

Instituto Politécnico do Porto  
Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto  
Departamento de Anatomia do Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar

Avaliação da linfoangiogénese em tumores da próstata  
induzidos em diferentes modelos de obesidade de  
ratinhos

Madalena Cristina Marques Costa Santos

Trabalho de candidatura ao Título de especialista no Instituto Politécnico  
do Porto, na área de Anatomia Patológica, Citológica e Tanatológica

2013

## RESUMO

O cancro da próstata é o segundo cancro mais frequente e a sexta causa de morte mundial por cancro no sexo masculino. Apesar da elevada morbimortalidade a sua etiologia é ainda desconhecida. A idade, a raça os níveis elevados de hormonas androgénicas, genes envolvidos no ciclo celular e angiogénese, a dieta e a obesidade têm sido apontados como fatores de risco para o desenvolvimento deste tumor. A obesidade está associada ao aumento da incidência e mortalidade por cancro, no entanto a associação entre o cancro da próstata e a obesidade é ainda controversa. As alterações nas expressões de adipocinas associadas à obesidade têm sido um dos diversos mecanismos propostos para explicar a associação entre a obesidade e o cancro da próstata, nomeadamente na promoção do desenvolvimento e progressão celular do tumor. A linfoangiogénese, o processo de formação de novos vasos linfáticos, tem sido apontada como um dos mecanismos que promove a disseminação tumoral, e parece estar alterada na obesidade.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a linfoangiogénese em tumores induzidos em diferentes modelos de obesidade e estudar a relação entre a obesidade e a linfoangiogénese no cancro da próstata.

Para isso, inocularam-se células RM1 de tumor da próstata androgénio independente em quatro modelos diferentes de ratinhos: ratinhos obesos ob/ob, ratinhos obesos e diabéticos db/db, ratinhos submetidos a dieta hipercalórica (DIO) e ratinhos normoponderais como controlo. 14 dias depois, os tumores foram então recolhidos e processados para histologia. Realizou-se então imunohistoquímica com o anticorpo anti-Lyve-1 para marcar os vasos linfáticos. Para cada amostra foi quantificada a percentagem de área marcada, bem como o número de vasos linfáticos usando uma ferramenta morfométrica computadorizada, o software ImageJ.

Ratinhos obesos ob/ob e DIO apresentam os tumores maiores comparativamente com o controlo ( $p < 0.001$ ), enquanto que os tumores db/db são os que apresentam os tumores mais pequenos ( $p = 0.047$ ). A expressão do Lyve-1 foi significativamente mais elevada nos tumores dos ratinhos DIO comparativamente com os tumores dos ratinhos db/db ( $p < 0.05$ ), contudo a expressão do Lyve 1 está negativamente correlacionado com a percentagem de gordura epididimária e peso corporal ( $p < 0.01$ ). Estes resultados sugerem que a obesidade deve ter um efeito protector contra a disseminação do cancro da próstata, pela inibição da linfoangiogénese através de um mecanismo ainda não identificado que parece não envolver a leptina.

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	2
ÍNDICE DE FIGURAS .....	3
ÍNDICE DE GRÁFICOS .....	4
ÍNDICE DE TABELAS .....	4
ABREVIATURAS.....	5
INTRODUÇÃO .....	6
Cancro da próstata .....	6
Obesidade .....	6
Leptina.....	8
Obesidade e cancro.....	8
Obesidade e cancro da Próstata .....	11
Cancro e linfoangiogénese .....	12
MATERIAIS E MÉTODOS .....	14
Cultura de Células .....	14
Estudo <i>in vivo</i> .....	15
Animais.....	15
Inoculação de células RM1 nos ratinhos.....	16
Vigilância dos animais durante o crescimento tumoral.....	16
Necrópsia, recolha de tecidos e histopatologia .....	17
Estudo <i>in vitro</i> .....	17
Imunohistoquímica para o Lyve 1 .....	17
Análise estatística dos resultados .....	18
RESULTADOS .....	20
Caracterização microscópica da cultura celular.....	20
Estudo <i>in vivo</i> .....	20
Estudo <i>in vitro</i> .....	22
DISCUSSÃO .....	26
CONCLUSÃO .....	29
BIBLIOGRAFIA.....	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Alterações do tecido adiposo na obesidade. No estado obeso, existe um aumento no tamanho e número de adipócitos, como também um aumento das células inflamatórias e endoteliais. Esta alteração de composição resulta no aumento da secreção da leptina e citocinas inflamatórias, PAI1, inibidor do ativador plasminogénico, TNF $\alpha$  e fator de necrose tumoral- $\alpha$ . (Khandekar et al., 2011)..... 7

Figura 2 - Potenciais vias de sinalização estimuladas pelas adipocinas que relacionam a obesidade e o cancro. AdipoR1/R2, recetor da adiponectina 1/2; AMPK, proteína cinase ativada pela adenosina monofosfato; IGF-1, fator de crescimento semelhante a insulina do tipo 1; IGF-1R, recetor do fator de crescimento semelhante a insulina do tipo 1; IKK, cinases I $\kappa$ B; IL-6, interleucina-6; IL-6R, recetor da interleucina-6; IR, recetor de insulina; IRS-1, recetor insulina substrato 1; JAK, Janus cinase; MAPK, proteína cinase ativada por mitogénio; mTOR, alvo da rapamicina do mamífero; NF- $\kappa$ B, fator nuclear- $\kappa$ B; ObR, recetor da leptina; PAI-1, inibidor do ativador do plasminogénio 1; PI3-K, cinase fosfatidilinositol 3; ROS, espécies reativas de oxigénio; STAT3, sinal transdutor e ativador de transcrição 3; TNF- $\alpha$ , fator de necrose tumoral - $\alpha$ ; TNF-R1, recetor do fator de necrose tumoral; TRADD, domínios de morte associados TNFRSF1A; TRAF2, fator 2 associado ao recetor do TNF; TSC2, complexo 2 de esclerose tuberulosa; uPA, urocinase ativadora do plasminogénio, uPAR, recetor da urocinase ativadora do plasminogénio; VEGF, fator de crescimento vascular endotelial; VEGFR, recetor fator de crescimento vascular endotelial. (van Kruijsdijk et al., 2009)..... 10

Figura 3 - Mecanismos biológicos que contribuem para associação epidemiológica entre obesidade e cancro da próstata agressivo. DRE- exame retal digital; E-Estrogénio; IGF- fator de crescimento semelhante a insulina; IL- Interleucina; PSA- antigénio específico da próstata; T-Testosterona. (Allott et al., 2013) ..... 11

Figura 4 – Linfoangiogénese embrionária *versus* linfoangiogénese tumoral. Durante o início do desenvolvimento dos vasos linfáticos, os precursores das células endoteliais linfáticas da veia cardinal migram e formam sacos de linfa, dos quais os vasos linfáticos começam a estender-se pelo organismo. No microambiente tumoral, vários fatores de crescimento linfáticos são secretados pelas células tumorais, células inflamatórias (TAMs) e pelas células do estroma, esses fatores estimulam a formação neolinfáticos quer peritumorais quer na área intratumoral, o que facilita invasão das células tumorais nos vasos linfáticos. (Duong et al., 2012) ..... 12

Figura 5 - Células RM1 em cultura (80 % de confluência) 100x..... 20

Figura 6 – Adenocarcinoma da próstata RM1 com os vasos linfáticos marcados por imunohistoquímica usando o anticorpo anti- Lyve-1. Na imagem, vasos sanguíneos podem ser visualizados como indicado pelas cenas negras em contraste com os vasos linfáticos marcados com o DAB (200x)..... 23

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Comparação da massa corporal dos ratinhos 14 dias, após a inoculação, nos diferentes grupos (ANOVA- $p < 0.001$ : control vs db/db e control vs ob/ob) .....	21
Gráfico 2 – Comparação da percentagem de gordura epididimária nos diferentes grupos de ratinhos (ANOVA - $p < 0.01$ : control vs db/db; $p < 0.001$ : control vs ob/ob) .....	21
Gráfico 3 - Massa dos tumores obtidos 14 dias após a inoculação nos diferentes grupos de ratinhos (ANOVA - $p < 0.05$ : control vs db/db; $p < 0.001$ : control vs DIO e control vs ob/ob).....	22
Gráfico 4 - Percentagem de área marcada de Lyve-1 nos tumores RM1 induzidos nos diferentes grupos de ratinhos (ANOVA: $p < 0.05$ : DIO vs db/db).....	24
Gráfico 5 – Número de vasos linfáticos por pixel ao quadrado nos tumores RM1 induzidos nos diferentes grupos de ratinhos (ANOVA: $p < 0.05$ : DIO vs db/db) .....	24

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Tabela sumária do aumento do risco relativo, de diferentes cancros na obesidade (Khandekar et al., 2011).....	9
Tabela 2 - Resultados dos estudos de correlação realizados (teste de Spearman) .....	25

## ABREVIATURAS

### B

BSA- Albumina sérica bovina

### D

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO - Dimetilsulfóxido

DAB - Diaminobenzidine tetrahydrochloride

DIO – obesidade induzida pela dieta

### E

SEM - erro padrão da média

### F

FBS- Soro de bovino Fetal

### I

IGF-1-fator de crescimento semelhante a insulina do tipo 1

IGF-1R- recetor do fator de crescimento semelhante a insulina do tipo 1

IGF-2-fator de crescimento semelhante a insulina do tipo 2

IL- interleucina

IT- integrinas

IMC-índice de massa corporal

ICLAS - International Council for Laboratory Animal Science

### L

LEC- células endoteliais linfáticas

Lyve-1 - recetor hialurónico dos vasos linfático endotelial

### P

PAI-1- inibidor do ativador de plasminogénio

PBS- tampão fosfato salino

PSA – antigénio específico da próstata

Prox-1 - prospero homeobox 1

### R

RPM – Rotações por minuto

### S

SAFE- Scientific Animal Food & Engineering

### T

TGF $\alpha$ - fator de crescimento tumoral  $\alpha$

### V

VEGF-fator de crescimento endotelial vascular

## **INTRODUÇÃO**

### **Cancro da próstata**

O cancro da próstata é segundo cancro mais diagnosticado e o sexto mais mortal entre os homens (Center et al., 2012).

Em Portugal, segundo dados do Portal de Oncologia Português o cancro da próstata também é o mais frequente, e existem cerca de 4.000 novos casos e aproximadamente 1800 mortes por ano, sendo responsável por cerca 10% da mortalidade por cancro, e por cerca de 3.5% de todas as mortes (POP, 2013). À semelhança da Europa, o cancro da próstata, em Portugal, também é a terceira causa de morte, a seguir ao cancro do pulmão e do cólon (POP, 2013).

O carcinoma da próstata é conhecido por ser uma doença dos homens idosos, ter um caráter indolente, com um desenvolvimento lento, e pode ser precedido por lesões displásicas durante muitos anos, ou mesmo décadas (Leitzmann and Rohrmann, 2012).

Tipicamente, este tumor inicia-se com lesões androgénio dependentes, contudo frequentemente evolui para lesões androgénio independentes, com progressão para um estadio mais avançado e mais agressivo, conduzindo a um pior prognóstico, doença incurável e até morte (Koochekpour, 2011).

É uma neoplasia multifatorial, uma vez que possui diversos fatores de risco. Fatores de risco de categoria demográfica como idade, raça e localização e fatores de risco relacionados com o estilo de vida, como a dieta e o sedentarismo (Hsing and Chokkalingam, 2006). História familiar do cancro, bem como alterações nos níveis hormonais têm sido apontados como fatores de risco (Koochekpour, 2011, Azevedo et al., 2011).

### **Obesidade**

A obesidade representa um problema de saúde pública, tendo atingido proporções epidémicas nos últimos anos. Tem a sua prevalência aumentada em todo o mundo, prevendo-se que em 2030 afete mais de um bilião de pessoas (Phillips, 2013). De acordo com dados da sociedade Portuguesa da Obesidade cerca de milhão de Portugueses são obesos (SPEO, 2013).

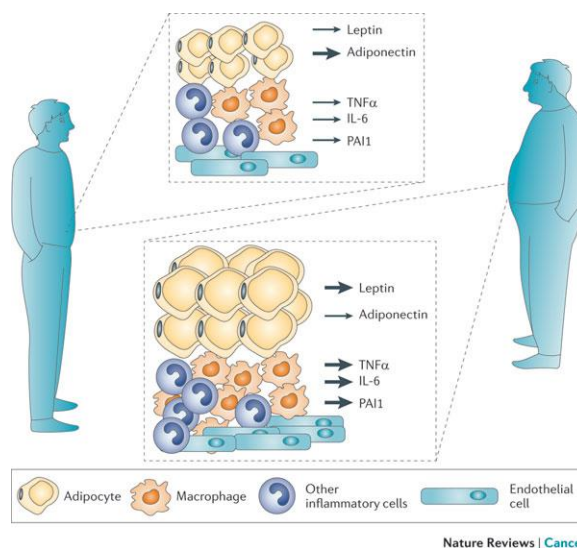
A obesidade é definida como uma acumulação anormal e excessiva de gordura no tecido adiposo (Donohoe et al., 2011). Esta resulta de uma complexa interação entre o ambiente, o comportamento e a predisposição genética (Cheung and Mao, 2012).

A obesidade representa um enorme fator de risco para as doenças metabólicas, como diabetes tipo 2, estando associada a outras co-morbidades como doenças cardiovasculares, hipertensão, cancro entre outras (Khandekar et al., 2011, Nieman et al., 2013).

Na obesidade o tecido adiposo torna-se disfuncional, devido a acumulação excessiva de gordura (Forte et al., 2012). Os adipócitos aumentam em tamanho e número, existindo também um aumento de células inflamatórias e endoteliais, um aumento de secreção de leptina e citocinas inflamatórias, com uma diminuição na secreção de adiponectina, tal como observado na figura 1 (Forte et al., 2012, Khandekar et al., 2011).

O tecido adiposo é um órgão metabolicamente ativo com inúmeras funções, constituído por diferentes tipos de células, constituindo assim um órgão heterogéneo. Pode ser separado numa fração lipídica contendo adipócitos e numa fração vascular estromal constituída por pré-adipócitos, macrófagos, outras células inflamatórias e células endoteliais (Ribeiro et al., 2012a, Khandekar et al., 2011).

Devido à função endócrina do tecido adiposo, quando os adipócitos se tornam disfuncionais, como por exemplo na obesidade, são responsáveis pelo aparecimento de diversas patologias (Nieman et al., 2013).



Nature Reviews | Cancer

**Figura 1 - Alterações do tecido adiposo na obesidade. No estado obeso, existe um aumento no tamanho e número de adipócitos, como também um aumento das células inflamatórias e endoteliais. Esta alteração de composição resulta no aumento da secreção da leptina e citocinas inflamatórias, PAI1, inibidor do ativador plasminogénico, TNF $\alpha$  e fator de necrose tumoral- $\alpha$ . (Khandekar et al., 2011)**

## **Leptina**

As adipocinas são hormonas produzidas no tecido adiposo (Leze et al., 2012).

A leptina é a adipocina mais estudada e parece estar envolvida na manutenção e crescimento fisiológico da próstata (Leze et al., 2012) e tem sido umas das adipocinas mais relacionadas com o cancro da próstata e a obesidade, devido aos seus efeitos cruciais na proliferação celular, apoptose, invasão celular, angiogénese e na regulação da formação do tumor (Paz-Filho et al., 2011). De acordo com alguns estudos, os níveis elevados desta adipocina, observados na obesidade, estão associados a uma maior progressão do carcinoma da próstata, em particular de tumores androgénio independentes (Hoda et al., 2012, Prieto-Hontoria et al., 2011). Contudo, outros estudos efetuados na linha celular RM1 do carcinoma da próstata androgénio independente evidenciaram que os elevados níveis de leptina estavam associados a uma proliferação celular menor (Ribeiro et al., 2012a). O que poderá dever-se ao facto das células independentes dos androgénios serem menos diferenciadas e mais autónomas que as dependentes, e por isso poderem depender menos do efeito do microambiente tumoral, mais concretamente das adipocinas (Nieman et al., 2013).

## **Obesidade e cancro**

De acordo com estudos recentes parece existir uma relação entre obesidade e cancro, sendo que epidemiologicamente existe uma associação evidente entre índice de massa corporal (IMC) e vários tipos de tumores (Tabela 1) (Khandekar et al., 2011).

A nível mundial, a obesidade é responsável por um aumento de 52% e 88% na taxa de mortalidade por cancro nos homens e mulheres, respetivamente (Nieman et al., 2013).

**Tabela 1- Tabela sumária do aumento do risco relativo, de diferentes cancros na obesidade (Khandekar et al., 2011).**

Cancer type	Men (95% CI)	Women (95% CI)
Breast	ND	1.12 (1.08–1.16)
Colon	1.24 (1.20–1.28)	1.09 (1.05–1.13)
Endometrial	NA	1.59 (1.50–1.68)
Oesophageal	1.52 (1.33–1.74)	1.51 (1.31–1.74)
Kidney	1.24 (1.15–1.34)	1.34 (1.25–1.43)
Leukaemia	1.08 (1.02–1.14)	1.17 (1.04–1.32)
Melanoma	1.17 (1.05–1.30)	0.96 (0.92–1.01)
Myeloma	1.11 (1.05–1.18)	1.11 (1.07–1.15)
Non-Hodgkin's lymphoma	1.06 (1.03–1.09)	1.07 (1.00–1.14)
Pancreatic	1.07 (0.93–1.23)	1.12 (1.02–1.22)
Prostate	1.03 (1.00–1.07)	NA
Rectal	1.09 (1.06–1.12)	1.02 (1.00–1.05)
Thyroid	1.33 (1.04–1.70)	1.14 (1.06–1.23)

CI, confidence interval; NA, not applicable; ND, not determined. \*Relative risks are taken from a meta-analysis of data as reported in Renehan et al.<sup>3</sup> and Roberts et al.<sup>172</sup>. The relative risk per 5 kg per m<sup>2</sup> increase in body mass index is reported for each site and sex.

O índice de massa corporal (IMC = kg/m<sup>2</sup>) é a medida mais comum para determinar a adiposidade corporal, no entanto não expressa as alterações metabólicas que podem estar envolvidos na carcinogénese. A síndrome metabólica é definida como um conjunto de alterações como a obesidade visceral, a hiperglicemia, a hipertensão e dislipidemia, que constitui um fator de risco para co-morbidades como a diabetes tipo 2 e as doenças cardiovasculares, é tida como potencial indicador do papel da obesidade na carcinogénese (Cowey and Hardy, 2006).

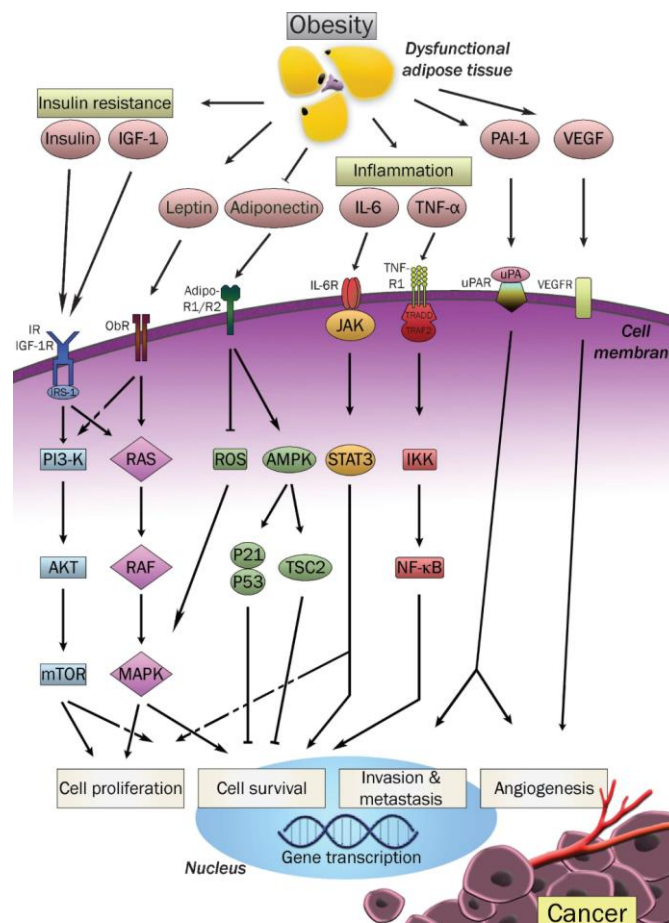
Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a interação entre a obesidade e o cancro e como a obesidade pode contribuir para o crescimento e desenvolvimento do cancro (Forte et al., 2012, Fowke et al., 2012, Park et al., 2011, Paz-Filho et al., 2011). Os principais baseiam-se na função endócrina e metabólica do tecido adiposo, e estão relacionados com alterações hormonais, mais concretamente o aumento dos estrogénios, da insulina e do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) (Forte et al., 2012, Fowke et al., 2012, Paz-Filho et al., 2011), assim como alterações na resposta imune e na expressão de adipocinas (Donohoe et al., 2011, Park et al., 2011).

Na verdade, muitas adipocinas têm os seus níveis aumentados na obesidade associada ao cancro, e parecem ter efeito mitogénico e proliferativo no crescimento

celular das células tumorais, favorecendo assim o desenvolvimento e progressão celular do tumor (Figura 3) (van Kruijsdijk et al., 2009).

Em síntese, existem vários fatores que podem estar envolvidos no desenvolvimento do cancro em pessoas obesas (van Kruijsdijk et al., 2009).

Esses fatores podem ser: parâmetros antropométricos (índice de massa corporal, aumento de peso, gordura visceral), fatores relacionados com o estilo de vida (dieta hipercalórica, aumento de ingestão de gordura animal, carboidratos refinados e diminuição na ingestão de vegetais e fibras, frutas e vitamina D), mecanismos biológicos (hiperglicemia e resistência à insulina, proteínas IGF-1, IGF-2, hormonas sexuais, estado crónico de inflamação, inflamação do tecido adiposo, produção de adipocinas, fatores de crescimento vascular do tecido adiposo, susceptibilidade genética, stress oxidativo, sistema imune (van Kruijsdijk et al., 2009).



**Figura 2 - Potenciais vias de sinalização estimuladas pelas adipocinas que relacionam a obesidade e o cancro.** AdipoR1/R2, recetor da adiponectina 1/2; AMPK, proteína cinase ativada pela adenosina monofosfato; IGF-1, fator de crescimento semelhante a insulina do tipo 1; IGF-1R, recetor do fator de crescimento semelhante a insulina do tipo 1; IKK, cinases IκB ; IL-6, interleucina-6; IL-6R, recetor da interleucina-6 ; IR, recetor de insulina; IRS-1, recetor insulina substrato 1; JAK, Janus cinase; MAPK, proteína cinase ativada por mitogénio; mTOR, alvo da rapamicina do mamífero; NF-κB, fator nuclear-κB; ObR, recetor da leptina; PAI-1, inibidor do ativador do plasminogénio 1; PI3-K, cinase fosfatidilinositol 3; ROS, espécies reativas de oxigénio; STAT3, sinal transdutor e ativador de transcrição 3; TNF-α, fator de necrose tumoral - α; TNF-R1, recetor do fator de necrose tumoral ; TRADD, domínios de morte associados TNFRSF1A; TRAF2, fator 2 associado ao recetor do TNF; TSC2, complexo 2 de esclerose tuberulosa; uPA, urocinase ativadora do plasminogénio, uPAR, recetor da urocinase ativadora do plasminogénio; VEGF, fator de crescimento vascular endotelial; VEGFR, recetor fator de crescimento vascular endotelial. (van Kruijsdijk et al., 2009)

## Obesidade e cancro da Próstata

Vários estudos epidemiológicos sugerem que a obesidade está associada a um risco elevado no desenvolvimento de vários tipos de tumor incluindo o cancro da próstata (Allott et al., 2013).

Vários estudos sugerem uma associação entre obesidade e incidência do cancro da próstata. No entanto, estudos individuais diferem nos seus resultados, reportando que não existe associação entre obesidade e cancro da próstata, outros defendem que a obesidade é apenas um fator de risco e outros ainda defendem que a obesidade apresenta um papel protetor no cancro da próstata (Allott et al., 2013).

De acordo com estudos realizados, a obesidade no cancro da próstata tem um duplo efeito, pois está associada a uma diminuição do risco de ter cancro da próstata localizado, mas a um aumento do risco de ter cancro da próstata avançado (Discacciati et al., 2012).

Tem se demonstrado consistentemente que existe relação entre aumento de massa corporal e cancro da próstata fatal. Os mecanismos que supostamente estão envolvidos nesta associação são essencialmente o eixo insulina/IGF-1, hormonas sexuais e sinalização de adipocinas (Figura 3) (Allott et al., 2013).

Como já mencionado anteriormente em situações de obesidade, ocorre uma resistência a insulina, e por consequência um aumento dos níveis de insulina circulante. O que vai desencadear um aumento do IGF-1, que através da ligação ao seu recetor vai ativar diferentes vias de sinalização. Estes vão promover a mitogénese e inibir a apoptose

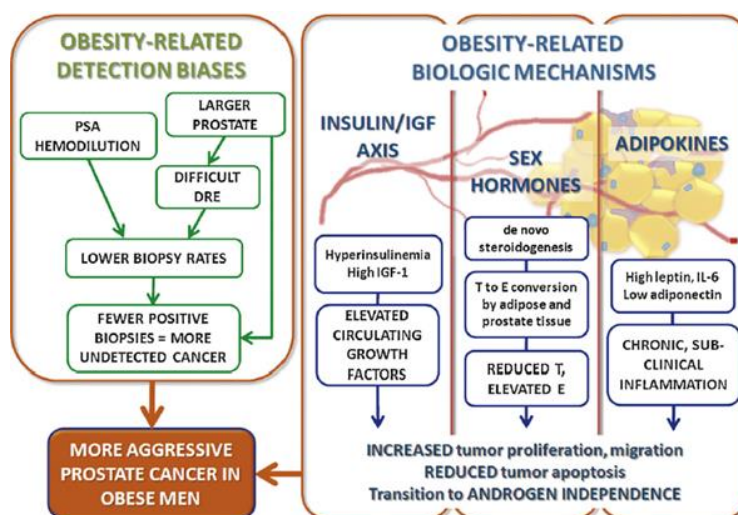


Figura 3 - Mecanismos biológicos que contribuem para associação epidemiológica entre obesidade e cancro da próstata agressivo. DRE- exame de próstata por toque retal; E-Estrogénio; IGF- fator de crescimento semelhante a insulina; IL- Interleucina ; PSA- antígeno específico da próstata; T-Testosterona. (Allott et al., 2013)

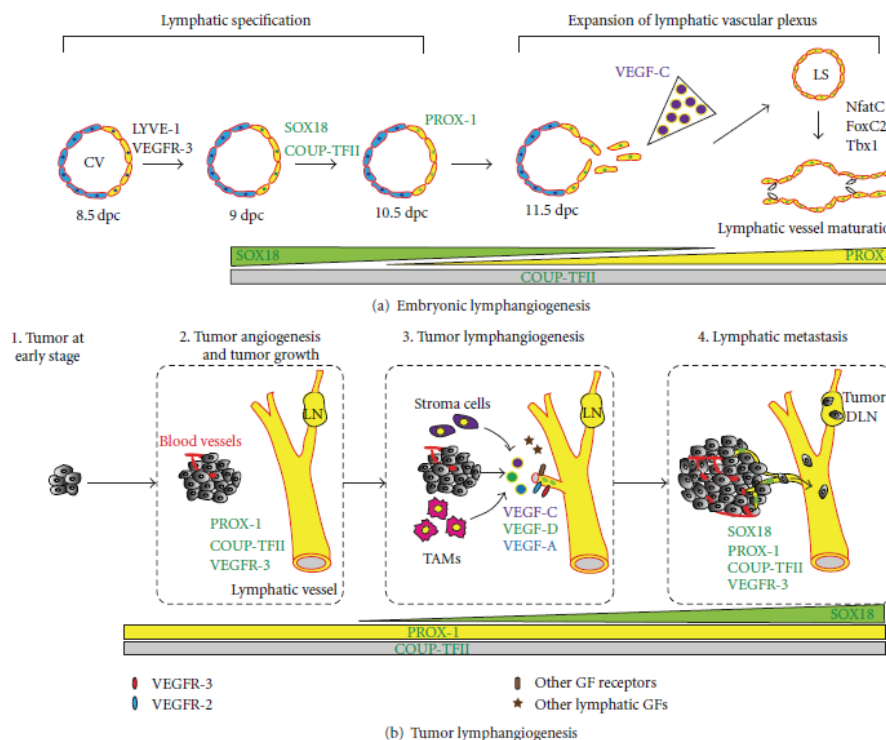
das células tumorais (Nieman et al., 2013).

Por outro lado, sabe-se que o tecido adiposo é a fonte predominante da enzima aromatase que converte os androgénios em estrogénios, que promove o desenvolvimento dos tumores dependentes destas hormonas sexuais (Nieman et al., 2013).

Além disso, como a obesidade está associada a um estado de inflamação crónica, com aumento de células inflamatórias e da expressão de adipocinas com potencial oncológico (Nieman et al., 2013).

### Cancro e linfoangiogénese

O sistema linfático constitui uma parte altamente especializada do sistema vascular desempenha funções importantes no organismo não só em processos fisiológicos como vigilância imunitária e absorção de gordura bem como em processos patológicos (Figura 4) (Duong et al., 2012).



**Figura 4 – Linfoangiogénese embrionária versus linfoangiogénese tumoral.** Durante o início do desenvolvimento dos vasos linfáticos, os percursos das células endoteliais linfáticas da veia cardinal migram e formam sacos de linfa, dos quais os vasos linfáticos começam a estender-se pelo organismo. No microambiente tumoral, vários fatores de crescimento linfáticos são secretados pelas células tumorais, células inflamatórias (TAMs) e pelas células do estroma, esses fatores estimulam a formação neolinfáticos quer peritumorais quer na área intratumoral, o que facilita invasão das células tumorais nos vasos linfáticos. (Duong et al., 2012)

A linfoangiogénese é o processo que leva a formação de novos vasos linfáticos a partir de vasos sanguíneos pré-existentes, na presença de sinais indutores apropriados, tais como o fator de transcrição Prox-1, VEGF- C e o recetor hialurónico dos vasos linfático endotelial – Lyve 1) (Figura 4) (Albrecht and Christofori, 2011, Marcelo et al., 2013, Schulte-Merker et al., 2011, Duong et al., 2012).

Os vasos linfáticos são constituídos por células endoteliais linfáticas (LEC), que expressam marcadores como o Lyve-1, VEGF-C, aquando da formação dos vasos linfáticos, o que permite a sua especificação e a maturação dos mesmos (Albrecht and Christofori, 2011, Baluk and McDonald, 2008, Marcelo et al., 2013) .

Nos adultos a linfoangiogénese é quiescente, estando restrita a formação do endométrio na gravidez. Contudo, está envolvida em diversas situações patológicas, como reparação de tecidos, cicatrização, inflamação e cancro (Albrecht and Christofori, 2011).

Na obesidade, parece haver uma forte associação entre a linfoangiogénese e o aumento do tecido adiposo, dado que estão aumentados os níveis de VEGF-C, o que poderá explicar o aumento do risco de disseminação do cancro nos indivíduos obesos, como está descrito para vários tipos de cancro, como o cancro da próstata (Amling et al., 2004, Freedland et al., 2004, Silha et al., 2005, Wada et al., 2011).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Cultura de Células

As células utilizadas neste estudo foram células de carcinoma da próstata androgénio independentes RM1, de origem murina, gentilmente fornecidas pela equipa do Prof T Thompson do MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA (Baley et al., 1995). Estas células foram obtidas partir de tumores induzidos em ratinhos Zip ras/myc-9 modelo MPR (cancro da próstata reconstituído em ratinho) produzidos no MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA (Baley et al., 1995).

As células RM1 foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium, Sigma) com glucose elevada, suplementado com 10% de FBS (soro de bovino fetal, Gibco), 1% penicilina (100U/mL, Sigma) e 1% estreptomicina (100U/mL Sigma). O meio de congelamento das células RM1 era composto por DMEM com glucose elevada, 40% de FBS e 10% DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma).

Após descongelamento rápido em banho a 37°C das células RM1 na P17, previamente criopreservadas a -80°C, até estar cerca de metade do conteúdo descongelado, as células foram transferidas para um tubo centrífuga (TPP) contendo 5mL do meio de cultura e centrifugadas a 900 rpm durante 3 min. Após a centrifugação descartou-se o sobrenadante e o *pellet* de células foi ressuspensionado em meio de cultura completo e transferido para um frasco de cultura de 25cm<sup>3</sup>, que foi colocado numa incubadora (Heracell 150, Thermo Scientific) a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi mudado 24h depois de semeadas as células, para eliminar células mortas e posteriormente de dois em dois dias, ou sempre que se justificasse, para renovar os nutrientes das células.

As culturas foram mantidas até a formação de monocamada (confluência de 85-90%) sendo depois efetuada a tripsinização, para posterior subcultura ou congelamento das células. Neste processo, o meio de cultura das células foi todo retirado e procedeu-se a uma lavagem das células com solução de tampão fosfato (PBS) 1% (Gibco) para retirar excesso de proteínas do soro, que pudesse inativar a solução de tripsina/EDTA (Sigma), que se colocaria de seguida durante 2-3 minutos a 37°C para que ocorresse a desagregação das células. De seguida, adicionou-se meio de

cultura completo (o dobro da quantidade de solução de tripsina usada) para neutralizar a tripsina, transferiram-se as células para um tubo de centrifuga, e procedeu-se à centrifugação a 1100 rpm durante 5 min. Após centrifugação, descartou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em meio de cultura ou meio de congelação, no caso de sub-cultura ou criopreservação das células, respectivamente.

Após ressuspensão das células procedeu-se a contagem em câmara de Neubauer no microscópio óptico invertido (101M, Motic), para contagem do número de células existente para poderem ser alíquotadas ou usadas para preparação de células a injetar.

### **Estudo *in vivo***

#### **Animais**

O manuseio animal e os procedimentos experimentais seguiram as recomendações do *International Council for Laboratory Animal Science* (ICLAS). Foram tomadas todas as precauções com o intuito de minimizar o sofrimento animal e de reduzir o número de animais utilizados.

Os animais utilizados neste estudo foram adquiridos à Charles River Laboratories, (Barcelona, Espanha), tendo sido usadas 4 estirpes diferentes de ratinhos machos.

- DIO, ratinhos C57BL/6 submetidos a dieta hipercalórica (45% de lípidos) para induzir obesidade;
- ob/ob (B6.VLepob/J), ratinhos obesos com mutação espontânea inativante do gene da leptina;
- db/db (BKS.Cg-m +/+ Lepdb/J), ratinhos obesos e diabéticos com mutação espontânea do gene do recetor da leptina;
- C57BL/6, ratinhos normoponderais utilizados como controle.

Os ratinhos foram alojados e mantidos a temperatura ( $\approx 21^{\circ}\text{C}$ ) e humidade constantes ( $55 \pm 10\%$ ), com ciclo de luz/obscuridade controlado de 12h/12h. Todos eles foram alimentados, *ad libitum*, com dieta completa normal (SAFE- Scientific Animal Food & Engineering), com exceção dos ratinhos DIO que tiveram uma

alimentação hipercalórica de origem comercial (dieta hipercalórica 45KJ % Gordura, Charles River). Todos os procedimentos foram aprovados pela Direção Geral de Veterinária.

Após o período de quarentena, os animais (n= 6), foram devidamente marcados dentro de cada grupo para posteriores pesagens. Foi efetuada a aclimação com observações diárias para avaliação da ingestão alimentar, aspeto geral e comportamento espontâneo.

### **Inoculação de células RM1 nos ratinhos**

- Preparação das células

As células RM1 foram tripsinizadas à passagem P17 coradas com *Trypan Blue* (para avaliação da viabilidade) e contadas em câmara *Newbauer*. Da *pool* das células obtidas, preparou se um volume de 500 µL com  $3 \times 10^5$  células ressuspendidas em PBS, para posterior injeção em cada animal. O número de células inoculado, para este tipo de células, já tinha sido calculado anteriormente (Ribeiro et al., 2010).

- Inoculação das células tumorais RM1

Todos os procedimentos animais foram efetuados numa sala de manipulação e devidamente acompanhados pela Veterinária do biotério para controlo da dor, aplicando anestesia e analgesia quando os procedimentos assim o exigiam.

Nos animais foi criada uma bolsa de ar tal como descrito por Hori *et al* (Hori et al., 2002) e efetuou-se a injeção subcutânea das células no dorso dos animais, na região interescapular onde previamente foi executada a bolsa.

Após injeção os animais foram vigiados durante o dia para observação de alguns efeitos secundários pós injeção.

### **Vigilância dos animais durante o crescimento tumoral**

O desenvolvimento tumoral foi acompanhado durante os 14 dias através do registo diário do peso corporal, avaliando assim a ingestão alimentar, observação do seu estado, aspeto geral e comportamento espontâneo, crescimento tumoral (medição dos tumores com um calímetro) e possível ulceração dos tumores.

Os *endpoints* considerados neste trabalho foram a perda acentuada de peso ( $\geq 25\%$ ), persistente hipotermia, respiração ruidosa com possível corrimento nasal ou cianose, tamanho dos tumores a excedem o diâmetro de 1.5 cm. Se algum destes critérios fosse observado os animais eram imediatamente eutanasiados.

### **Necrópsia, recolha de tecidos e histopatologia**

O crescimento tumoral foi analisado após 14 dias da inoculação das células RM1. Os animais foram eutanasiados através da inalação de CO<sub>2</sub>.

Os tumores foram medidos e após excisão foram pesados. Depois da incisão cutânea na região abdominal retirou-se a gordura epididimária e efetuou-se o registo do peso.

Após retirada dos tumores estes foram imediatamente fixados num recipiente adequado, com paraformaldeído 4% e ácido pícrico 0,4% em (PBS), durante 24 horas, sendo posteriormente processados num processador automático (*Shandon, Citadel 2000*), durante 12 horas, *overnight*. Na inclusão (aparelho de inclusão *Shandon-Histocentre*), as amostras foram orientadas de modo a obtermos a representação peritumoral e intratumoral. Dos blocos de parafina efetuaram-se cortes (Micrótomo *Minot Leica®- RM2125RT*) com 3  $\mu\text{m}$  de espessura.

### **Estudo *in vitro***

#### **Imunohistoquímica para o Lyve 1**

A presença da proteína Lyve-1 foi avaliada através de um estudo imunohistoquímico. Foram realizados cortes de 3  $\mu\text{m}$  para lâminas adesivadas SuperFrost (Thermo Scientific®). As lâminas foram posteriormente colocadas na estufa a 37°C, até a execução da técnica IHQ.

Como controlo negativo, foi utilizado o mesmo tecido sem a incubação com anticorpo primário, sendo este substituído por BSA 5%.

Os cortes foram desparafinados em xilol e hidratados. De seguida realizou-se a recuperação antigénica com panela de pressão em solução tampão citrato 0,01M (pH 6,0) com Tween 20 a 0.05%, durante 3 minutos depois de ferver. Seguidamente e após arrefecimento, os cortes foram lavados, 2 vezes, em PBS (pH 7,4) com Tween 20 a

0.05% (PBS-T), durante 5 minutos. A peroxidase endógena foi neutralizada com peróxido de hidrogénio (Merck), a 3% em metanol, durante 20 minutos à temperatura ambiente e de seguida foram realizadas 3 lavagens com PBS-T.

As lâminas foram montadas no aparelho “Sequenza Immunostaining Center” (Thermo Scientific Shandon) e os cortes foram incubados com soro de porco (Swine Serum, Dako Denmark - diluição 1:5 em BSA 10%), de modo a bloquear marcação inespecífica, durante 30 minutos.

Em seguida foi realizada a incubação com o anticorpo primário anti-Lyve-1 (ab33682; 1:750; Abcam) diluição 1:750 em BSA 5%) durante a noite a 4°C.

Posteriormente, foram realizadas 3 lavagens de 5 minutos com PBS-T e os cortes foram incubados com anticorpo secundário (Polyclonal swine anti-rabbit, Dako Denmark - diluição 1:200 em BSA 5%) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Findo o tempo de incubação os cortes foram lavados 3 vezes com PBS-T durante 5 minutos e em seguida realizou-se a incubação durante 30 minutos com o complexo ABC (Vector - A e B numa diluição de 1:100 em BSA 5%) à temperatura ambiente, seguida de 3 lavagens de 5 minutos com PBS-T.

A revelação das lâminas foi realizada utilizando o substrato DAB (Diaminobenzidine tetrahydrochloride, Dako) que foi deixado atuar durante 2 minutos. Após lavagem em água corrente procede-se à contrastação nuclear com a hematoxilina de *Harris* (1 minuto), com posterior azulamento dos núcleos em lavagem em água corrente (15 minutos). Após a desidratação e diafanização, procedeu-se à montagem manual das lâminas utilizando como meio de montagem (*entellan*).

### **Análise estatística dos resultados**

Para cada grupo foram calculadas as médias e o erro padrão da média (SEM) e analisada a normalidade e homogeneidade das variâncias.

A comparação entre os quatro grupos independentes face a uma variável quantitativa foi analisada pelo teste de ANOVA (Análise de variância) a 1 fator, seguido pelo Post-hoc de Dunn quando a comparação foi entre todos os grupos ou de Dunnett quando os grupos foram comparados apenas com o controlo. Os estudos de correlação foram realizados através do teste de Spearman. Um valor de  $p < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism (versão 5.0) para o Windows, excepto os estudos de correlação que foram realizados utilizando o software SPSS (versão 20.0) para o Windows.

## RESULTADOS

### Caracterização microscópica da cultura celular

As células de carcinoma da próstata RM1 são fibroblastos uninucleares, aderentes com um rápido crescimento. Na figura 7 pode-se observar as células RM1 em cultura com 80% de confluência (Figura 7).

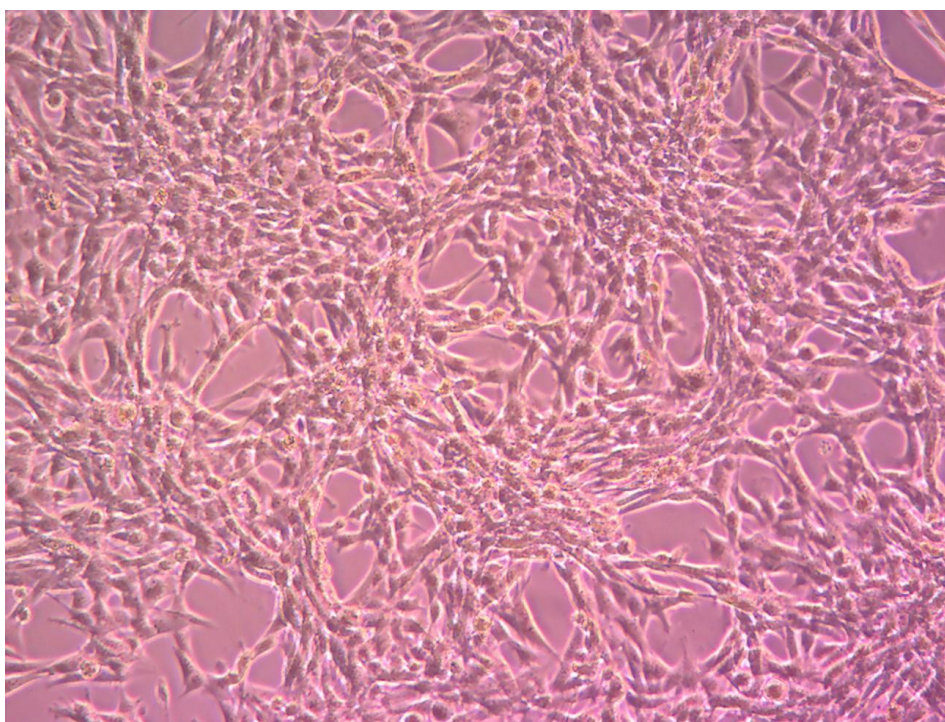


Figura 5 - Células RM1 em cultura (80 % de confluência) 100x

### Estudo *in vivo*

Relativamente ao estudo *in vivo*, inicialmente avaliou-se o efeito da dieta no peso dos ratinhos, bem como a percentagem de gordura (avaliada pela gordura epididimária por 100g de massa corporal) que cada um dos ratinhos continha.

Procedeu-se também à avaliação do peso do tumor, formado pela inoculação das células, de modo a verificar se a obesidade teria algum efeito no desenvolvimento tumoral. E por fim, avaliar o efeito da obesidade na linfoangiogénese dos tumores formados.

No que diz respeito ao peso dos ratinhos verificou-se que os ratinhos ob/ob e db/db apresentaram massas corporais estatisticamente superior quando comparados com os ratinhos controle ( $p < 0.001$ ) (Gráfico 1).

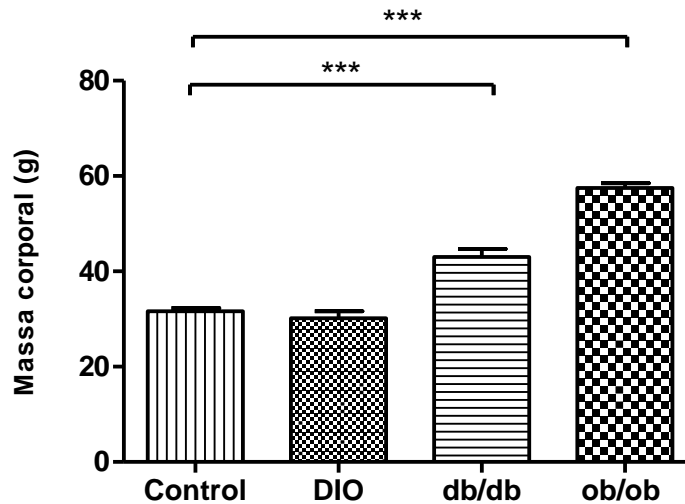


Gráfico 1 – Comparação da massa corporal dos ratinhos 14 dias, após a inoculação, nos diferentes grupos (ANOVA-  $p < 0.001$ : control vs db/db e control vs ob/ob)

Como marcador do conteúdo de massa gorda, foi utilizada a massa de gordura epididimária por 100g de massa corporal. Para este marcador, verificaram-se que os ratinhos ob/ob, db/db apresentavam uma % de gordura epididimária estatisticamente superior quando comparados com o grupo controle ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ , respectivamente) (Gráfico 2).

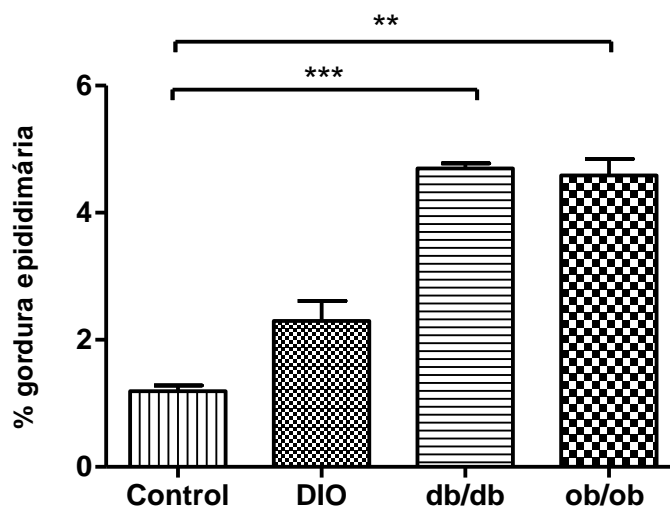


Gráfico 2 – Comparação da percentagem de gordura epididimária nos diferentes grupos de ratinhos (ANOVA -  $p < 0.01$ : control vs db/db;  $p < 0.001$ : control vs ob/ob).

Após a inoculação dos ratinhos com as células de carcinoma de próstata RM1, os ratinhos obesos ob/ob e DIO desenvolveram tumores estatisticamente maiores ( $p < 0.001$ ) quando comparados com os controle, enquanto que os ratinhos db/db desenvolveram tumores estatisticamente menores ( $p < 0.05$ ) (gráfico 3).

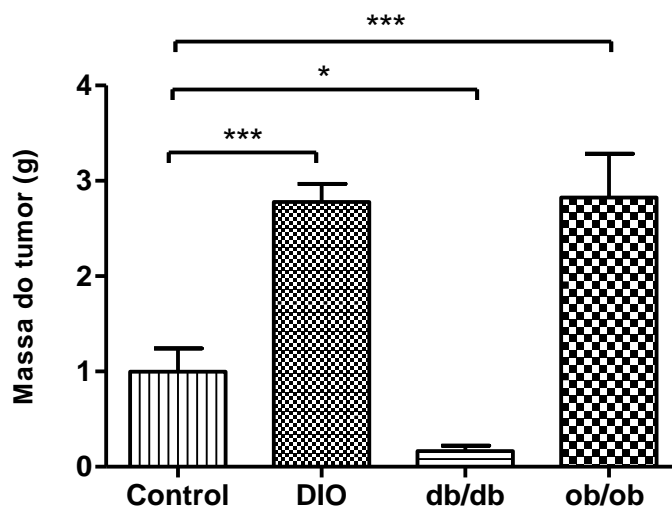


Gráfico 3 - Massa dos tumores obtidos 14 dias após a inoculação nos diferentes grupos de ratinhos (ANOVA -  $p < 0.05$ : control vs db/db;  $p < 0.001$ : control vs DIO e control vs ob/ob) .

Para se verificar se havia alguma correlação entre a obesidade e a massa tumoral, corremos a alguns testes de correlação, no entanto, não se verificaram correlações significativas nem entre massa tumoral e massa corporal dos ratinhos, nem entre a massa tumoral e a % de gordura epididimária (tabela 2).

### **Estudo *in vitro***

O marcador molecular Lyve-1 foi utilizado para marcação e posterior quantificação dos vasos linfáticos presentes tumores da próstata induzidos em diferentes modelos de ratinhos (Figura 8).

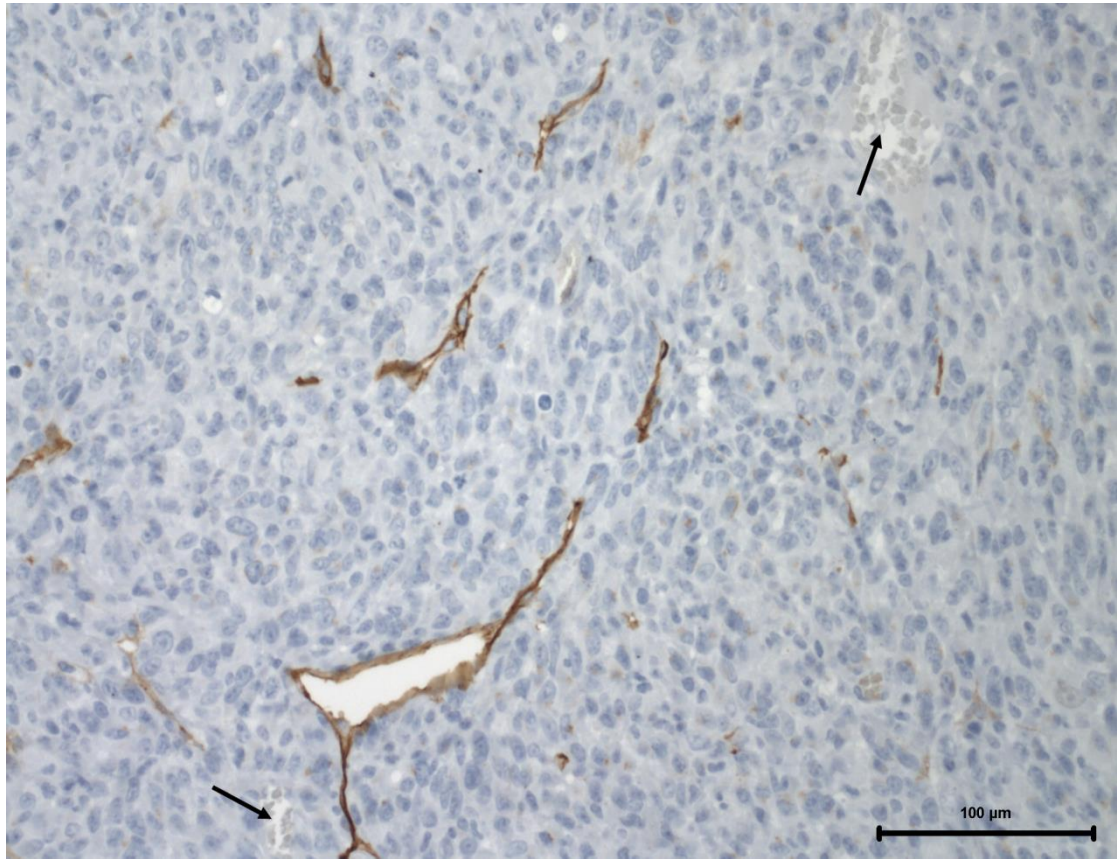


Figura 6 – Adenocarcinoma da prostata RM1 com os vasos linfáticos marcados por imunohistoquímica usando o anticorpo anti- Lyve-1. Na imagem, vasos sanguíneos podem ser visualizados como indicado pelas setas negras em contraste com os vasos linfáticos marcados com o DAB (200x).

Os vasos linfáticos com imunorreatividade para o Lyve-1 foram avaliados usando a percentagem de área marcada com Lyve-1 e a contagem direta do número de vasos linfáticos no tumor.

Os tumores dos ratinhos db/db e ob/ob foram os que tiveram menor densidade de vasos linfáticos, sendo que, a percentagem de área marcada e o número de vasos linfáticos marcados com o anticorpo Lyve-1 foram estatisticamente inferiores nos ratinhos db/db quando comparados com os ratinhos DIO (Gráficos 4 e 5).

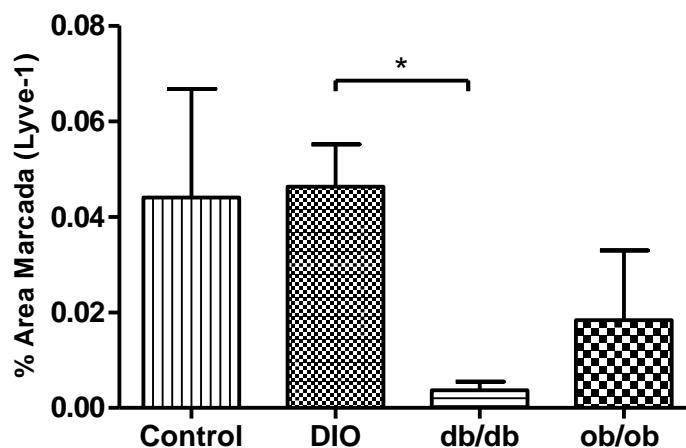


Gráfico 4 - Percentagem de área marcada de Lyve-1 nos tumores RM1 induzidos nos diferentes grupos de ratinhos (ANOVA:  $p < 0.05$ : DIO vs db/db).

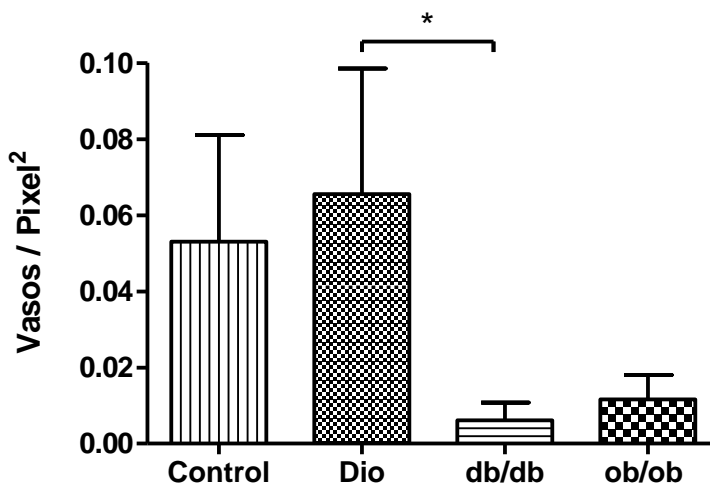


Gráfico 5 – Número de vasos linfáticos por pixel ao quadrado nos tumores RM1 induzidos nos diferentes grupos de ratinhos (ANOVA:  $p < 0.05$ : DIO vs db/db).

Apesar do grupo com tumores menores (ratinhos db/db) é o que também apresenta menor vasos linfáticos (gráficos 3, 4 e 5), não se verificou uma correlação significativa entre estes dois parâmetros (coeficientes de correlação=0.344) (tabela 2)

Para se verificar se havia alguma correlação entre a obesidade e a linfoangiogénese, corremos a alguns testes de correlação (tabela 2). Através do teste de correlação entre a percentagem de área marcada e a percentagem da gordura epididimária, nós verificamos que existe uma correlação negativa significativa entre estes parâmetros (coeficiente de correlação=-0.615) (Tabela 2). A mesma correlação

foi verificada entre a percentagem de área marcada e a massa corporal dos ratinhos (coeficiente de correlação= -0.618) (Tabela 2).

**Tabela 2 - Resultados dos estudos de correlação realizados (teste de Spearman)**

<b>Correlação</b>	<b>Coefficiente de correlação</b>	<b>p</b>
<b>Massa corporal rato e peso do tumor</b>	-0.058	NS
<b>% gordura epididimária e peso do tumor</b>	-0.159	NS
<b>Expressão do Lyve-1 e peso do tumor</b>	0.334	NS
<b>Expressão do Lyve-1 e % da gordura epididimária</b>	-0.615	p<0.01
<b>Expressão do Lyve-1 e massa corporal do rato</b>	-0.618	p<0.01

NS: estatisticamente não significativo

## DISCUSSÃO

A obesidade foi documentada como sendo um fator de risco para o cancro em vários estudos epidemiológicos, no entanto a obesidade por si só não parece aumentar o risco em todos os tecidos de igual modo (De Pergola and Silvestris, 2013). No cancro da próstata, esta associação é ainda muito controversa; alguns estudos demonstraram que a obesidade é um fator de risco e outros demonstraram que a obesidade poderá ter um efeito protetor neste tipo de tumores (Allott et al., 2013, De Pergola and Silvestris, 2013, Ribeiro et al., 2010, Porter and Stanford, 2005).

Estudos *in vivo* e *in vitro*, usando a mesma linha celular usada neste estudo, demonstraram o efeito protetor da obesidade na proliferação e angiogénese do cancro da próstata (Ribeiro et al., 2010, Ribeiro et al., 2012a), no entanto, a linfoangiogénese não foi ainda avaliada. Uma vez que, este processo é muito importante no desenvolvimento tumoral (Albrecht and Christofori, 2011, Christiansen and Detmar, 2011), estabeleceu-se como objetivo avaliar a linfoangiogénese em tumores da próstata induzidos em ratinhos normais e obesos permitindo deste modo entender a influência da obesidade na progressão do cancro da próstata.

Para isso, estudou-se três estirpes de ratinhos obesos (ob/ob; db/db e DIO) e uma estirpe normoponderal para a indução de tumores.

A linha celular de carcinoma da próstata murina escolhida para este estudo (RM1) é androgénio independente, de modo a minimizar a potencial interferência dos esteróides sexuais, uma vez que os adipócitos participam no metabolismo dos androgénios que constituem outro dos mecanismos que tem sido relatado como associado à progressão do cancro da próstata. A linha celular androgénio independente foi também escolhida, por ser o tipo de tumor da próstata no qual o possível efeito da obesidade é mais contraditório. Enquanto alguns autores defendem que o efeito da obesidade na progressão tumoral é maior nas células androgénios independentes (Ribeiro et al., 2012b), outros afirmam que o efeito da mesma na progressão tumoral não é tão significativo nestes tumores prevalecendo outros mecanismos que promovem a proliferação celular, como o uso de vias alternativas para desencadear a proliferação (Nieman et al., 2013).

Os diferentes ratinhos foram inoculados com essas mesmas células tumorais de carcinoma da próstata androgénio independentes (RM1) e ao fim de 14 dias os ratinhos foram sacrificados, pesados; a gordura epididimária foi retirada e pesada; e os tumores foram pesados e processados para histologia.

Quanto à massa corporal dos ratinhos e à % de gordura epididimária, tal como era esperado, os ratinhos das estirpes db/db e ob/ob apresentaram uma massa corporal estatisticamente superior aos ratinhos controle. No entanto, o mesmo não se verificou com o grupo DIO, que apesar de ter sido submetido a uma dieta hipercalórica durante 16 semanas, esta não foi capaz de induzir efeitos significativos tanto na massa corporal como na gordura epididimária, apesar desta última estar aumentada neste grupo. Talvez devido ao tempo ao qual os ratinhos estiveram sujeitos à dieta hipercalórica não ter sido suficiente para provocar as alterações metabólicas que ocorrem nos modelos com deficiências congénitas ou a própria da dieta não ser suficientemente calórica, uma vez que esta apresentava apenas um teor lipídico elevado, não tendo influência nos teores de açúcares.

Quanto à massa dos tumores, esta foi significativamente inferior no grupo dos ratinhos db/db quando comparados com o grupo controle, e os grupos ob/ob e DIO tiveram tumores estatisticamente maiores quando comparados com o grupo controle.

Através das correlações entre a massa corporal dos ratinhos e o peso do tumor, bem como da % de gordura epididimária e o peso do tumor, não se ficaram diferenças significativas. Estes resultados parecem demonstrar que estes dois parâmetros não parecem ter influência num aumento do crescimento tumoral.

No entanto, o grupo com deficiência no gene da leptina (ob/ob) e portanto sem leptina teve tumores muito superiores ao grupo com deficiência no gene do recetor de leptina (db/db), a leptina parece ter um efeito protetor quanto ao crescimento tumoral. Este facto vai contra ao que está descrito em outros estudos que verificaram que a leptina parece estar envolvida no desenvolvimento de tumores mais volumosos (Chang et al., 2001). No entanto, estudos *in vitro* realizados com as células RM1 verificaram que a leptina parece ter um papel protetor quanto à proliferação celular (Ribeiro et al., 2012a), corroborando os resultados obtidos neste estudo.

Uma vez que a vasculatura linfática é formada por células endoteliais linfáticas (LEC), a identificação de proteínas expressas neste tipo de células tem sido um tópico

de estudo importante permitindo progredir no conhecimento da linfoangiogénese em condições patológicas (Albrecht and Christofori, 2011, Baluk and McDonald, 2008, Marcelo et al., 2013).

O Lyve-1 é um dos marcadores mais bem caracterizados das LEC, por ser expresso tanto na superfície luminal como abluminal deste tipo de células durante a linfoangiogénese (Baluk and McDonald, 2008, Jackson et al., 2001), por isso realizou-se o estudo da linfoangiogénese por imunohistoquímica com o anticorpo anti- Lyve-1.

Depois disso, a avaliação da marcação foi expressa tanto em percentagem de área marcada pelo anticorpo anti- Lyve-1, como pelo número de vasos marcados por pixel ao quadrado em todos os tumores RM1. Um método de quantificação automático, o software ImageJ, foi realizado para se evitar a possível subjetividade associada ao observador na contagem manual dos vasos linfáticos.

Quando foram comparados todos os tumores RM1, verificaram-se diferentes expressões do marcador Lyve1 nos diferentes grupos de ratinhos, sendo que a expressão deste marcador estava significativamente diminuída no grupo db/db comparando com o grupo DIO. Os resultados entre o método automático como manual foram semelhantes, dando a certeza necessária para reportar diferentes expressões do Lyve-1 nos diferentes modelos de obesidade estudados neste trabalho.

O grupo dos ratinhos db/db foi o grupo que demonstrou menos linfoangiogénese e também os tumores com menor massa, no entanto não se verificou uma correlação significativa entre estes parâmetros.

Durante o crescimento de tumores sólidos, existe uma enorme estimulação do ambiente para que o estroma e as células inflamatórias expressem fatores de crescimento que induzam a formação de novos vasos linfáticos nos tumores, devido à hipoxia tumoral (Vaupel, 2004). No entanto, neste estudo não se verificou uma correlação significativa entre a massa do tumor e a linfoangiogénese, talvez porque os tumores não tenham tamanho significativamente diferente que possa refletir numa diferença no número de vasos linfáticos ou existe um efeito protetor em alguns tipos de ratinhos obesos que inibam a linfoangiogénese, diluindo assim o efeito do tamanho do tumor na formação de novos vasos linfáticos.

Através dos testes de correlação verificamos que a linfoangiogénese esta negativamente correlacionada com a percentagem de gordura epididimária e com o

massa corporal dos ratinhos, dois parâmetros que estão relacionados com a obesidade.

No entanto, a leptina parece não estar envolvida no processo da linfoangiogénese uma vez que o grupo com deficiência no gene da leptina (ob/ob) e portanto sem leptina, e o grupo com deficiência no gene do recetor de leptina (db/db) e portanto hiperleptinémicos têm linfoangiogénese semelhantes.

A obesidade está também associada à hipoxia uma vez que nesta condição existe uma expansão de massa que promove a progressão de cascatas linfoangiogénicas e angiogénicas (Trayhurn, 2013). Além disso, estudos anteriores documentaram o aumento de doença metastática em pacientes obesos com cancro (Silha et al., 2005), neste estudo, verificaram-se evidências diferentes. Este estudo demonstra que a linfoangiogénese é modulada de diferentes maneiras em diferentes grupos de ratinhos por fatores envolvidos na obesidade, sendo que a obesidade parece ter um fator protetor, evitando a linfoangiogénese. Estes resultados reforçam o papel protetor da obesidade na disseminação do cancro da próstata, já observado em vários estudos epidemiológicos (Porter and Stanford, 2005, Wilson et al., 2012).

## **CONCLUSÃO**

Em conclusão, a obesidade parece ter um papel protetor contra a progressão tumoral do cancro da próstata inibindo a linfoangiogénese, no entanto, por mecanismos que não parecem envolver a leptina. Esta hormona parece sim ter influencia apenas no aumento do crescimento tumoral. A relação entre a obesidade e a linfoangiogénese merece ser alvo de investigação futura para melhor perceber a progressão tumoral.

## BIBLIOGRAFIA

- ALBRECHT, I. & CHRISTOFORI, G. 2011. Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in development and cancer. *Int J Dev Biol*, 55, 483-94.
- ALLOTT, E. H., MASKO, E. M. & FREEDLAND, S. J. 2013. Obesity and prostate cancer: weighing the evidence. *Eur Urol*, 63, 800-9.
- AMLING, C. L., RIFFENBURGH, R. H., SUN, L., MOUL, J. W., LANCE, R. S., KUSUDA, L., SEXTON, W. J., SODERDAHL, D. W., DONAHUE, T. F., FOLEY, J. P., CHUNG, A. K. & MCLEOD, D. G. 2004. Pathologic variables and recurrence rates as related to obesity and race in men with prostate cancer undergoing radical prostatectomy. *J Clin Oncol*, 22, 439-45.
- AZEVEDO, A., CUNHA, V., TEIXEIRA, A. L. & MEDEIROS, R. 2011. IL-6/IL-6R as a potential key signaling pathway in prostate cancer development. *World J Clin Oncol*, 2, 384-96.
- BALEY, P. A., YOSHIDA, K., QIAN, W., SEHGAL, I. & THOMPSON, T. C. 1995. Progression to androgen insensitivity in a novel in vitro mouse model for prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 52, 403-13.
- BALUK, P. & MCDONALD, D. M. 2008. Markers for microscopic imaging of lymphangiogenesis and angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 1131, 1-12.
- CENTER, M. M., JEMAL, A., LORTET-TIEULENT, J., WARD, E., FERLAY, J., BRAWLEY, O. & BRAY, F. 2012. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur Urol*, 61, 1079-92.
- CHANG, S., HURSTING, S. D., CONTOIS, J. H., STROM, S. S., YAMAMURA, Y., BABAIAN, R. J., TRONCOSO, P., SCARDINO, P. S., WHEELER, T. M., AMOS, C. I. & SPITZ, M. R. 2001. Leptin and prostate cancer. *Prostate*, 46, 62-7.
- CHEUNG, W. W. & MAO, P. 2012. Recent advances in obesity: genetics and beyond. *ISRN Endocrinol*, 2012, 536905.
- CHRISTIANSEN, A. & DETMAR, M. 2011. Lymphangiogenesis and cancer. *Genes Cancer*, 2, 1146-58.
- COWEY, S. & HARDY, R. W. 2006. The metabolic syndrome: A high-risk state for cancer? *Am J Pathol*, 169, 1505-22.
- DE PERGOLA, G. & SILVESTRIS, F. 2013. Obesity as a Major Risk Factor for Cancer. *J Obes*, 2013, 291546.
- DISCACCIATI, A., ORSINI, N. & WOLK, A. 2012. Body mass index and incidence of localized and advanced prostate cancer--a dose-response meta-analysis of prospective studies. *Ann Oncol*, 23, 1665-71.
- DONOHUE, C. L., DOYLE, S. L. & REYNOLDS, J. V. 2011. Visceral adiposity, insulin resistance and cancer risk. *Diabetol Metab Syndr*, 3, 12.
- DUONG, T., KOOPMAN, P. & FRANCOIS, M. 2012. Tumor lymphangiogenesis as a potential therapeutic target. *J Oncol*, 2012, 204946.
- FORTE, V., PANDEY, A., ABDELMESSIH, R., FORTE, G., WHALEY-CONNELL, A., SOWERS, J. R. & MCFARLANE, S. I. 2012. Obesity, Diabetes, the Cardiorenal Syndrome, and Risk for Cancer. *Cardiorenal Med*, 2, 143-162.
- FOWKE, J. H., MOTLEY, S. S., CONCEPCION, R. S., PENSON, D. F. & BAROCAS, D. A. 2012. Obesity, body composition, and prostate cancer. *BMC Cancer*, 12, 23.
- FREEDLAND, S. J., ARONSON, W. J., KANE, C. J., PRESTI, J. C., JR., AMLING, C. L., ELASHOFF, D. & TERRIS, M. K. 2004. Impact of obesity on biochemical control after radical prostatectomy for clinically localized prostate cancer: a report by the Shared Equal Access Regional Cancer Hospital database study group. *J Clin Oncol*, 22, 446-53.
- HODA, M. R., THEIL, G., MOHAMMED, N., FISCHER, K. & FORNARA, P. 2012. The adipocyte-derived hormone leptin has proliferative actions on androgen-resistant prostate

- cancer cells linking obesity to advanced stages of prostate cancer. *J Oncol*, 2012, 280386.
- HORI, T., KOSHINO, T., TAKAGI, T., MACHIDA, J., HIRUMA, T., UESUGI, M. & SAITO, T. 2002. Development of Dunn osteosarcoma inoculated into subcutaneous air pouch in mice. *J Exp Clin Cancer Res*, 21, 415-20.
- HSING, A. W. & CHOKKALINGAM, A. P. 2006. Prostate cancer epidemiology. *Front Biosci*, 11, 1388-413.
- JACKSON, D. G., PREVO, R., CLASPER, S. & BANERJI, S. 2001. LYVE-1, the lymphatic system and tumor lymphangiogenesis. *Trends Immunol*, 22, 317-21.
- KHANDEKAR, M. J., COHEN, P. & SPIEGELMAN, B. M. 2011. Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nat Rev Cancer*, 11, 886-95.
- KOOCHAKPOUR, S. 2011. Genetic and epigenetic changes in human prostate cancer. *Iran Red Crescent Med J*, 13, 80-98.
- LEITZMANN, M. F. & ROHRMANN, S. 2012. Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. *Clin Epidemiol*, 4, 1-11.
- LEZE, E., ALVES-PEREIRA, J. L., COLLI, S., CAVALCANTE, F. S., JOSE SAMPAIO, F. & DA FONTE RAMOS, C. 2012. Leptin regulates proliferation and apoptosis in human prostate. *ScientificWorldJournal*, 2012, 842301.
- MARCELO, K. L., GOLDIE, L. C. & HIRSCHI, K. K. 2013. Regulation of endothelial cell differentiation and specification. *Circ Res*, 112, 1272-87.
- NIEMAN, K. M., ROMERO, I. L., VAN HOUTEN, B. & LENGYEL, E. 2013. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *Biochim Biophys Acta*.
- PARK, J., EUHUS, D. M. & SCHERER, P. E. 2011. Paracrine and endocrine effects of adipose tissue on cancer development and progression. *Endocr Rev*, 32, 550-70.
- PAZ-FILHO, G., LIM, E. L., WONG, M. L. & LICINIO, J. 2011. Associations between adipokines and obesity-related cancer. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 16, 1634-50.
- PHILLIPS, C. M. 2013. Metabolically healthy obesity: definitions, determinants and clinical implications. *Rev Endocr Metab Disord*, 14, 219-27.
- POP, P. D. O. P.-. 2013. Os números do cancro da próstata em Portugal [Online]. Available: <http://www.pop.eu.com/portal/publico-geral/tipos-de-cancro/cancro-da-prostata.html#numeros>.
- PORTER, M. P. & STANFORD, J. L. 2005. Obesity and the risk of prostate cancer. *Prostate*, 62, 316-21.
- PRIETO-HONTORIA, P. L., PEREZ-MATUTE, P., FERNANDEZ-GALILEA, M., BUSTOS, M., MARTINEZ, J. A. & MORENO-ALIAGA, M. J. 2011. Role of obesity-associated dysfunctional adipose tissue in cancer: a molecular nutrition approach. *Biochim Biophys Acta*, 1807, 664-78.
- RIBEIRO, A. M., ANDRADE, S., PINHO, F., MONTEIRO, J. D., COSTA, M., LOPES, C., AGUAS, A. P. & MONTEIRO, M. P. 2010. Prostate cancer cell proliferation and angiogenesis in different obese mice models. *Int J Exp Pathol*, 91, 374-86.
- RIBEIRO, A. M., PEREIRA, S., ANDRADE, S., COSTA, M., LOPES, C., AGUAS, A. P. & MONTEIRO, M. P. 2012a. Insulin prevents leptin inhibition of RM1 prostate cancer cell growth. *Pathol Oncol Res*, 18, 499-507.
- RIBEIRO, R., MONTEIRO, C., CUNHA, V., OLIVEIRA, M. J., FREITAS, M., FRAGA, A., PRINCIPE, P., LOBATO, C., LOBO, F., MORAIS, A., SILVA, V., SANCHES-MAGALHAES, J., OLIVEIRA, J., PINA, F., MOTA-PINTO, A., LOPES, C. & MEDEIROS, R. 2012b. Human periprostatic adipose tissue promotes prostate cancer aggressiveness in vitro. *J Exp Clin Cancer Res*, 31, 32.
- SCHULTE-MERKER, S., SABINE, A. & PETROVA, T. V. 2011. Lymphatic vascular morphogenesis in development, physiology, and disease. *J Cell Biol*, 193, 607-18.
- SILHA, J. V., KRSEK, M., SUCHARDA, P. & MURPHY, L. J. 2005. Angiogenic factors are elevated in overweight and obese individuals. *Int J Obes (Lond)*, 29, 1308-14.

- SPEO 2013. <http://www.speo-obesidade.pt/CDA/HPhomepage.aspx>.
- TRAYHURN, P. 2013. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiol Rev*, 93, 1-21.
- VAN KRUIJSDIJK, R. C., VAN DER WALL, E. & VISSEREN, F. L. 2009. Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18, 2569-78.
- VAUPEL, P. 2004. The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *Oncologist*, 9 Suppl 5, 10-7.
- WADA, H., URA, S., KITAOKA, S., SATOH-ASAHARA, N., HORIE, T., ONO, K., TAKAYA, T., TAKANABE-MORI, R., AKAO, M., ABE, M., MORIMOTO, T., MURAYAMA, T., YOKODE, M., FUJITA, M., SHIMATSU, A. & HASEGAWA, K. 2011. Distinct characteristics of circulating vascular endothelial growth factor-a and C levels in human subjects. *PLoS One*, 6, e29351.
- WILSON, K. M., GIOVANNUCCI, E. L. & MUCCI, L. A. 2012. Lifestyle and dietary factors in the prevention of lethal prostate cancer. *Asian J Androl*, 14, 365-74.