle of 1 mm. These fragments were included in a new block (receiver block). Four blocks of tissue micro array (TMA) with 1,064 fragments (tumoral and non-tumoral 532, 532) were performed. Histological sections were obtained of these four TMA.

The expressions of leptin and its receptor were assayed using the Avidin Biotin method with specific antibodies: Polyclonal Anti-leptin (Leptin L3410. SIGMA) and the anti-receptor of leptin (Polyclonal Anti-Ob-R SC-1834. Santa Cruz). For each primary antibody, simultaneous negative controls were used, in which the primary antibody was replaced with PBS, as well as positive controls, in which fragments of placental tissue presenting the antigens under investigation were used. The sections were labeled with biotinylated secondary antibody (Biocare, code M4BD534L, California, USA) and blocked with diaminobenzidine tetrahydrochloride (Biocare, code M4BD534L, California, USA).

For quantitative analysis, tumoral and non-tumoral fields were selected from the TMA and photographed at a magnification of 400x with an Olympus DP70 digital camera coupled to an Olympus BX51 microscope. The images were captured and analyzed with the ImageJ software using a grid cell counter.

For the semi-quantitative analysis, two pathologists at 400x magnification evaluated the immunolabelled sections subjectively. The sections were interpreted and classified in accordance with the following scores: negative (0); weakly positive (1); positive (2); and strongly positive (3). The result was the average of the two observers.

A statistical analysis was performed using Student's T-test and an analysis of variance (ANOVA) compared the quantitative results among the specimens with low (≤ 6), intermediate (7) and high (≥ 8) Gleason scores.

Linear regressions were performed between the quantitative results and the different prognostic factors that were studied to correlate the immunolabeling profiles of leptin and its receptor with different prognostic factors.

RESULTS

The analyzed samples were from patients aged 63 ± 8 years, ranging from 40 to 86 years, with average serum PSA of 7.2 ± 4.7 .

In the quantitative analyses, the expression of leptin in the tumoral area was $59.7\% \pm 17.4$, and the expression of leptin in the non-tumoral area was $58.6\% \pm 20.2$. The expression of the leptin receptor in the tumoral area was $74.4\% \pm 17.1$, and the expression of the leptin receptor in the non-tumoral area was $75.4\% \pm 17.1$. No significant difference was found between the expression of leptin and its receptor in the tumoral and non-tumoral areas (Figure 1 and Figure 2). Additionally, no significant difference was found between the expression of leptin when compared with the Gleason scores: low (≤ 6), intermediate (7) and high (≥ 8).

There was no difference in the expression of leptin compared to the prognostic factors.

A decrease of 11.3% was observed in the expression of leptin receptors with urethral margin involvement; a decrease of 4.6% was observed with positive surgical margin and a decrease of 6.4% was observed with seminal vesicles invasion (Figure 3). There was no difference in the expression of the leptin receptor for other prognostic factors.

No correlation between the percentage of the immunolabelled area with the anti-leptin antibody and the Gleason score ($p < 0.05$; $r^2 = 0.002$) was observed.

Furthermore, no correlation was observed between the percentage of the immunolabelled area with the anti-leptin antibody and the sum of the prognostic factors analyzed ($p < 0.05$; $r^2 = 0.001$).

However, a strong correlation was observed between the percentage of immunolabelled area with the anti-leptin receptor and the sum of the prognostic factors analyzed ($p=0.01$; $r^2=0.025$) (Figure 4).

In semi-quantitative analyses, the expression of leptin in tumoral area was 0.44 ± 0.52 , and the expression of leptin in the non-tumoral area was 0.11 ± 0.23 . The expression of the leptin receptor in tumoral area was 1.4 ± 0.5 , the expression of leptin receptor and in non-tumoral area was 1.1 ± 0.4 . Significant difference was detected for the parameters that were analyzed compared the subjective analyses of the two observers. For the analysis of the leptin expression in tumoral area, the difference between the averages of the observers was 0.14 ± 0.03 ($p<0.05$) and for a non-tumoral area of 0.05 ± 0.01 ($p<0.05$). For the analyses of the expression of leptin receptor in the tumoral area, the difference between the averages of the observers was 0.37 ± 0.03 ($p<0.05$) and for a non-tumoral area of 0.27 ± 0.02 ($p<0.05$).

DISCUSSION

Patients with prostate cancer have an elevated serum level of leptin [16]. It is known that the serum level of this hormone is correlated with the tumor volume, histological classification, biochemical recurrence, metastasis occurrence and progression of the disease as well as an increase in mortality [6]. There is also a strong correlation between the serum level of leptin and PSA [16, 17].

The literature concerning this issue showed that in neoplastic tissues, the expression of leptin is greater than in hyperplastic tissues; the expression of leptin was raised in locally advanced and metastatic tumors compared with localized tumors [8]. As a consequence, an increase in the expression of leptin in relation to the progression and malignancy of the disease was expected.

However, our results showed no difference between the expression of leptin and its receptor between neoplastic and non-neoplastic areas. It is possible that the difference in outcome identified by the literature is due to the methodology used for the quantification of leptin. In our study, we perform a computational analysis rather than a score of crosses, which is a subjective method, because it depends on the observer's interpretation to estimate the immunolabeling intensity as only strongly or weakly [8]. Our results confirmed this assertion, showing a significant difference when the subjective analysis of the two observers quantifying leptin and its receptor was compared. Subjective methods for the analysis of morphological changes are highly influenced by the observer and thus are weakly reproducible. Quantitative computational methods must be chosen, giving preference to subjective methods that may show a greater variation [18].

We also considered pathological data, such as perineural and seminal vesicles invasion, vascular embolization, bilateral involvement of the lobes, vesical and urethral margin involvement and positive surgical margin. In addition to the Gleason's score, each of these factors individually analyzed are somehow important for determining the prognosis [19]. It has been supposed that if the expression of leptin were a determining factor in the prognosis of prostate cancer, this feature would be changed when the samples were stratified based on these prognostic factors. However, the expression of leptin in neoplastic tissues was not related to the prostate prognostic factors analyzed. The results showed also that leptin was not altered in tumors that had invaded contiguous structures or that had a surgical margin involvement, neoplastic vascular embolization or neural permeation, all of which are signs of a worse prognosis tumor.

However, we found that in prostatic carcinoma with positivity of prognostic factors, such as urethral margin involvement, surgical margin involvement and seminal vesicles involvement, the leptin receptor was only weakly expressed. We noticed that there was a correlation between the sum of the prognostic factors analyzed and the expression of the leptin receptor in neoplastic prostate tissue. According to this correlation, higher values of the sum of the prognostic factors correspond a lower expression of the leptin receptor, and a more aggressive tumor. Therefore, leptin may be involved with the aggressiveness of prostate cancer indirectly through an alteration in the amount of the receptor. Samples with a lower expression of leptin receptor would be the most aggressive tumor.

It has not been possible to classify tumors as localized, locally advanced or metastatic [20] because we had no clinical data to rule out or confirm the presence of metastasis. Despite the large number of samples and the numerous parameters studied in

this work, a larger clinical data and follow-up of patients would better corroborate our results.

CONCLUSIONS

In conclusion, our results shown that leptin receptor can be considered a prognostic factor because it decreases in the presence of a surgical margin involvement, urethral margin involvement and seminal vesicle invasion. A negative correlation has also been observed between the percentage of the immunolabelled area with the anti-receptor leptin and the sum of the prognostic factors analyzed. On the other hand, our findings shown that there is no change in the expression of leptin in relation to any of the factors studied, including the Gleason's score.

ACKNOWLEDGMENT

N/A

REFERENCES

1. Frühbeck G. (2006) Review Article Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J* 393: 7-20.
2. Ray A. (2012) Adipokine leptin in obesity-related pathology of breast cancer. *J Biosc* 37: 289-294.
3. Somasundar P, Frankenberry KA, Skinner H, Vedula G, Mcfadden DW, et al. (2004) Prostate cancer cell proliferation is influenced by leptin. *Journal of Surgical Research* 118: 71-82.
4. Lang K, Ratke J. (2009) Leptin and Adiponectin: new players in the field of tumor cell and leukocyte migration. *Cell Commun Signal* 7: 1-10.
5. Onuma M, Bud JD, Rummel TL, Iwamoto Y. (2003) Prostate cancer cell-adipocyte interaction. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 42660-42667.
6. Sağlam K, Aydur E, Yılmaz M, Göktas S. (2003) Leptin influences cellular differentiation and progression in prostate cancer. *J Urol* 169: 1308-1311.
7. Chang S, Hursting SD, Contois JH, Strom SS, Yamamura Y, et al. (2001) Leptin and prostate cancer. *The Prostate* 46: 62-67.
8. Kim JH, Lee SY, Myung SC, Kim YS, Kim T-H, Kim MK. (2008) Clinical significance of leptin and leptin receptor expressions in prostate tissues. *Asian J Androl* 10: 923-928.
9. Tewari R, Rajender S, Natu SM, Goel A, Dalela D, et al. (2013) Significance of obesity markers and adipocytokines in high grade and high stage prostate cancer in North Indian men - a cross-sectional study. *Cytokine* 63: 130-134.
10. Hack EE, Siemens DR, Groome PA. (2010) The relationship between adiposity and Gleason score in men with localized prostate cancer. *The Prostate* 70: 1683-1691.

11. Gleason DF. (1966) Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep* 50: 125-128.
12. Partin AW, Yoo J, Carter HB, Pearson JD, Chan DW, et al. (1993) The use of prostate specific antigen, clinical stage and Gleason score to predict pathological stage in men with localized prostate cancer. *J Urol* 150: 110-114.
13. Gleason DF, Mellinger GT. (1974) Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol* 111: 58-64.
14. Kryvenko ON, Gupta NS, Virani N, Schultz D, Gomez J, et al. (2013) Gleason score 7 adenocarcinoma of the prostate with lymph node metastases: analysis of 184 radical prostatectomy specimens. *Arch Pathol Lab Med* 137: 610-617.
15. Yossepowitch O, Briganti A, Eastham JA, Epstein J, Graefen M, et al. (2014) Positive Surgical Margins After Radical Prostatectomy: A Systematic Review and Contemporary Update. *Eur Urol* 65: 303-313.
16. Drew JE. (2012) Molecular mechanisms linking adipokines to obesity-related colon cancer: focus on leptin. *Proceedings of the Nutrition Society* 71: 175-180.
17. Singh SK, Grifson JJ, Mavuduru RS, Agarwal MM, Mandal AK, Jha V. (2010) Serum leptin: a marker of prostate cancer irrespective of obesity. *Cancer Biomark* 7: 11-15.
18. Mandarim-De-Lacerda CA. (2003) Stereological tools in biomedical research. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 75: 469-486.
19. Bostwick DG, Qian J, Bergstralh E, Dundore P, Dugan J, et al. (1996) Prediction of capsular perforation and seminal vesicle invasion in prostate cancer. *J Urol* 155: 1361-1367.

20. Rosai J, Ackerman LV. (2004) Rosai & Ackerman's Surgical Pathology.
Philadelphia: W. B. Saunders. 2894 p.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Photomicrographs of non tumoral prostate areas immunolabelled with anti-leptin (a) and anti-leptin receptor (b) antibodies (400X).

Figure 2. Photomicrographs of tumoral prostate areas. Sections with different Gleason grades immunolabelled with anti-leptin antibody (a, c, e) and anti-leptin receptor antibody (b, d, f). (400X).

Figure 3. Percentage of immunolabelled area with the anti-leptin receptor antibody in samples with (a) urethral margin involvement or not, (b) positive or negative surgical margin and (c) seminal vesicles invasion or not. (* $p > 0.05$).

Figure 4. Correlation between the percentage of anti-leptin receptor immunolabelled area and the sum of prognostic factors. ($p = 0.001$; $r^2 = 0.025$).

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

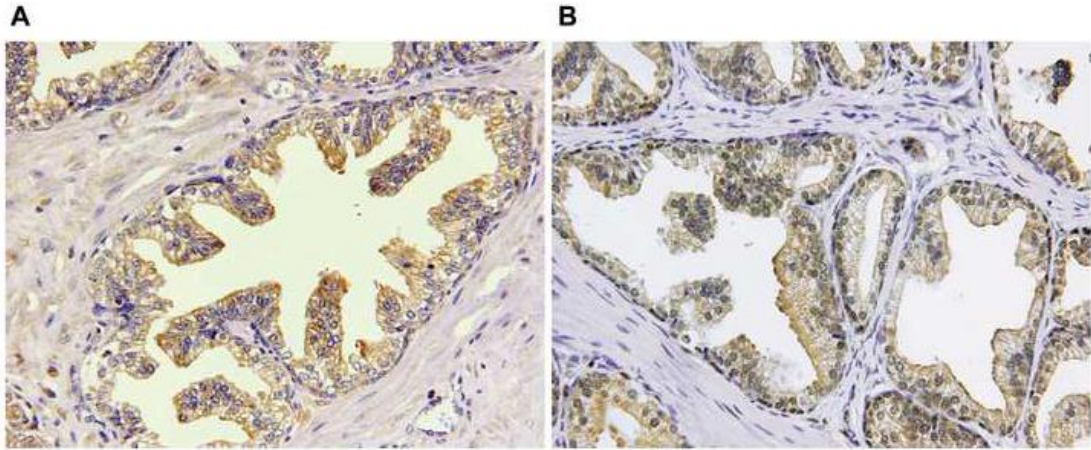


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

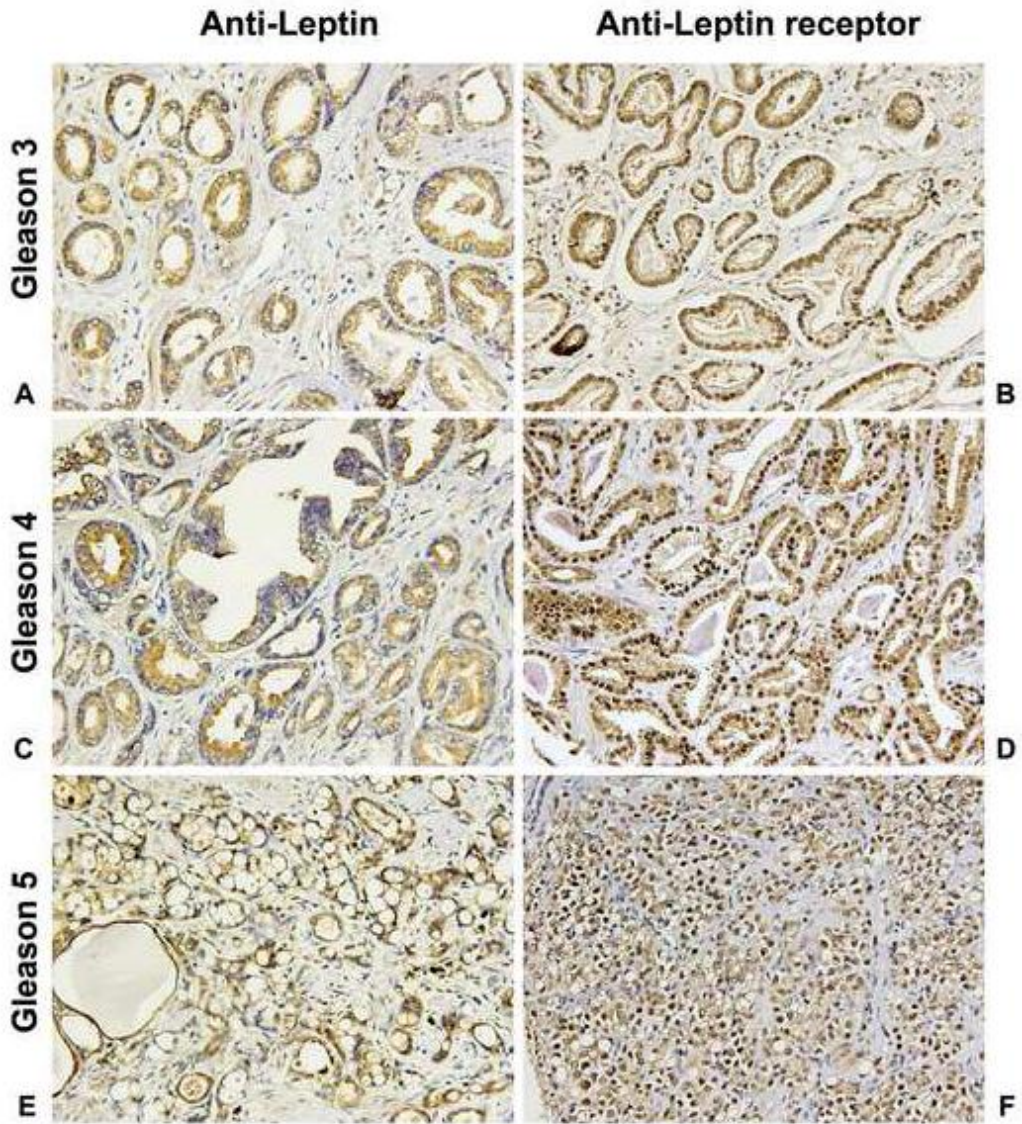


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

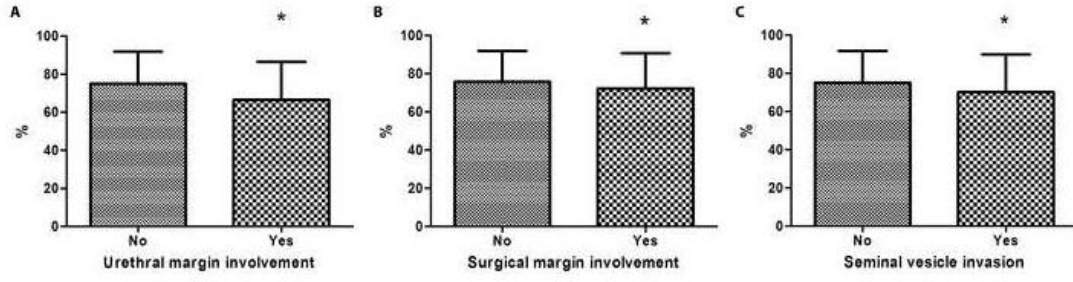
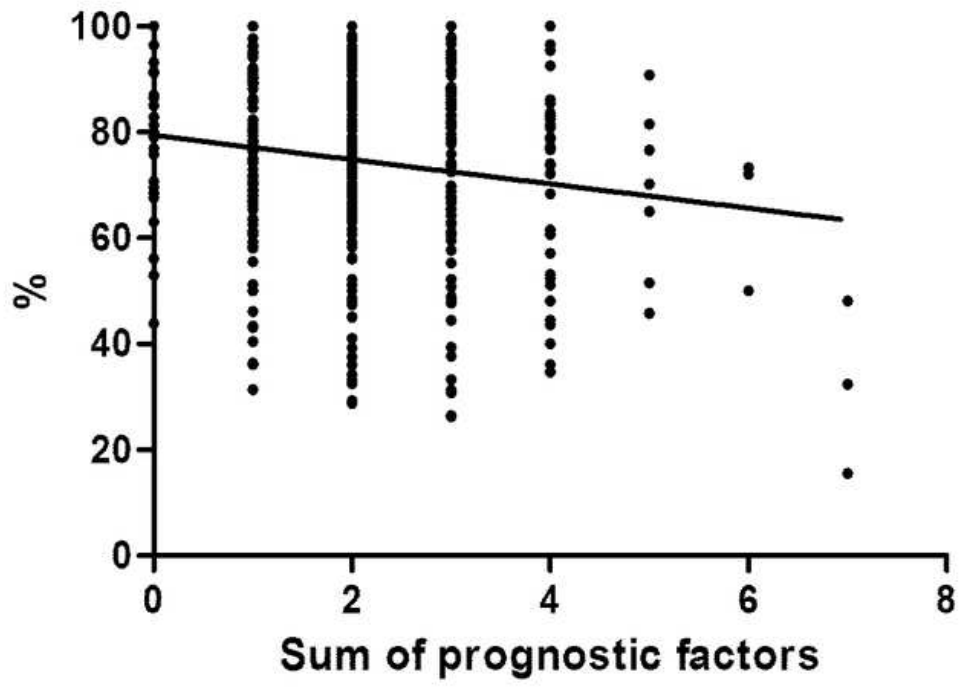
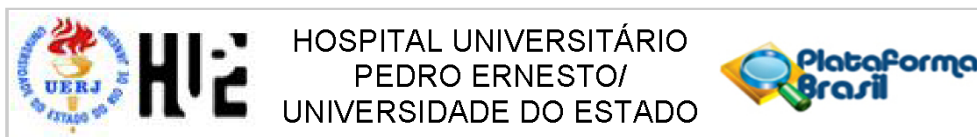


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)



ANEXO A - Documento de aprovação do comitê de ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO PROTEICA DA LEPTINA E SEU RECEPTOR NO CANCER DE PRÓSTATA COM DIFERENTES GRAUS DE GLEASON

Pesquisador: Clarice Fraga Esteves Maciel Osorio

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 12685413.6.0000.5259

Instituição Proponente: Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 335.816

Data da Relatoria: 17/07/2013

Apresentação do Projeto:

O cancer de próstata é um tumor bastante frequente e o escore de Gleason é o método mais comumente utilizado para avaliar o grau de agressividade desse tumor. Contudo este é um método subjetivo e como tal, é sujeito a erros. A obesidade e a leptina estão associados ao aparecimento de diferentes neoplasias, inclusive o cancer de próstata. Neste trabalho será avaliado se existe correlação entre o grau de Gleason e a expressão de leptina e seu receptor em carcinomas prostáticos. Para isso serão analisadas lâminas histológicas para avaliação do grau de Gleason e da imunomarcagem de tais anticorpos.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste trabalho é traçar um paralelo entre os graus da classificação de Gleason dos adenocarcinomas de próstata e os respectivos perfis de imunomarcagem para leptina e para o receptor da leptina.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Nenhum já que as amostras já foram coletas para avaliação diagnóstica rotineira

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão estudados 500 casos de adenocarcinomas prostáticos diagnosticados em peças provenientes de prostatectomias radicais a céu aberto, provenientes de um laboratório privado de

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253 **Fax:** (21)2264-0853 **E-mail:** cep-hupe@uerj.br

ANEXO B - Método de coloração de hematoxilina-eosina (H-E)

1. desparafinizar os cortes em estufa a 60° durante 1 hora;
2. desparafinizar os cortes em xilol por 1 minuto;
3. desparafinizar os cortes em xilol por 1 minuto;
4. desparafinizar os cortes em xilol por 1 minuto;
5. hidratar os cortes em álcool por 1 minuto;
6. hidratar os cortes em álcool por 1 minuto;
7. hidratar os cortes em álcool por 1 minuto;
8. hidratar em água corrente por 2 minutos;
9. corar na hematoxilina de 3 a 5 minutos;
10. retirar o excesso do corante por 3 minutos em água corrente;
11. diferenciar os cortes em álcool clorídrico a 1% por 10 segundos;
12. retirar o excesso do ácido clorídrico em água corrente por 4 minutos;
13. corar em eosina por 2 minutos;
14. desidratar em álcool por 1 minuto;
15. desidratar em álcool por 1 minuto;
16. desidratar em álcool por 1 minuto;
17. desidratar em álcool por 1 minuto;
18. clarificar em xilol por 1 minuto;
19. clarificar em xilol por 1 minuto;
20. clarificar em xilol por 1 minuto;
21. clarificar em xilol por 1 minuto;
22. montar em bálsamo.

ANEXO C - Método de imuno-histoquímica

1. desparafinização das lâminas silanizadas com os cortes na estufa a $60^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por, no mínimo, 40 minutos;
2. hidratação das lâminas em quatro banhos de EasyClean Solvente ecológico, por 5 minutos, em seguida, dois banhos de álcool absoluto, por 5 minutos, dois banhos de álcool 95%, também por 5 minutos e lavagem em água destilada;
3. bloqueio da peroxidase endógena: as lâminas passam por banho de 3.2 ml de peróxido de hidrogênio (30 volumes) diluído em 250ml de metanol a 30% por 15 minutos e, em seguida, lavadas em água destilada;
4. recuperação antigênica: as lâminas são colocadas em cuba preenchida por tampão de recuperação antigênica (tampão citrato pH 6.0), em câmara de pressão elétrica para imuno-histoquímica por 5 minutos a 125°C , em alta pressão. Ao final, são retiradas e resfriadas por 20 minutos em água corrente e lavadas com tampão PBS;
5. diluição dos anticorpos que utilizados, com solução diluidora comercial Biocare Da Vinci Green (código PD900M) na proporção 1:200 para leptina e 1:300 para o receptor de leptina;
6. bloqueio de ligações inespecíficas presentes na solução diluidora de anticorpos;
7. incubação com o anticorpo primário por uma hora;
8. lavagem das lâminas com tampão PBS;
9. incubação com o polímero – anticorpo secundário e reagente de ligação – Polímero Mach4 (Biocare, código M4BD534L) por 30 minutos de acordo com o protocolo que acompanha o kit;
10. lavagem das lâminas com tampão PBS;
11. revelação com DAB (5-diaminobenzidina, Biocare, código M4BD534L) por 5 minutos;
12. lavagem das lâminas com água destilada;
13. contracoloração das lâminas com hematoxilina de Harris;
14. lavagem das lâminas com água amoniacal (10 gotas de amônia para cada 250 ml de água destilada);
15. desidratação dos cortes em dois banhos de álcool 95%, por 2 minutos, dois banhos de álcool absoluto, por 2 minutos e quatro banhos de EasyClean Solvente ecológico, por 2 minutos;
16. montagem das lâminas.