

# Impacto da expressão da leptina no tecido tumoral mamário

## *Leptin expression impact on breast tumor tissue*

Jana Grenteski<sup>1</sup>, Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro<sup>2</sup>, Cícero de Andrade Urban<sup>1</sup>

### Descritores

Câncer de mama  
Obesidade  
Leptina  
Expressão gênica

### Keywords

Breast cancer  
Obesity  
Leptin  
Gene expression

### RESUMO

**Objetivo:** Avaliar a expressão transcricional do gene LEP que codifica a leptina, na tentativa de elucidar o mecanismo de aumento da expressão plasmática descrito na literatura. **Métodos:** Foram utilizadas 26 amostras de tecido mamário, das quais 13 são tumorais e 13 não tumorais (provenientes da mama contralateral ao câncer), e foram realizadas análises da expressão gênica por meio da reação em cadeia de polimerase em tempo real. **Resultados:** A análise mostrou uma expressão 8,67 vezes superior no tecido não tumoral, não demonstrando correspondência com os dados da literatura. Os dados gerados foram analisados em relação ao receptor hormonal, ao tipo e tamanho tumoral e à idade das pacientes (pré- e pós-menopausa), as quais, neste último, tiveram uma tendência à maior expressão de leptina no tecido tumoral. **Conclusão:** Uma ampliação da amostra e dos dados de correlação, como a presença ou ausência de obesidade, é necessária para melhores conclusões, mas os dados iniciais sugerem que possa existir uma forte regulação pós-transcricional no tecido não tumoral.

### ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the transcriptional expression of the LEP gene that encodes leptin in an attempt to elucidate the increased plasma expression mechanism described in literature. **Methods:** Twenty-six samples of mammary tissue were used, in which 13 are tumoral and 13 are non-tumoral samples from the contralateral breast during cancer. Gene expression analyses were performed by real-time polymerase chain reaction. **Results:** The analysis showed an 8.67 higher expression in non-tumoral tissue, therefore it did not demonstrate a correspondence with literature data. The generated data were further analyzed for hormone receptor, tumor type and size, and age of patients (before and after menopause), and the latter demonstrated a trend to higher leptin expression in the tumoral tissue. **Conclusion:** A larger sample and correlation data, like the presence or absence of obesity, is needed for better conclusions, but these initial data suggest that there may be a strong post-transcriptional regulation in non-tumoral tissue.

Trabalho realizado no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Curitiba (PR), Brasil.

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Positivo – Curitiba (PR), Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR) – Curitiba (PR), Brasil. Endereço para correspondência: Jana Grenteski – Rua Martin Afonso, 2.694, apto. 71 – Bigorilho – CEP: 80730-030 – Curitiba (PR), Brasil – E-mail: janagrenteski@gmail.com.br

Conflito de interesses: nada a declarar.

Recebido em: 29/02/2016. Aceito em: 08/09/2016

## Introdução

O câncer de mama é considerado o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o primeiro entre as mulheres. Sua incidência mundial vem crescendo consistentemente, passando de 572.000 novos casos, em 1980, para 14,1 milhões, em 2012, e são estimados 21,4 milhões para 2030<sup>1,2</sup>.

O prognóstico dos cânceres de mama é geralmente determinado por meio da análise dos fatores clínico-patológicos tradicionais, tais como tamanho, grau e expressão dos receptores das superfícies celulares, e podem ser classificados como luminais A e B, triplo-negativos, com superexpressão do receptor de estrógenos (HER2) e basais<sup>3</sup>. Embora a mamografia seja uma ferramenta de rastreamento utilizada amplamente e que apresenta bons resultados, cerca de 20% dos casos de cânceres de mama não pode ser detectado por tal método, portanto novos biomarcadores são necessários para o diagnóstico<sup>4</sup>.

Características como proliferação celular, inibição da apoptose e aquisição da capacidade invasiva estão associadas ao desenvolvimento e à progressão do tumor. Esses processos implicam em alterações morfológicas que podem ocorrer na membrana da célula. Sabe-se que alterações físicas e funcionais na membrana das células, entre as proteínas e os fosfolípidios, afetam a sobrevivência, a adesão e, conseqüentemente, a migração e a invasão celular<sup>5</sup>.

A Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC) declarou que o risco dos cânceres de endométrio, mama (em mulheres na pós-menopausa), cólon, esôfago e rins aumenta com o excesso de peso corporal<sup>6</sup>. Os mecanismos que ligam a obesidade e o desenvolvimento de câncer incluem resistência à insulina, hiperinsulinemia crônica, hormônios, inflamação e secreção de adipocinas pelo tecido adiposo<sup>7</sup>. Sabe-se que a obesidade aumenta o desenvolvimento de tecido adiposo no corpo, e essa quantidade de gordura corporal pode ser uma fonte significativa de centenas de moléculas biologicamente ativas. Atualmente, o tecido adiposo não é mais considerado simplesmente uma reserva de energia, é um órgão com uma multiplicidade de funções e está envolvido em processos relacionados com o metabolismo energético, a função neuroendócrina e a secreção de peptídeos, conhecidos como adipocitocinas, incluindo citocina, quimiocina, leptina, adiponectina, fator de necrose tumoral, entre outros<sup>8,9</sup>.

A leptina é uma das adipocitocinas secretadas pelo tecido adiposo branco, e seus níveis séricos elevados são observados tanto em modelos animais de ratos obesos, como em indivíduos obesos. Essa adipocitocina tem a capacidade de promover o crescimento, a migração, a invasão e a angiogênese de células tumorais<sup>10</sup>. Especificamente no câncer de mama, a leptina aumenta a invasão e migração de células tumorais por meio de *crosstalk* com o fator-1 de crescimento semelhante à insulina<sup>11</sup>. Pesquisas *in vitro* incluindo células MCF10A com superexpressão HER2 demonstram que a leptina tem um papel crucial na indução da invasão de células da mama.

Apesar da literatura apontar alguns dados que mostram uma relação entre a leptina e a progressão do câncer de mama, há poucos dados disponíveis sobre o mecanismo molecular para uma maior expressão da leptina em células do câncer de mama e seu significado funcional em agressividade<sup>7,12-16</sup>. Porém, a maioria das publicações utiliza como parâmetro os níveis circulantes de leptina, e há pouca informação sobre a expressão gênica no nível de RNAm e sua regulação até a liberação de seu produto proteico<sup>12</sup>. Portanto, este trabalho teve por objetivo investigar os níveis de RNAm do gene LEP em portadoras de carcinomas primários de mama em relação ao tecido mamário não tumoral, procurando corroborar, ou não, tais dados da literatura em uma amostra de carcinomas coletadas em um único centro.

## Material e Métodos

Neste estudo experimental, para avaliar a expressão gênica do tecido tumoral mamário, foram utilizados cDNAs congelados, obtidos de tecidos retirados no momento da cirurgia dos tumores de mama, bem como da mama contralateral, coletados em estudos preliminares na linha de pesquisa de Citogenética e Genética Molecular do Câncer. As investigações foram realizadas pelo Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (LabCHO) do Departamento de Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em Curitiba, no Paraná. O referido material biológico foi coletado após aprovação pelo Comitê de Ética e assinatura de consentimento informado de pacientes adultos do sexo feminino, com diagnóstico de câncer de mama, escolhidos de forma aleatória. Este subprojeto faz parte de um amplo projeto de pesquisa que objetiva a análise genética em tumores mamários, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Nossa Senhora das Graças, Curitiba, Paraná (processo 25000.007020/2003-93; registro no CONEP:7220 e parecer número 251/2003 de 20 de fevereiro de 2003).

Foram selecionadas 26 amostras aleatórias, que foram distribuídas em: Grupo de Interesse – tecidos tumorais de pacientes com diagnóstico de câncer de mama (n=13) e Grupo Controle – tecidos não tumorais (mama contralateral) de pacientes com diagnóstico de câncer de mama (n=13). As pacientes foram, então, submetidas à cirurgia na mama contralateral ao câncer com objetivo reparador, ou seja, de simetrização com a mama tratada. A análise da expressão gênica foi realizada pela reação em cadeia de polimerase (PCR) em tempo real (RT-qPCR) após conversão do mRNA em cDNA pela retrotranscrição. A extração do RNA total foi realizada com o *kit* comercial Pure Link RNA Mini Kit (Ambion by Life Technologies), conforme instruções do fabricante. As concentrações e os parâmetros de contaminação e pureza de cada amostra foram mensurados pelo espectrofotômetro Nanodrop®2000 (Thermo Fischer Scientific Inc.), e a verificação da integridade da molécula de RNA a partir do equipamento 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). A partir dos RNAs extraídos, foram preparadas soluções de trabalho

contendo 30 ng/μL. As reações de retrotranscrição foram do tipo *two-step*, com o auxílio do *kit* comercial Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit (Roche). A quantidade de 300 ng de RNA foi usada como *template* inicial.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no equipamento ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) utilizando o sistema de detecção por sonda de hidrólise fluorescente TaqMan® FAM™-MGB, que contém as informações necessárias para a quantificação de cDNA. O *mix* comercial de PCR aplicado foi o TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), com atividade AmpErase® UNG, permitindo corrida de modo *standard*. A quantidade de *template* inicial foi de 30 ng de cDNA. Como calibrador, empregou-se um *pool* de amostras de tecido mamário não tumoral. A escolha dos ID TaqMan® Gene Expression Assays – *Assay on-demand* se deu por sua construção em regiões de junções de éxons (Tabela 1). A escolha dos controles endógenos β-actina (ACTB) e β-2-microglobulina (B2M), utilizados no presente estudo, ocorreu em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa por meio do teste de endógenos com cartão microfluídico TaqMan® Low Density Endogenous Control Panel (TLDA – TaqMan® Low Density 38 Array) (Applied Biosystems), que relacionou estes genes entre os mais estáveis no tecido em estudo. Desse modo, a normalização das reações foi dada por estes genes *housekeeping*. Os dados de expressão gênica foram obtidos com o software DataAssist® pelo Método do ΔΔCt (20), e foram realizados testes de normalidade entre os grupos amostrais, seguidos pelo teste *t* de Student. O nível de significância considerado foi de 5%. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software Prism 6, versão 6.05 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA).

## Resultados

Neste trabalho, foram analisadas 26 amostras de carcinomas mamários com o objetivo de verificar a expressão do gene LEP relativamente a amostras não tumorais coletadas da mama contralateral. Os dados de *Fold Change* (FC) foram obtidos sobre uma amostra calibradora representada por um *pool* de amostras de tecido mamário não tumoral. Como controle endógeno (normalizadores), foram utilizados os genes de referência ACTB e B2M.

**Tabela 1.** ID TaqMan® Gene Expression Assays – *Assay on-demand*.

Nome	Sigla	ID dos assays	Tamanho do amplicon (em pb)
Leptina	LEP	Hs00174877_m1	74
β-actina	ACTB	Hs01060665_g1	63
β-2- microglobulina	B2M	Hs00984230_m1	81

Informações de referência dos ensaios TaqMan®: sigla de referência no banco de dados, ID dos ensaios comerciais TaqMan® e tamanho do amplicon.

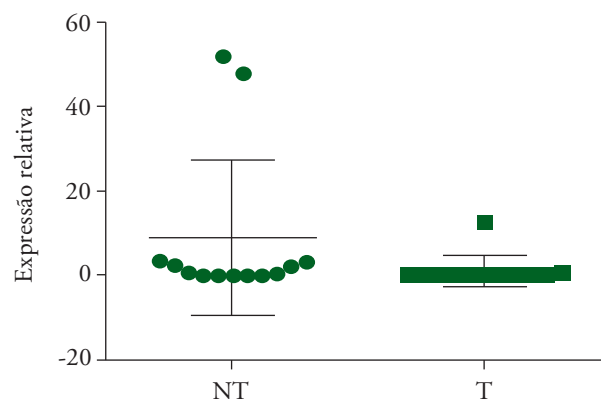
A expressão do gene em questão foi aproximadamente nove vezes maior no tecido não tumoral em relação ao tumoral de mama (Tabela 2 e Figura 1). A diferença de expressão não foi considerada estatisticamente significativa ( $p>0,10$ ), utilizando-se um nível de confiança de 95% de acordo com o teste *t* de Student. Os dados gerados foram ainda analisados quanto à idade das pacientes (pré- e pós-menopausa), em tecido tumoral, sendo que, nesse caso, a expressão do LEP foi de aproximadamente cinco vezes maior em amostras de pacientes pré-menopausa em relação àqueles pós-menopausa, mostrando uma tendência. Quando a mesma análise foi feita em tecido não tumoral, a expressão do LEP foi de aproximadamente 15 vezes maior em pós-menopausa em relação a pré-menopausa.

Outra análise realizada baseou-se no tipo tumoral, o qual foi dividido em ductal e lobular. Observou-se que tumores do tipo ductal apresentam a expressão do gene quase duas vezes maior em relação aos tumores do lobular. A análise dos dados relacionados ao tamanho tumoral, T1 e T2, demonstraram que a expressão do gene é aproximadamente três vezes maior em T2 em relação ao T1. Outras análises realizadas basearam-se na classificação molecular, quanto aos fatores hormonais. Notou-se que, tumores com receptor de estrogênio negativo apresentaram a expressão do gene aproximadamente três vezes maior em relação aos tumores com receptor de estrogênio positivo. Os últimos apresentaram a expressão do gene aproximadamente quatro vezes maior em relação aos tumores com receptor de progesterona positivo.

**Tabela 2.** Expressão relativa do gene LEP em tecido mamário.

Expressão relativa LEP	
Tumoral (n=13)	Não tumoral (n=13)
1,06±3,50	8,67±18,44
$p>0,10$	

Expressão relativa da leptina em tecido mamário, tumoral e não tumoral; valores referentes à média ΔΔCt; entre parênteses, estão os números de amostras para cada grupo; o valor *p* foi obtido pelo teste *t* de Student.



**Figura 1.** Gráfico de dispersão referente à expressão relativa do gene LEP em amostras tumorais (T) e não tumorais (NT).

Já os tumores com fator de crescimento epidermal 2 positivo e negativo apresentaram a expressão do gene muito semelhante. Em todos os casos, as diferenças de expressão não foram estatisticamente significativas (Tabela 3).

## Discussão

De acordo com a revisão da literatura realizada, este é o primeiro estudo que analisou os níveis de expressão da leptina em amostras tumorais do câncer de mama e naquelas contralaterais, usando a técnica de PCR quantitativa em tempo real.

O tecido adiposo é um componente do tecido mamário normal. Adipócitos representam mais de 90% do volume da mama humano e secretam adipocitocinas, incluindo a leptina<sup>13</sup>. Esses dados demonstram a importância dos efeitos biológicos da leptina sobre a formação de tecido mamário, portanto ela é necessária para o desenvolvimento da glândula mamária normal<sup>8</sup>. Como a leptina é um fator de regulação essencial do metabolismo, supõe-se que a mesma pode estar envolvida no desenvolvimento do câncer de mama. Os níveis circulantes de leptina, no entanto, não refletem necessariamente as suas concentrações dentro da glândula mamária<sup>17</sup>.

Vários estudos utilizando técnicas de imunistoquímica mostram que a leptina está superexpressa em células tumorais da mama e pouco expressa nas não tumorais<sup>8,13,17-24</sup>. A superexpressão de LEP ocorre em 92% dos carcinomas da mama, ao passo que LEP não é expressa, ou é expressa a baixos níveis em

tecidos não tumorais<sup>23</sup>. Dados obtidos por meio das técnicas de imunistoquímica indicaram que a leptina e suas isoformas são superexpressas em células de câncer da mama em comparação com o epitélio normal<sup>18</sup>. A expressão de leptina e o seu receptor foram correlacionados positivamente, sugerindo que a leptina atua nas células de tumor mamário por meio de uma via autócrina e está significativamente elevada em tecido tumoral mamário com metástase, quando comparado ao normal. No entanto, no mesmo estudo, não foram correlacionados os níveis de leptina com características clínicas e patológicas, tais como estado de menopausa e receptores hormonais<sup>24</sup>. Em outro estudo, o aumento da expressão de leptina foi associado com o mau prognóstico em pacientes cujos níveis séricos de leptina estavam aumentados<sup>25</sup>.

Estudos epidemiológicos sugerem que obesidade e alta quantidade de tecido adiposo aumentam substancialmente o risco do câncer de mama, e esses dois fatores também estão associados com fenótipos tumorais agressivos<sup>17,21,26,27</sup>. Após a menopausa, quando os ovários deixam de produzir estrogênio, o tecido adiposo é a principal fonte de estrogênio. Além disso, o tecido adiposo da mama pode ter ampliado ou modificado a sua composição em mulheres na pós-menopausa obesas, fornecendo, assim, quantidades mais elevadas de estrogênio, citocinas pró-inflamatórias e adipocitocinas, como a leptina. Portanto, acredita-se que a obesidade aumenta o risco do câncer de mama, tanto para o receptor de estrogênio positivo como para o negativo<sup>21</sup>. Harris et al. mostraram uma associação inversa entre a leptina e o câncer de mama, quando analisados os níveis séricos, para tumores com receptor de progesterona negativo, ao compará-los com os positivos; no entanto, esses resultados são baseados em um tamanho amostral pequeno<sup>28</sup>. Já para tumores com receptor de estrogênio, nenhuma diferença significativa foi observada, embora houve uma forte associação para tumores ER- quando comparados com os ER+. O significado biológico destes achados solicita uma investigação mais aprofundada<sup>13</sup>.

Os dados inconsistentes obtidos neste estudo, que envolve o risco do câncer de mama e a leptina circulante, podem ser, pelo menos em parte, explicados por diferenças na preparação de amostras e técnicas de medição, bem como pela falta de controle para potenciais fatores que influenciam as concentrações de leptina, como a ingestão de alimentos. Dentre as limitações deste estudo, destacam-se o pequeno tamanho amostral; a técnica utilizada, pois o RNAm expresso pode não ser traduzido em proteína no tecido tumoral, e o método de extração do material genético. Nessa extração, as amostras tumorais são dissecadas, separando o tecido das células de gorduras, para a amostra tumoral, as células gordurosas circundantes são facilmente visíveis e removidas, enquanto que, na amostra de tecido normal, isso não ocorre e mais adipócitos devem estar presentes no momento da obtenção de ácidos nucleicos. Sendo assim, as amostras do câncer de mama podem não traduzir os níveis corretos de RNAm presentes no tecido como um todo.

**Tabela 3.** Expressão relativa do gene LEP no tecido mamário.

Variáveis analisadas	LEP – expressão			Valor p
	Casos	Tumoral	Não tumoral	
Pré-menopausa	3	4,27±7,31	-	0,06
Pós-menopausa	10	0,09±0,21	-	
Pré-menopausa	5	-	1,56±1,39	0,25
Pós-menopausa	7	-	14,91±24,09	
Tipo tumoral				
Ductal	9	1,44±4,22	-	0,64
Lobular	3	0,25±0,36	-	
Tamanho tumoral				
T1	3	0,02±0,02	-	0,51
T2	6	2,15±5,17	-	
Receptor hormonal				
HER2+	3	0,008±0,01	-	0,40
HER2-	8	0,12±0,23	-	
RE+	8	0,12±0,22	-	0,24
RE-	5	2,54±5,68	-	
RP+	9	0,11±0,21	-	0,15
RP-	4	3,18±6,35	-	

Expressão relativa da leptina em tecido mamário, tumoral e não tumoral; valores referentes à média  $\Delta\Delta Ct$ , com desvio padrão; o valor p foi obtido por meio do teste *t* de Student; pré-menopausa <50 anos e pós-menopausa >50 anos; tamanho tumoral – T1: até 2 cm, T2: entre 2 e 5 cm.

Em conclusão, a hipótese de que níveis altos de leptina estão relacionados com o desenvolvimento do câncer de mama encontra suporte em vários estudos *in vitro*, os quais demonstram que a leptina induz a proliferação, sobrevivência e crescimento. Contudo, os dados obtidos neste estudo demonstram que mais análises complementares são necessárias para confirmar essa constatação em nível tecidual. Neste estudo, os dados não corroboram esta hipótese, já que não foi verificado um aumento da expressão no tecido tumoral quando comparado com o não tumoral.

## Agradecimentos

Ao grupo de pesquisa do LabCHO do Departamento de Genética da UFPR pela assistência técnica e científica no desenvolvimento deste trabalho.

## Referências

- Instituto Nacional de Câncer. Consenso Nacional de Nutrição Oncológica. Rio de Janeiro: Inca; 2009.
- Martins E, Freitas-Junior R, Curado MP, Freitas NM, De Oliveira JC, Silva CM. Temporal evolution of breast cancer stages in a population-based cancer registry in the Brazilian central region. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2009;31(5):219-23.
- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747-52.
- Qiu Y, Zhou E, Su M, Baxter S, Zheng X, Zhao X, et al. Mass spectrometry-based quantitative metabolomics revealed a distinct lipid profile in breast cancer patients. *Int J Mol Sci.* 2013;14(4):8047-61.
- Escribá PV, González-Ros JM, Goñi FM, Kinnunen PK, Vigh L, Sánchez-Magraner L, et al. Membranes: a meeting point for lipids, proteins and therapies. *J Cell Mol Med.* 2008;12(3):829-75.
- Tikk K, Sookthai D, Fortner RT, Johnson T, Rinaldi S, Romieu I, et al. Circulating prolactin and *in situ* breast cancer risk in the European EPIC cohort: a case-control study. *Breast Cancer Res.* 2015;17:49.
- García-Robles MJ, Segura-Ortega JE, Fafutis-Morris M. The biology of leptin and its implications in breast cancer: a general view. *J Interferon Cytokine Res.* 2013;33(12):717-27.
- Gonzalez-Perez RR, Lanier V, Newman G. Leptin's pro-angiogenic signature in breast cancer. *Cancers (Basel).* 2013;5(3):1140-62.
- Artwohl M, Roden M, Hölzenbein T, Freudenthaler A, Waldhäusl W, Baumgartner-Parzer SM. Modulation by leptin of proliferation and apoptosis in vascular endothelial cells. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002;26(4):577-80.
- Surmacz E. Obesity hormone leptin: a new target in breast cancer? *Breast Cancer Res.* 2007;9(1):301. Review.
- Saxena NK, Taliaferro-Smith L, Knight BB, Merlin D, Anania FA, O'Regan RM, et al. Bidirectional crosstalk between leptin and insulin-like growth factor-I signaling promotes invasion and migration of breast cancer cells via transactivation of epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* 2008;68(23):9712-22.
- Cha Y, Kang Y, Moon A. HER2 induces expression of leptin in human breast epithelial cells. *BMB Rep.* 2012;45(12):719-23.
- Guo S, Liu M, Wang G, Torroella-Kouri M, Gonzalez-Perez RR. Oncogenic role and therapeutic target of leptin signaling in breast cancer and cancer stem cells. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1825(2):207-22.
- Park J, Kusminski CM, Chua SC, Scherer PE. Leptin receptor signaling supports cancer metabolism through suppression of mitochondrial respiration *in vivo*. *Am J Pathol.* 2010;177(6):3133-44.
- Jeong YJ, Bong JG, Park SH, Choi JH, Oh HK. Expression of leptin, leptin receptor, adiponectin and adiponectin receptor in ductal carcinoma *in situ* invasive breast cancer. *J Breast Cancer.* 2011;14(2):96-103.
- Fusco R, Galgani M, Procaccini C, Franco R, Pirozzi G, Fucci L, et al. Cellular and molecular crosstalk between leptin receptor and estrogen receptor-alpha in breast cancer: molecular basis for a novel therapeutic setting. *Endocr Relat Cancer.* 2010;17(2):373-82.
- Andò S, Catalano S. The multifactorial role of leptin in driving the breast cancer microenvironment. *Nat Rev Endocrinol.* 2011;8(5):263-75.
- Ishikawa M, Kitayama J, Nagawa H. Enhanced expression of leptin and leptin receptor (OB-R) in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(13):4325-31.
- Gambino YP, Pérez Pérez A, Dueñas JL, Calvo JC, Sánchez-Margalet V, Varone CL. Regulation of leptin expression by 17beta-estradiol in human placental cells involves membrane associated estrogen receptor alpha. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1823(4):900-10.
- Surmacz E. Leptin and adiponectin: emerging therapeutic targets in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2013;18(3-4):321-32.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta C_t$  method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
- Jardé T, Caldefie-Chézet F, Damez M, Mishellany F, Perrone D, Penault-Llorca F, et al. Adiponectin and leptin expression in primary ductal breast cancer and in adjacent healthy epithelial and myoepithelial tissue. *Histopathology.* 2008;53(4):484-7.
- Garofalo C, Koda M, Cascio S, Sulkowska M, Kanczuga-Koda L, Golaszewska J, et al. Increased expression of leptin and the leptin receptor as a marker of breast cancer progression: possible role of obesity-related stimuli. *Clin Cancer Res.* 2006;12(5):1447-53.
- Karaduman M, Bilici A, Ozet A, Sengul A, Musabak U, Alomeroglu M. Tissue leptin levels in patients with breast cancer. *J BUON.* 2010;15(2):369-72.
- Miyoshi Y, Funahashi T, Tanaka S, Taguchi T, Tamaki Y, Shimomura I, et al. High expression of leptin receptor mRNA in breast cancer tissue predicts poor prognosis for patients with high, but not low, serum leptin levels. *Int J Cancer.* 2006;118(6):1414-9.
- Lahmann PH, Hoffmann K, Allen N, van Gils CH, Khaw KT, Tehard B, et al. Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC). *Int J Cancer.* 2004;111(5):762-71.
- Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet.* 2008;371(9612):569-78.
- Harris HR, Tworoger SS, Hankinson SE, Rosner BA, Michels KB. Plasma leptin levels and risk of breast cancer in premenopausal women. *Cancer Prev Res (Phila).* 2011;4(9):1449-56.