

**1Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**AVALIAÇÃO DOS RECEPTORES DE INSULINA E INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-
1 NO CARCINOMA DE ENDOMÉTRIO EM PACIENTES OBESAS E NÃO OBESAS –
UM ESTUDO DE CASO-CONTROLE**

AUTORA: LUCIANA SILVEIRA CAMPOS

ORIENTADORA: PROF. DRA. MARIA ISABEL EDELWEISS

CO-ORIENTADORA: PROF. DRA. MARIA CELESTE WENDER

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

2003

ÍNDICE

	Página
Lista de Abreviaturas	3
1. Introdução	7
2. Revisão Bibliográfica	9
2.1. Epidemiologia	9
2.2. Estrogênio e Progesterona	9
2.3. História Familiar	11
2.4. Tabagismo	11
2.5. Terapia de Reposição Hormonal	12
2.6. Tamoxifeno	13
2.7. Estrogênios Endógenos	15
2.8. Obesidade e Diabetes	16
2.9. Insulina e IGF-I	19
2.10. Imuno-histoquímica	28
2.10.1. Receptores de Estrogênio e Progesterona	29
2.10.2. Receptores de Insulina e IGF-I	29
3. Objetivos	31
4. Referências Bibliográficas	32
5. Artigo em Inglês	41
6. Versão do Artigo em Português	60
7. Anexos: Figuras e Tabelas	79

ABREVIATURAS

IGF-I: Insulin-like Growth Factor I

IGF-II: Insulin-like Growth Factor II

IGF-IR: Insulin-like Growth Factor I Receptor

IGFBPS: Insulin-like Growth Factor Binding Proteins

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

INCA: Instituto Nacional do Câncer

RR: Risco Relativo

IC: Intervalo de Confiança

OR: Odds Ratio

TRH: Terapia de Reposição Hormonal

WHI: Women's Health Initiative

FIGO: Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

SHBG: Globulina de ligação dos esteróides sexuais

IMC: índice de massa corporal

mRNA: RNA mensageiro

Agradecimentos

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pública e gratuita, pelo gosto que desenvolvi pela pesquisa.

Ao Programa de Pós Graduação em Clínica Médica na pessoa da Profa. Sandra Fuchs pela oportunidade.

Aos funcionários do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial à funcionária Flavia Giusti pela gentileza na parte experimental do trabalho.

Ao Prof Dr Sotero Serrate Mengue pelo auxílio na análise estatística dos dados.

À minha mãe, que acredita em mim desde o jardim de infância.

Ao meu marido André, cujo companheirismo e apoio foram absolutamente indispensáveis no decorrer desse período.

Certos agradecimentos são difíceis de fazer, pela complexidade. Agradeço à Profa. Dra. Maria Isabel Edelweiss, minha orientadora, e à Profa Dra. Maria Celeste Osório Wender, minha co-orientadora, pela excelente qualidade na orientação teórica e pelo apoio logístico durante o processo. Mais que isso, agradeço pela amizade desenvolvida, pelo excelente convívio e pela compreensão da minha dimensão humana.

Para André, pela intensidade.

Como dois e dois são quatro
sei que a vida vale a pena
embora o pão seja caro
e a liberdade pequena

Ferreira Gullar

Vida louca vida, vida breve
Já que eu não posso te levar
Quero que você me leve
Vida louca vida, vida imensa
Ninguém vai nos perdoar
Nosso crime não compensa

Lobão

1. INTRODUÇÃO:

Os tumores de corpo uterino ocupam a quarta posição entre todas as neoplasias diagnosticadas na mulher no Brasil, com uma incidência de 12,89 por 100.000 mulheres¹. Em 1999, os tumores de corpo uterino corresponderam a 2,28% dos óbitos por câncer em mulheres no Brasil, segundo o INCA (Instituto Nacional do Câncer)². Apesar da importância deste tumor e do seu impacto na saúde da população, não existe um exame de rastreio cujo benefício seja satisfatório³. A maioria das pacientes desenvolve o carcinoma de endométrio a partir dos 50 anos^{4,5,6,7} e a incidência varia amplamente ao redor do mundo¹, possivelmente em função das variações de peso corporal, uso de terapia de reposição hormonal, características reprodutivas e níveis de estrogênios endógenos circulantes⁸. A maioria dos carcinomas de endométrio é diagnosticada nos estádios iniciais, provavelmente em função do sangramento uterino anormal, fato que chama atenção para esta neoplasia, que tem prognóstico favorável⁹.

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), seus receptores e proteínas ligantes constituem uma família de moduladores que atuam no crescimento e desenvolvimento da célula e incluem três peptídeos relacionados: insulina, IGF-I e IGF-II¹⁰. Evidências sugerem que a insulina, o IGF-I e seus receptores, podem estar envolvidos na transformação maligna de várias linhagens celulares como: mamária^{11,12} trato gastrointestinal¹³, tumores renais¹⁴ e endometriais¹⁵. Tanto a hiperinsulinemia¹⁶ quanto altos níveis séricos de IGF-I¹⁷ podem estar associados às neoplasias hormônio-dependentes. Diversos estudos vêm documentando uma associação entre o receptor de IGF-I e a transformação tumoral¹⁸, havendo uma maior expressão do receptor em vários

tumores^{12,14,19,20}.

A compreensão dos fatores que ocorrem nos processos de oncogênese abriria espaço para a tentativa de controlar estes fatores com estratégias preventivas, detectá-los nas pacientes com lesões pré-malignas, determinar os grupos de maior e risco e, possivelmente, estabelecer protocolos de tratamento específicos para estas pacientes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Epidemiologia

Estudos epidemiológicos identificaram vários fatores de risco para adenocarcinoma de endométrio. Eles incluem idade^{4,6,8}, menarca precoce, infertilidade, nuliparidade, obesidade^{4,5,8}, disfunções ovarianas²¹, terapia de reposição hormonal estrogênica isolada^{4,7,8}, menopausa tardia^{4,6,8}, *diabete mellitus*^{5,6,8} e mais recentemente, uso de tamoxifeno²². Entre os fatores protetores descritos na literatura estão gestações a termo^{4,5}, contraceptivos orais^{8,23,24}, fumo^{8,24} e atividade física²⁵.

2.2. Estrogênio e progesterona

A maior parte dos fatores de risco e protetores podem ser explicados pela hipótese que postula sobre a exposição aos estrogênios endógenos e exógenos, sem antagonismo da progesterona ou de progestogênios sintéticos, aumentando a atividade mitótica das células endometriais, resultando em um aumento nos erros de replicação do DNA e mutações somáticas, levando a hiperplasia endometrial e neoplasia²⁶. Essa hipótese é consistente com as características epidemiológicas conhecidas da doença^{4,5,6,7}.

Existem evidências que associam os estrogênios a determinados tipos histológicos de carcinoma endometrial, tais como os carcinomas endometrióides, também denominados como carcinomas endometriais tipo I. Estes possivelmente se originam das

hiperplasias induzidas pela exposição excessiva aos estrogênios e possuem um prognóstico favorável^{8,27}. Os carcinomas endometriais tipo II são compostos pelos carcinomas serosos, que não parecem estar relacionados com a exposição estrogênica, provavelmente se desenvolvendo muito mais a partir do epitélio atrófico que do hiperplásico e têm um curso menos favorável²⁷. Estudo classificou 76 carcinomas endometriais a partir do tecido adjacente em atróficos (28 casos) e hiperplásicos (48 casos). As pacientes com neoplasias associadas à hiperplasia não fumavam e apresentavam menarca precoce, de maneira estatisticamente significativa, sugerindo uma relação destes tumores com exposição ao estrogênio²⁸.

As evidências moleculares apóiam a existência de um modelo dualístico de carcinogênese. Os carcinomas tipo I estão comumente associados a mutações no oncogene *ras*, no gene supressor de tumor PTEN (gene supressor tumoral produtor da proteína tensina) e instabilidades micro-satélites, enquanto que o carcinoma endometrial tipo 2 está associado a mutações no gene p53^{9,27}.

Um estudo pesquisou perda de heterozigocidade e instabilidade em sete seqüências de microssatélites descritas em outros tumores, na tentativa de detectar um marcador genético comum entre carcinomas e hiperplasias endometriais. A perda de heterozigocidade de pelo menos um marcador foi observada em 8/14 (57%) das hiperplasias e 16/29 (55%) dos carcinomas endometriais estudados (55%). Todas as hiperplasias exibiram pelo menos uma perda no braço curto do cromossomo 8. Dos 29 carcinomas da amostra, 25 eram endometrióides²⁹.

Outro estudo comparou os perfis de pacientes portadoras de carcinoma endometrial a partir da pesquisa de instabilidade microssatélite. Dos 229 carcinomas estudados, 70 eram positivos para os microssatélites pesquisados. No grupo positivo 93% das pacientes eram brancas e no grupo negativo 78%, sendo essa diferença estatisticamente significativa. As pacientes positivas para as instabilidades pesquisadas

apresentavam uma chance 2,73 vezes maior de estarem no estágio inicial da doença, em comparação com as pacientes negativas. Entretanto, não houve uma diferença estatisticamente significativa no percentual de carcinomas endometrióides e da sobrevida nos dois grupos³⁰.

2.3 História familiar

O carcinoma de endométrio participa do grupo de neoplasias associadas à doença de Lynch³¹ (carcinoma colo-retal hereditário não associado à polipose). Nas famílias afetadas as mulheres têm um risco 20 a 30% maior que o da população em geral de desenvolver os carcinomas de endométrio e estes são diagnosticados 15 anos antes daqueles da população em geral⁹. Entretanto, a maioria dos carcinomas de endométrio não está associado a esta síndrome^{5,9}.

2.4 Tabagismo

Há evidências de que o tabagismo seria um fator protetor para o carcinoma endometrial³². O tabagismo exerceria um efeito antiestrogênico, através da manutenção de peso das usuárias, por levar a uma menopausa mais precocemente ou ainda através de diferenças no metabolismo do estrogênio existentes entre fumantes e não fumantes³². Os autores concluíram que parece haver uma diminuição pequena nos riscos de carcinoma endometrial, principalmente na pós-menopausa e se o tabagismo for de grande intensidade ou de longa duração. Entretanto, a existência de poucos estudos de maior poder estatístico (três coortes) limitou a generalização desses dados³².

2.5. Terapia de reposição hormonal

Há uma vasta quantidade de literatura descrevendo a associação entre terapia de reposição hormonal (TRH) e o risco de carcinoma endometrial^{4,7,33}. O risco para o desenvolvimento do carcinoma endometrial após o uso de estrogênio isolado por um ano ou mais está associado a riscos relativos que variam de 1,5 a 10, dependendo do grupo controle^{4,7,8}.

Uma meta-análise avaliou em 30 estudos observacionais a associação entre uso de estrogênio sem oposição e ou estrogênio associado à progestogênio no risco de desenvolvimento ou morte por carcinoma endometrial. A estrogenerapia sem oposição mais do que dobra o risco relativo (RR=2,3) entre as usuárias comparadas com não usuárias, e o risco eleva-se com doses maiores e tempo de uso prolongado (uso por mais de 10 anos: RR= 9,5) . A maior elevação de risco foi para o câncer não invasor, mas o câncer invasor e o risco de morte por câncer endometrial também se elevaram. O RR para câncer endometrial entre mulheres usuárias de estrogênio associado à progestogênio foi de 0,8 (95% CI: 0,6-1,2)³⁴.

Em outra meta-análise a terapia estrogênica em doses moderadas ou altas está associada significativamente com um aumento na taxa de hiperplasia, de uma OR de 5,4 (1,4-20,9) em 6 meses de tratamento a uma OR de 16,0 (9,3-27,5) em 36 meses de tratamento, com doses moderadas de estrogênio. Tanto o regime com progestogênio seqüencial como o contínuo forneceram proteção para hiperplasia endometrial em mulheres que recentemente entraram na menopausa (menos de cinco anos), mas em três anos de tratamento, as pacientes em esquema contínuo apresentaram uma freqüência menor de hiperplasia. Não houve diferença entre os grupos nas taxas de carcinoma³⁵.

Os progestogênios antagonizam o efeito dos estrogênios no endométrio e previnem o desenvolvimento de hiperplasia endometrial quando adicionados aos

estrogênios⁸. Desde 1980, os progestogênios foram adicionados à terapia de reposição hormonal para prevenir o risco de carcinoma endometrial comprovadamente existente com a terapia estrogênica isolada⁸. Estudos randomizados recentes, comparando uso de terapia de reposição hormonal combinada (estrogênio e progesterona) com placebo não evidenciaram um aumento do risco nos carcinomas de endométrio^{36,37}. O *Women's Health Initiative* (WHI) randomizou 16608 mulheres na pós-menopausa para receber 0,625mg de estrogênios conjugados e 2,5mg de acetato de medroxiprogesterona ou placebo por mais de cinco anos³⁶. O *Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study* randomizou 2763 para receber a mesma dosagem de medicação ou placebo por 4 anos, quando o cegamento das pacientes foi quebrado e 2321 mulheres foram acompanhadas por mais de 2,7 anos³⁷. Nos dois estudos não houve um aumento no risco de carcinoma endométrico no grupo tratado^{36,37}.

2.6. Tamoxifeno

O tamoxifeno é a medicação antineoplásica mais amplamente prescrita para o tratamento adjuvante do câncer de mama. É um modulador seletivo do receptor estrogênico⁸. Existem estudos que sugerem que o tamoxifeno exerce um efeito estrogênico no endométrio e vários relatos documentaram um aumento na incidência de hiperplasia endometrial e pólipos em mulheres tratadas com tamoxifeno⁸.

Os primeiros resultados avaliando a associação entre carcinoma endometrial e tamoxifeno provenientes de um ensaio clínico randomizado são de 1989, que comparava um grupo usando 40mg/dia de tamoxifeno e outro recebendo tratamento placebo por dois anos, como terapia adjuvante, em 1846 mulheres pós-menopáusicas portadoras de carcinomas mamários. Comparadas com o grupo controle, o risco relativo de usuárias de tamoxifeno por mais de cinco anos para o desenvolvimento de carcinoma endometrial era

6,4 (1,4-2,8) vezes maior que o dos controles²².

O ensaio clínico *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project* incluiu 2.843 pacientes com carcinoma de mama invasor, sem linfonodos comprometidos e com receptores estrogênicos positivos, que foram randomizadas para receber 20mg/dia de tamoxifeno ou placebo por oito anos. Em comparação ao grupo placebo, o risco relativo para carcinoma endometrial foi significativamente maior no grupo tratado (RR: 7,5 IC: 1,7-32,7) e os tumores não apresentaram um prognóstico pior ou diferentes tipos histológicos que o grupo não tratado³⁸.

Outro estudo com o objetivo de avaliar a redução na incidência de casos novos de carcinoma de mama em pacientes sem neoplasia e de alto risco, randomizou mulheres na pré e na pós menopausa para receber 20mg/dia de tamoxifeno ou placebo por cinco anos. Nesse estudo também foi observado um aumento do risco relativo para carcinoma endometrial no grupo tratado, (RR: 2,53, IC: 1,35-4,97) e houve uma redução de 50% nos tumores não invasivos e invasivos de mama neste grupo e os tumores das usuárias de tamoxifeno eram geralmente restritos à pelve e bem diferenciados.³⁹

Embora a literatura associe os carcinomas endometriais ao uso de tamoxifeno com melhor prognóstico por serem tumores mais diferenciados, um estudo de casos e controles realizado na Noruega, comparando pacientes com carcinoma de mama usuárias e não-usuárias de tamoxifeno, em relação ao desenvolvimento posterior de carcinoma endometrial, usando a base de dados de todo o país, apresentou resultados menos favoráveis⁴⁰. O estudo incluiu 309 casos (portadoras de carcinoma endometrial e de mama) e 860 controles (portadoras de carcinoma de mama) e o risco de desenvolvimento de carcinoma endometrial após dois anos de uso foi significativamente maior nas usuárias de tamoxifeno. O risco relativo foi duas vezes maior para usuárias por dois a cinco anos (IC: 1,2-3,2) e um risco relativo de 6,9 maior para usuárias por mais de cinco anos (IC:2,4 a 19,4). Os carcinomas estádios III e IV da FIGO (Federação Internacional de Ginecologia

e Obstetrícia) ocorreram significativamente com mais frequência nas usuárias de tamoxifeno por mais de dois anos que em não usuárias (17,4% e 5,4%, respectivamente $p=0,006$)⁴⁰.

2.7. Estrogênios endógenos

Enquanto os estrogênios exógenos foram amplamente estudados na literatura, as evidências avaliando papel dos estrogênios endógenos são limitadas⁸. Na pós-menopausa a produção de estrogênios persiste pela conversão periférica de androgênios que ocorre predominantemente no tecido adiposo^{8,41}. Alguns estudos epidemiológicos detectaram uma correlação positiva entre níveis séricos de estrona^{33,41}, estradiol^{33,41,42} e negativa para SHBG⁴² (globulina de ligação dos hormônios sexuais) com o peso corporal em mulheres pós-menopáusicas saudáveis e em portadoras de carcinoma endometrial na pós-menopausa.

Um estudo incluiu 68 portadoras de carcinoma endometrial na pré-menopausa e 208 na pós-menopausa e 107 controles pré-menopáusicas e 209 pós-menopáusicas. Foi detectada uma associação entre níveis aumentados de androstenediona e carcinoma de endométrio na pré-menopausa (OR: 3,6 IC:1,2-11) e na pós-menopausa (OR:2,8 IC:1,5-5,2) e níveis elevados de estrona, apenas na pós-menopausa. (OR: 2,2 IC:1,2-4,4). Níveis elevados de SHBG na pós-menopausa (OR: 0,51 IC:0,27-0,95) foram relacionados com uma diminuição na associação²⁴. Outro estudo detectou uma associação entre níveis elevados de androstenediona e estradiol entre portadoras de carcinoma de endométrio (118 pacientes) e controles saudáveis (334 pacientes), mesmo após a correção para o índice de massa corporal³³. Nos dois estudos a associação entre carcinoma de endométrio e alguns hormônios foi alterada pelo IMC (índice de massa corporal). Neste

último estudo a associação diminuiu para o estradiol e desapareceu para a estrona após a correção e no estudo anterior a associação desapareceu para estradiol e diminuiu para estrona na pós-menopausa, sendo que na pré menopausa a associação desapareceu para ambos. Por outro lado, a correção da associação entre carcinoma endometrial e obesidade praticamente não foi influenciada pelos níveis hormonais, sugerindo a hipótese de que os níveis aumentados de estrogênios isoladamente não explicariam o risco associado à obesidade²⁴.

2.8. Obesidade e diabetes

Entre os fatores de risco associados a esta neoplasia, a obesidade ocupa um papel de destaque^{3,4,5,6}. O ponto de corte a partir do qual o aumento no risco começa a ser detectado varia, mas os geralmente estudos detectam o risco com IMC a partir de 28 kg/m²^{4,6,7,24,33} e o risco aumenta com o aumento do IMC^{4,5,24,47}. Há consenso na literatura quanto à associação entre obesidade e o carcinoma de endométrio^{23,25,33,43}, mas a relação com deposição central de gordura é controversa^{7,23,24}. Em estudo epidemiológico publicado em 1984, com casos e controles, o risco relativo para o desenvolvimento de carcinoma de endométrio para mulheres pré-menopáusicas com IMC entre 25 e 29 kg/m² foi de 3,9 (1,2 a 12,9) e para pacientes com IMC maior que 30 o RR foi 20,3 (4,0-103,5), para o desenvolvimento de carcinoma de endométrio. Para mulheres na pós-menopausa o RR foi 3,3 (1,8-6,0) para pacientes com IMC entre 25 e 29 e RR foi 7,6 (4,2-14,0) para mulheres com IMC maior que 30⁴. Outro estudo de casos e controles incluiu 188 pacientes com carcinoma de endométrio e 334 controles saudáveis e avaliou quatro grupos de IMC. O risco foi significativamente aumentado apenas no grupo de IMC maior ou igual a 36,4 kg/m², com um risco relativo de 2,3, variando entre 1,2 a 3,9³³. Um estudo de casos e controles aninhado à coorte do *Iowa Women's Health Study* incluiu 63 casos e

1274 controles detectando associação do carcinoma de endométrio com obesidade a partir de IMC de 28,33 kg/m² (OR:2,63 IC:1,44 a 4,80)⁷.

Um estudo analisou o prognóstico das pacientes obesas com carcinoma endometrial, avaliando 492 mulheres obesas e não obesas e detectou que o IMC se relacionava com o grau de diferenciação e o estágio, conhecidos fatores prognósticos. As pacientes mais obesas apresentavam tumores mais diferenciados e menos invasores. Houve também uma diferença estatisticamente significativa no tempo para a recorrência, que aumentava com o aumento do IMC (p=0,0136). Embora houvesse uma tendência de uma proporção maior de tumores serosos ou de células claras nas pacientes não obesas, a diferença não foi estatisticamente significativa⁴⁴.

A obesidade na pós-menopausa leva a um aumento na produção periférica de estrogênios^{24,33,41,42}, principalmente pela aromatização da androstenediona em estrona nas células adiposas^{8,41,45}. Em alguns estudos a associação entre níveis elevados de estrogênios e carcinoma de endométrio não é observada⁴² e autores sugerem a possibilidade de produção estrogênios pela aromatização dos precursores adrenais no tecido endometrial²⁴. Embora a existência de aromatase não tenha sido documentada no endométrio normal, existem relatos de sua presença em células de carcinoma endometrial obtidas após histerectomia⁴⁶. Níveis elevados de androstenediona estão associados a carcinoma de endométrio^{23,24} em vários estudos e em alguns deles não houve correlação com o peso corporal das pacientes³³. Os níveis diminuídos de SHBG nas mulheres com IMC maior^{24,42} aumentariam a biodisponibilidade do estradiol⁸. Existem estudos relatando uma diminuição do risco de carcinoma de endométrio com níveis elevados de SHBG²⁴.

Embora o Diabetes Mellitus seja classicamente descrito como fator de risco para carcinoma de endométrio^{5,6,24,33}, a literatura apresenta dados controversos ao avaliar o papel da insulina na sua gênese. Um estudo de casos e controles com objetivo de avaliar a contribuição específica do Diabetes *Mellitus* como fator de risco para o carcinoma de

endométrio verificou que as pacientes diabéticas apresentavam uma chance quase duas vezes maior de terem carcinoma de endométrio (OR: 1,86 IC: 1,37-2,52) e as pacientes obesas também apresentavam uma chance maior de desenvolverem carcinoma de endométrio, se comparadas as pacientes de peso normal (OR: 3,88 IC: 3,11-4,85). Esses dados foram analisados com modelos de regressão logística e ao comparar pacientes diabéticas de peso normal ou com sobrepeso com controles sem diabetes e de peso normal, os riscos detectados não foram estatisticamente significativos (respectivamente, OR: 1,10 IC: 0,66-1,86 e OR: 1,58 IC: 0,81-3,05). Apenas as mulheres obesas e diabéticas apresentaram um risco estatisticamente significativo (OR: 2,95, IC: 1,60-5,46). Os autores concluíram que mulheres diabéticas não obesas não apresentaram uma chance maior de terem carcinoma de endométrio em comparação a mulheres não diabéticas e não obesas, mas não descartaram a relação da insulina com este tumor, aventando a hipótese de mecanismos celulares ainda não esclarecidos⁴³. Outro estudo também verificou o desaparecimento da associação entre diabetes e carcinoma de endométrio após o controle para o índice de massa corporal⁷.

Existe um estudo recente tentando relacionar uma medida indireta de insulina em jejum, o peptídeo C, que observou uma relação positiva entre níveis de peptídeo C e carcinoma de endométrio (excluídas as pacientes com *Diabete Mellitus*). A relação desaparecia ao se corrigir os níveis em função do índice de massa corporal e os autores concluíram que os dados não eram compatíveis com a hipótese de que o efeito da obesidade no carcinoma de endométrio seja mediado por altos níveis de insulina. Por outro lado, a correção dos níveis de peptídeo C praticamente não influenciou na associação entre IMC e carcinoma de endométrio²³. Entretanto, os autores fizeram a ressalva de que o peptídeo C pode ser um indicador de hiperinsulinemia a curto prazo enquanto o IMC pode ser um indicador melhor de exposição à insulina a longo prazo.

2.9. Insulina e IGF-I (insulin-like growth factor I)

Muitos estudos relataram um aumento no risco de carcinoma de endométrio em mulheres portadoras de diabetes^{5,6,24}. Parazzini *et al*⁴⁷ em um estudo de casos e controles com 132 portadoras de carcinoma de endométrio e 116 controles saudáveis, relataram uma associação entre o risco de carcinoma de endométrio apenas em mulheres acima de 40 anos e exclusivamente do *diabetes mellitus* não insulino-dependente (OR:2,9 IC:2,2-39), que é caracterizado por resistência à insulina e hiperinsulinemia. A associação permaneceu estatisticamente significativa após a correção pelo IMC⁴⁷.

Evidências indiretas sugerem que tanto a hiperinsulinemia quanto níveis mais altos do IGF-I possam ser atuantes nas neoplasias hormônio-dependentes^{8,16,17}. A hiperinsulinemia aumentaria a produção dos esteróides ovarianos^{8,16}, estimula a aromatização dos androgênios em estrogênios⁴⁸ e evidências indiretas sugerem que ela diminuiria os níveis circulantes de SHBG⁴⁹.

A insulina⁵⁰ e seus polipeptídeos relacionados, como o IGF-I¹⁰, são reguladores potentes dos fluxos metabólicos nas células em múltiplos tecidos-alvo. Considera-se que a insulina primariamente esteja envolvida na homeostase metabólica enquanto os IGFs ajam como hormônios reguladores do metabolismo e também como reguladores da proliferação celular⁵¹. Além de seus efeitos primários na homeostase da glicose, a insulina promove outros efeitos celulares como síntese de DNA e transcrição gênica, promovendo crescimento e diferenciação celulares⁵⁰. Em nível celular, os IGFs e suas proteínas ligantes tem efeitos na proliferação, diferenciação celular e na apoptose^{18,52}.

A família IGF consiste de três peptídeos insulina, IGF-I e IGF-II, três receptores de membrana celular (os receptores de insulina, IGF-I, IGF-II)¹⁰, e seis proteínas ligantes, IGFBP-1-6^{53,54}. Estudos recentes adicionaram novos componentes a essa família, o IRR (receptor relacionado ao receptor de insulina)^{10,18}, várias proteínas ligantes relacionadas

às proteínas ligantes (proteins related to insulin-like growth binding proteins, IGBPrPs)^{53,54} e um grupo de proteases das proteínas ligantes¹⁸.

O IGF-I é sintetizado no fígado em resposta ao hormônio de crescimento (GH) e a insulina é sintetizada nas células beta do pâncreas na forma de pró-insulina⁵¹. IGF-I e IGF-II compartilham 62% de homologia na seqüência de aminoácidos e há 40% de homologia entre os IGFs e a pró-insulina¹⁸. A maior parte dos IGFs circulantes estão ligados à IGFBP III.

Tanto os receptores de insulina⁵⁵ como os de IGF-I¹⁰ são proteínas heterotetraméricas que possuem duas subunidades alfa e duas subunidades beta, que são ligadas por pontes dissulfídicas⁵⁶. As subunidades alfa, localizadas fora da membrana plasmática, são os sítios de ligação^{10,50} e as subunidades beta são proteínas transmembrana, compostas de uma porção extracelular, um domínio transmembrana e uma porção intra-celular^{10,55}. Os receptores de insulina e IGF-I sofrem auto-fosforilação e têm atividade tirosina-quinase intrínseca^{10,13,14,50,57}. Os receptores de IGF-I estão distribuídos praticamente em todas as células e tecidos¹⁰. Os receptores de insulina também são encontrados em praticamente todas as células dos mamíferos⁵⁰. O receptor de IGF-II não é dissulfídico⁵⁶, apresentando uma estrutura manose-6-fostato⁵¹.

Embora os receptores de IGF-I de insulina demonstrem similaridades são comprovadamente receptores diferentes. O receptores de IGF-I têm uma maior afinidade pelo IGF-I que pelo IGF-II e uma baixa afinidade pela insulina, enquanto o receptor para IGF-II tem uma grande afinidade pelo IGF-II e não tem afinidade pela insulina. Os receptores de insulina têm uma alta afinidade pela insulina e uma afinidade relativa pelo receptor de IGF-I⁵⁶. Existem isoformas tanto para o receptor de insulina^{14,55}, quanto para o de IGF-I¹⁰.

Estudos têm demonstrado a existência de receptores híbridos. Estes consistem de um alfabeta receptor de IGF-I e outro de insulina, também ligados via pontes dissulfídicas

para formar receptores híbridos heterotetraméricos¹⁴. Em experimentos laboratoriais, os receptores híbridos se ligam ao IGF-I com afinidade similar a do receptor de IGF-I, mas se ligam à insulina com uma afinidade menor que a dos receptores de insulina. Acredita-se que os receptores híbridos possam diminuir a ligação da insulina nas células que expressem os dois receptores, mas que não diminuiriam a ligação do IGF-I. Entretanto, não se sabe se receptores híbridos podem ativar a transdução de sinal intracelular¹⁰.

Os mecanismos da transdução de sinal estão apenas parcialmente esclarecidos. Ao se ligarem às subunidades alfa dos receptores a insulina e o IGF-I desencadeiam a atividade tirosina-quinase dos receptores, resultando na auto-fosforilação dos seus resíduos de tirosina^{10,50}. O IRS-1 (primeiro substrato do receptor de insulina) é uma proteína citosólica que aponta no receptor de insulina⁵⁵ e no receptor de IGF-I¹⁰ e distribui o sinal para outros elementos da cascata de transmissão. A transdução do sinal de ambos os receptores envolve a ativação de várias etapas de sinalização intracelular, incluindo o Ras/Raf/MAP-quinase e o fosfatidil-inositol-3 quinase^{18,55}.

As proteínas de ligação dos IGFs (IGFBP) são moléculas produzidas no fígado e assim designadas por sua alta afinidade na ligação com os IGFs⁵¹, mas existem estudos demonstrando a secreção de proteínas ligantes localmente, sugerindo uma ação autócrina ou parácrina^{15,65}. A função mais conhecida das proteínas ligantes é a ligação aos IGFs, impedindo a ligação de IGF-I e IGF-II ao receptor de IGF-I. As proteínas ligantes também podem servir como transportadoras de IGF-I até células-alvo, interagir com outros fatores de crescimento e ter ações independentes dos IGFs⁵¹. Algumas dessas proteínas ligantes se ligam aos IGFs com maior afinidade que os IGFs têm pelos seus receptores, impedindo a ativação da sinalização intracelular⁵¹. A maioria das informações sobre as proteínas ligantes vem de estudos *in vitro* e parece que as IGFBPs-I e III podem tanto inibir ou potencializar os efeitos do IGF-I, aumentando a sua disponibilidade no receptor. Tanto a IGFBP-I como a IGFBP-III podem potencializar a

ação do IGF-I *in vitro* possivelmente por este mecanismo⁵⁴. A IGFBP-III é a proteína de ligação mais abundante na circulação e maior parte do IGF-I circula ligado a ela e apenas em torno de 0,5 a 2% do IGF-I circula livre^{18,54}. O IGF-I também circula ligado às outras proteínas ligantes e existe a possibilidade de essas diferentes ligações compartimentalizarem o IGF-I circulante em diferentes meias-vidas ou capacidades funcionais⁵⁴. A afinidade dessas proteínas pelos IGFs pode ser regulada pelas proteases entre outros mecanismos⁵¹. As IGFbps têm uma interação insignificante com a insulina, enquanto que as IGFbrps se ligam à insulina com alta afinidade, propriedade compartilhada com a porção amino-terminal da IGFBP-III^{10,54}.

Existem evidências *in vivo*^{20,65} e *in vitro*⁵⁸ de que o sistema IGF aja de maneira autócrina/parácrina no endométrio. As proteínas de ligação do sistema IGF têm uma influência importante e parcialmente esclarecida. O desequilíbrio entre os IGFs e as suas proteínas ligantes poderia desencadear uma proliferação celular endometrial descontrolada e assim como o estímulo isolado de estrogênio, o IGF-I sem a oposição de suas proteínas ligantes poderia aumentar o risco de carcinoma endometrial⁸.

Há um estudo demonstrando pacientes portadoras de carcinoma de endométrio pós-menopáusicas com níveis de insulina em jejum e após sobrecarga de glicose mais altos que controles. Surpreendentemente, os níveis de glicemia foram similares nos dois grupos. Foi encontrada uma maior frequência de células luteinizadas nos ovários das pacientes com carcinoma de endométrio e só nessas pacientes foi detectada imunorreação para testosterona. Foram pesquisados receptores de insulina nos ovários das mulheres pós-menopausicas. Os autores sugeriram que a insulina poderia ser responsável pelo aumento na luteinização estromal nos ovários das mulheres com carcinoma de endométrio, de maneira similar ao que acontece nas mulheres pré-menopáusicas com hiperandrogenismo¹⁶.

Outro estudo comparando pacientes com carcinoma de endométrio não diabéticas

pareadas por idade e IMC com controles saudáveis normais, avaliou parâmetros bioquímicos detectando níveis de glicemia e insulina em jejum mais altos e níveis de IGF-I, IGF-II e IGFBP-III mais baixos nas pacientes com carcinoma de endométrio e no teste de tolerância à glicose com 75g a glicemia e os níveis de insulina em 3 horas foram mais elevados nos casos de maneira estatisticamente significativa. Os níveis de IGFBP-I e II não diferiram entre os grupos. Os autores concluíram que além de uma alteração no metabolismo dos carboidratos as pacientes com carcinoma de endométrio apresentaram uma alteração nos níveis circulantes do sistema IGF em comparação aos controles. Nos casos houve uma correlação inversa entre IGF-I, IGF-II e IGFBP-III séricos e idade, que não foi observada nos controles⁵⁹. Existem outros estudos correlacionando a diminuição dos níveis séricos de IGF-I com a menopausa⁶⁰.

Em relação ao câncer de mama um estudo de casos e controles aninhado ao *Nurses' Health Study* mensurou as concentrações plasmáticas de IGF-I e IGFBP-III em amostras teciduais de mulheres portadoras de carcinoma mamário e controles pareados por idade, status menopausal e uso de TRH. Na amostra geral não houve associação entre o sistema IGF e o risco para carcinoma de mama, mas nas mulheres pré-menopáusicas o risco ajustado foi 2,88 (IC: 1,21-6,85) para os níveis mais altos de IGF-I (maiores que 207 ng/ml). Analisando apenas as mulheres pré-menopáusicas com menos de 50 anos o risco seria 7,28 (IC: 2,40-22,0)¹⁷.

Estudos *in vitro* em linhagens celulares mamárias detectaram uma sinergia entre a ação do estradiol e do IGF-I no crescimento das células em cultura e uma ausência de ação do estradiol isoladamente¹¹. Outro estudo detectou uma inibição da síntese de DNA em células tumorais por citoquinas que antagonizaram os efeitos promotores do crescimento do IGF-I⁶¹. Em experimentos em linhagens celulares de camundongos o receptor de IGF-I é implicado na transformação tumoral de células mamárias¹².

Diversos estudos vêm documentando uma associação entre o receptor de IGF-I e

a transformação tumoral¹⁸, havendo uma maior expressão do receptor em vários tumores^{12,14,19,20}. Evidências *in vitro* e em modelos animais indicam que embora possa haver crescimento celular sem o receptor de IGF-I, ele seria indispensável na manutenção do fenótipo tumoral⁵², provavelmente em função da sua atividade antiapoptótica^{18,62}.

Os receptores de insulina e IGF-I nos endométrios normal e neoplásico humano já foram localizados há algum tempo^{19,20}. Talavera em 1990 demonstrou sítios de ligação para o receptor de IGF-I em endométrio normal e neoplásico com IGF-I radiomarcado. Nesse estudo as diferenças de ligação entre endométrios normais e neoplásicos foram devidas a um aumento no número de receptores e não devidas a uma mudança na afinidade destes. Tanto os carcinomas indiferenciados quanto os diferenciados mostraram uma expressão maior de receptores quando comparados com os controles normais e a expressão dos receptores nos tumores indiferenciados foi maior que nos tumores diferenciados¹⁹.

Estudo realizado em 1991 demonstrou locais específicos de afinidade de ligação no endométrio normal (10 pacientes) e neoplásico (10 pacientes) tanto para insulina como para IGF-I radiomarcados. As médias percentuais de ligação para insulina nos carcinomas endometriais ($2,4\% \pm 0,5\%/100\mu\text{g}$ de proteína) e nos endométrios normais ($3,5\% \pm 1\%/100\mu\text{g}$ de proteína) não foram estatisticamente diferentes. Por outro lado, as médias dos percentuais de ligação do IGF-1 nos carcinomas endometriais ($5,3\% \pm 1,5\%/100\mu\text{g}$ de proteína) foram significativamente maiores ($p < 0,04$) que nos endométrios normais ($2,1\% \pm 0,4\%/100\mu\text{g}$ de proteína). Nesse estudo foram feitas medidas séricas de IGF-I e insulina e não houve uma diferença entre os grupos, sugerindo que IGF-I possa ser produzido localmente no tecido e aja de maneira autócrina ou parácrina. Outro aspecto interessante deste estudo foi a correlação positiva encontrada entre grau histológico e ligação ao IGF-I ($r = 0,865$, $p < 0,02$)²⁰. Uma das limitações desse estudo é

que das dez pacientes incluídas nesse estudo, nove eram obesas e não há descrição do peso das pacientes selecionadas como controles.

Evidências indiretas demonstram uma associação entre os esteróides sexuais, a insulina e o IGF-I^{63,64,65} no endométrio. Estudos avaliando tecido endometrial de pacientes no menacme avaliaram a expressão de IGF-I e IGF-II e seus receptores por técnicas de hibridização. O mRNA de IGF-I foi mais abundante na fase proliferativa enquanto o mRNA de IGF-II era mais abundante na fase secretora^{63,64}. No primeiro estudo foram medidas também as proteínas ligantes I e III e a III foi detectada predominantemente no endométrio secretor e a I exclusivamente nele. Os receptores de IGF-I e II estavam presentes tanto no epitélio quanto no estroma endometriais e não houve mudanças cíclicas neles⁶³. No segundo estudo os receptores estavam expressos mais abundantemente na fase secretora⁶⁴. Um outro estudo comparando a expressão do receptor de IGF-I e de IGBP-III nas fases do ciclo menstrual, detectou a expressão de IGFBP-III apenas na fase secretora e a expressão do receptor não variou ao longo do ciclo⁶⁵.

Em cultura de células de carcinoma endometrial *Ishkawa* (linhagem celular originária de carcinoma bem diferenciado de endométrio) o estrogênio teve uma ação sinérgica com o IGF-I promovendo a multiplicação celular. O estradiol dobrou a presença de receptores para IGF-I e diminuiu a concentração das proteínas ligantes do sistema IGF, possivelmente aumentando a disponibilidade dos IGFs para os seus receptores e a afinidade das proteínas ligantes pelo IGF foi maior que a afinidade do receptor de IGF-I. Mais de 95% do IGF-I detectado estava ligado às proteínas ligantes⁶⁶.

Tanto a insulina como o IGF-I substancialmente aumentam a atividade mitogênica nas linhagens de adenocarcinoma endometrial humano^{67,68}. No primeiro estudo as maiores concentrações de sítios de ligação para insulina foram detectadas nas linhagens HEC-1A e HEC-1B, que são originadas de carcinomas endometrióides bem e

moderadamente diferenciados⁶⁷, que por sua vez estão associados à obesidade²⁸. Embora a quantidade de receptores fosse diferente, a magnitude do estímulo da insulina foi similar nas linhagens⁶⁷. No segundo estudo, insulina, EGF, IGF-I e IGF-II aumentaram o número de células das linhagens HEC-1A e KLE, em comparação a controles⁶⁸. Em linhagens celulares de carcinoma endometrial, a administração de insulina ao meio de cultura induziu a expressão de VEGF (fator do crescimento vascular endometrial) em células das linhagens HEC-1A e *Ishkawa*. Os autores sugeriram que a insulina poderia contribuir para o crescimento tumoral por induzir a expressão do VEGF⁶⁹.

Um estudo avaliou o papel da IGFBP-III em células da linhagem HEC1A concluindo que a proliferação celular induzida pelo IGF-I foi menor nas células que tinham uma maior quantidade de IGFBP-III associada à membrana pré-incubação. A administração de IGF-I ao meio de cultura promoveu a secreção de IGFB-III no meio. Os mecanismos pelos quais a IGFBP-III associada à célula interfere na proliferação celular induzida pelo IGF-I é desconhecido, mas existe a possibilidade de mecanismos independentes de IGF-I. Os autores concluíram que as duas formas da proteína ligante atuam no sentido de diminuir a ação do IGF-I nesta linhagem celular⁷⁰.

Um experimento avaliando a produção de IGFBP-I em cinco linhagens celulares de carcinoma endometrial (HEC-1B, KLE, HEC-1A, RL952 e AN3CA) detectou inibição da secreção de IGFBP-I pela técnica imunorradiativa com anticorpos monoclonais por clomifene e progesterona. Estrogênio, cortisol e insulina não tiveram efeito na secreção. Nas duas linhagens celulares em que foram localizados receptores para IGF-I (HEC-1B e KLE) houve secreção de IGFBP-I. Como a progesterona diminuiu a secreção de IGFBP-I, os autores sugeriram que o controle das proteínas ligantes pode ser diferente nos carcinomas em relação aos endométrios normais¹⁵.

Existem trabalhos que sugerem que a presença de progesterona estimularia a secreção de IGFBP-I, modulando a ação do IGF-I. Um estudo incluindo mulheres pós-

menopáusicas com sangramento uterino anormal detectou uma ausência de expressão do mRNA da IGBP-I e uma abundante expressão de receptor de progesterona por RT-PCR (*reverse transcription-polimerase chain reaction*) semiquantitativa. Biópsias realizadas 6 meses após o uso de terapia de reposição hormonal combinada (estrogênios conjugados 0,625mg e acetato de medroxiprogesterona 5mg) detectaram a presença de expressão do mRNA da IGFBP-I e ausência de expressão do receptor de progesterona. A expressão de IGF-I foi significativamente maior antes da terapia de reposição hormonal e a expressão dos receptores de IGF-I e de estrogênio não variaram de maneira estatisticamente significativa antes e depois do tratamento⁷¹.

Outro estudo comparou afinidade do receptor de insulina e atividade tirosina-quinase no endométrio entre pacientes portadoras de carcinoma endometrial e controles normais. A afinidade da insulina pelo seu receptor foi similar e não houve diferença estatisticamente significativa nas concentrações de receptores ($2,1 \pm 1,34 \text{ fmol } \mu\text{g}^{-1}$ nos carcinomas e $3,4 \pm 2,5 \text{ fmol } \mu\text{g}^{-1}$ nos controles). Esse estudo também avaliou a autofosforilação destes receptores e novamente não houve diferença significativa nos dois grupos⁵⁷.

Estudo comparando a expressão do receptor de IGF-I por imuno-histoquímica entre pacientes com carcinoma de endométrio e pacientes que foram hysterectomizadas por doença benigna, não detectou diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A presença de IGF-I foi avaliada por *Northern Blot* e houve uma expressão reduzida do mRNA de IGF-I nos carcinomas, em comparação ao grupo controle. Os autores concluíram haver pouca possibilidade o sistema IGF desempenhar um papel importante na carcinogênese endometrial⁷². Outros estudos *in vitro* não detectaram uma contribuição importante do IGF-I na proliferação celular na linhagem HEC-1A de carcinoma de endométrio⁷³.

Um estudo avaliou a expressão de IGF-I e seu receptor por RT-PCR (*reverse*

transcription-polymerase chain reaction) semiquantitativa em endométrios normais e carcinomas endometriais⁷⁴. Comparando os endométrios proliferativos e secretores, o mRNA de IGF-I foi maior nas fases proliferativa e secretora inicial e o mRNA do receptor de IGF-I teve uma expressão maior no início da fase secretora. Os níveis dos receptores de IGF-I foram considerados elevados ao comparar os níveis de IGF-I nesses mesmos carcinomas.

2.10. Imuno-Histoquímica

A técnica de imuno-histoquímica baseia-se no uso de anticorpos direcionados contra marcadores antigênicos. Os anticorpos podem ser policlonais, derivados do soro de animais imunizados, ou monoclonais, derivados de hibridomas de ratos. Eles podem ser usados para corar células desagregadas de tecidos sólidos ou em suspensão, vistas por citometria de fluxo, em esfregaços ou secção de tecidos em lâminas vistas ao microscópio ótico⁷⁵.

A imuno-histoquímica é usada para detectar e expressão de genes específicos, identificar a origem tecidual de um tumor ou detectar proteínas mutantes, tais como produtos de oncogenes ou genes supressores tumorais. As vantagens desta técnica incluem a rapidez, a possibilidade de medir os resultados por citometria de fluxo, a habilidade de relacionar a localização antigênica com a área lesada e a variação da sensibilidade específica das diferentes preparações de anticorpos⁷⁵.

2.10.1. Receptores de estrogênio e progesterona no endométrio:

A ausência de receptores estrogênicos em carcinomas endometriais está associada em algumas séries a variáveis de mau prognóstico, como tumores não-endometrióides e invasão miometrial⁷⁶. Alguns estudos classificam os receptores hormonais em categorias dicotômicas de positivo/negativo, geralmente considerando como positivos para estrogênio e progesterona quando a coloração nuclear for maior que 10%^{77,78} ou em um número maior de categorias, em geral arbitrando valores em percentuais de coloração nuclear^{76,79}. Em estudo de 1996, avaliando 76 carcinomas endometriais, as pacientes negativas para receptor de estrogênio por imuno-citoquímica apresentaram uma chance quatro vezes maior de morrer durante o estudo ($p=0,009$)⁷⁸. Em outro estudo avaliando carcinomas endometrióides de 92 pacientes a positividade para o receptor de progesterona se correlacionou com estágio inicial, menor grau de invasão miometrial e maior tempo livre de doença⁷⁷. A positividade para o receptor de estrogênio se correlacionou com menor profundidade de invasão miometrial e tempo livre de doença. Estudo avaliando 40 carcinomas endometrióides e 21 carcinomas serosos de endométrio correlacionou a positividade para estrogênio e progesterona com tumores em estágio inicial⁷⁹.

Em estudo recente avaliando portadoras de carcinoma de endométrio de mau prognóstico e que foram submetidas à linfadenectomia com histerectomia, marcadores imunohistoquímicos, entre eles o receptor estrogênico, não se correlacionaram com mau prognóstico em modelos de regressão linear⁸⁰.

2.10.2. Receptores de Insulina e IGF-I:

Existem alguns estudos avaliando a presença do IGF-I e seu receptor no

endométrio por imunohistoquímica^{72,82}. Um estudo associando a reatividade das células epiteliais de carcinoma de mama apenas com o IGF-I (sem avaliar o receptor) detectou uma maior reatividade ao IGF-I nos tumores mais diferenciados⁸¹, achado que também documentado em carcinomas endometriais¹⁹. Essa associação é observada tanto por imunohistoquímica quanto por radioimunoensaio⁸¹. Os autores também observaram uma associação da positividade para IGF-I nos tumores mais diferenciados à positividade de receptores de estrogênio e progesterona⁸¹.

Estudo publicado em 1998⁸² com um pequeno número de casos, avaliou a positividade de IGF-I e IGFBP-I em endométrios normais e neoplásicos em pacientes usuárias ou não de tamoxifeno, por imunohistoquímica. Nesse estudo não foi avaliado receptor de IGF-I. A intensidade da coloração foi medida por métodos de imagem digitalizados. Em comparação com endométrios proliferativos (n=3) houve uma expressão de IGF-I significativamente maior nos endométrios secretores controles (n=5). Nos nove adenocarcinomas avaliados foi detectada coloração para IGF-I, que tendia a ser menor nos carcinomas menos diferenciados. A intensidade de coloração nos carcinomas das pacientes usuárias de tamoxifeno (18) foi significativamente maior, em comparação aos carcinomas das não-usuárias⁸².

Outro estudo avaliou a positividade dos receptores de IGF-I e insulina no ovário de pacientes no menacme por imunohistoquímica⁸³. Os receptores de IGF-I foram detectados nas células da granulosa e os de insulina foram detectados nas células da granulosa, teca e estromais.

Um estudo avaliando por imunohistoquímica o receptor de IGF-I em experimento comparando carcinomas endometriais e endométrios normais, detectou uma coloração intracitoplasmática dos receptores e não detectou diferença de imunorreatividade entre os grupos. Tanto IGF-I quanto seu receptor não se correlacionaram com subtipo tumoral ou grau⁷².

3. OBJETIVOS

Objetivo 1: Avaliar o status de receptores de IGF-I e receptores de insulina pela técnica de imuno-histoquímica em pacientes portadoras de carcinoma de endométrio e compará-las com controles.

Objetivo 2: Avaliar o status de receptores de estrogênio e progesterona pela técnica de imuno-histoquímica em pacientes portadoras de carcinoma de endométrio e compará-las com controles.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 1.0. IARC CancerBase No. 5. Lyon, IARC Press, 2001. Last updated on 03/02/2001 [cited 2003 May 10]. Limited version available from: URL: <http://www-dep.iarc.fr/globocan/globocan.htm>
- ² Instituto Nacional do Câncer. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer: Rio de Janeiro, INCA, 2003.
- ³ Benedet JL, Bender H, Jones H III, Ngan HYS, Pecorelli S. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *Int J Gynecol Obstet* 2000; 70:209-62.
- ⁴ La Vecchia C, Franceschi S, Decarli A, Gallus G, Tognongi G. Risk Factors for Endometrial Cancer at Different Ages. *J Natl Cancer Inst* 1984; 73: 667-71.
- ⁵ Brinton LA, Berman LB, Rodrigue M, Twigss LB, Barret RJ, Wilbanks GD, et al. Reproductive, menstrual, and medical risk factors for endometrial cancer: results from a case-control study. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167:1317-25.
- ⁶ Elwood JM, Cole P, Rothman K, Kaplan S. Epidemiology of Endometrial Cancer. *J Natl Cancer Inst* 1977; 59:1055-61.
- ⁷ Folsom AR, Kaye AS, Potter JD, Princas RA. Association of Incident Carcinoma of Endometrium with Body Weight and Fat Distribution in Older Woman: Findings of Iowa Woman's Health Study. *Cancer Res* 1989; 49: 6823-31.
- ⁸ Akmedkhanov A, Zeleuniuch-Jacquotte, A Toniolo P. Role of Exogenous and Endogenous Hormones in Endometrial Cancer. Review of the Evidence and Research Perspectives. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 943: 296-315.

- ⁹ Emons G, Fleckenstein G, Hinney B, Huschmand A, Heyl W. *Endocr Relat Cancer* 2000; 7:227-42.
- ¹⁰ LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT. *Molecular and Cellular Aspects of the Insulin-Like Growth Factor I Receptor*. *Endocr Rev* 1995; 16:143-63.
- ¹¹ Hamelers IH, Schaik RF, Teefelen HA, Sussenbach JS, Steenbergh PH. *Synergistic Proliferative Action of Insulin-like Growth Factor I and 17 β estradiol in MCF-7S Breast Tumor Cells*. *Exp Cel Res* 2002; 273:107-17.
- ¹² Chernicky CL, Tan H, Yi L, de Mola JR, Ilan J. *Treatment of murine breast cancer cells with antisense RNA to the type I insuline-like growth factor receptor decreases the level of plasminogen activator transcripts, inhibits cell growth in vitro , and reduces tumorigenesis in vivo*. *J Clin Pathol: Mol pathol* 2002; 55:102-9.
- ¹³ Corletta HE, Capp E, Corletta OC. *Insulin receptor tyrosine-kinase activity in colon carcinoma*. *Braz J Med Biol Res* 1996; 29:1593–7.
- ¹⁴ Kellerer M, Corleta HvE, Mühlhöfer A, Capp E, Mosthaf L, Bock S, et al. *Insulin and insulin-like growth factor-I receptor tyrosine – kinase activities in human renal carcinoma*. *Int J Cancer* 1995; 62:501-7.
- ¹⁵ Pekonem F, Nyman T, Rutament EM. *Human endometrial adenocarcinoma cell lines HEC 1B e KLE secrete insulin-like gorwth factor binding protein-1 and contain IGF-I receptors*. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 75: 81-7.
- ¹⁶ Nagamani M, Hannigan EV, Dinh TV, Stuart CA. *Hyperinsulinemia and Stromal Luteinization of the Ovaries in Postmenopausal Women with Endometrial Cancer*. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67:144-8.
- ¹⁷ Haskinson SE, Willet WC, Colditz, Hunter DJ, Michaud DS, Derco B, et al. *Circulating concentrations of insulin-like growth-factor I and risk of breast cancer*. *Lancet* 1998; 351: 1393-96.

- ¹⁸ Füstemberg G, Senn H. Insulin-like growth factor and cancer. *Lancet Oncol* 2002; 3: 298-302.
- ¹⁹ Talavera F, Reynolds RK, Roberts JA, Menon MJ. Insulin-Like Growth Factor I Receptors in Normal and Neoplastic Endometrium. *Cancer Res* 1990; 50:3019-24.
- ²⁰ Nagamani M, Stuart CA, Dunhardt PA, Doherty MG. Specific binding sites for insulin and insulin-like growth factor I in human endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165:1865-71.
- ²¹ McDonald, TW, Malkasian GD, Gaffey TA. Endometrial Cancer Associated with Feminizing Ovarian Tumor and Polycystic Ovarian Disease. *Obstet Gynecol* 1977; 49: 654-658.
- ²² Fornander T, Cedermark B, Mattsson A, Skoog L, Theve T, Askergren J, et al. Adjuvant Tamoxifen in Early Breast Cancer: Occurrence of New Primary Cancers. *Lancet* Jan 1989; 117-20.
- ²³ Troisi R, Potischman N, Hoover RN, Siiteri P, Brinton LA. Insulin and Endometrial Cancer. *Am J Epidemiol* 1997; 146: 476-82.
- ²⁴ Potischman N, Hoover RN, Brinton LA, Siiteri P, Dorgan JF, Swanson CA, et al. Case-Control Study of Endometrial Cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1127-35.
- ²⁵ Goodman MT, Hankin JH, Lyu LR, McDuffie, Liu L, Kolonel L. Diet, Body Size, Physical Activity and the Risk of Endometrial Cancer. *Cancer Res* 1997; 57:5077-85
- ²⁶ Henderson BR, Feigelson HS. Hormonal Carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000; 21:427-33.
- ²⁷ Sherman ME. Theories of Endometrial Carcinogenesis: a Multidisciplinary Approach. *Mod Pathol* 2000; 13: 295-308.
- ²⁸ Westhoff C, Heller D, Drosinos S, Tancer L. Risk factors for hyperplasia-associated versus atrophy-associated endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182:506-8.

- ²⁹ Fabjani G, Kucera E, Schuster E, Minai-Pour M, Czerwenka K, Sliutz G, et al. Genetic alterations in endometrial hyperplasia and cancer. *Cancer Let* 2002, 175: 205-11.
- ³⁰ Basil JD, Goodfellow PJ, Rader J, Muntch DG, Herzog. Clinical Significance of Microsatellite Instability in Endometrial Carcinoma. *Cancer* 2000; 89:1758-64.
- ³¹ Lynch LT, Chapelle de la A. Hereditary Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2003; 348:919-32.
- ³² Terry PD, Rohan T, Franceschi S, Weiderpass E, et al. Cigarette smoking and the risk of endometrial cancer. *Lancet Oncol* 2002; 3:470-80.
- ³³ Austin H, Austin JM, Partridge EE, Hatch KD, Shingleton HM. Endometrial Cancer, Obesity and Body Fat Distribution. *Cancer Res* 1991; 51: 568-72.
- ³⁴ Grady D, Gebretsadik T, Kerlikowske K, Ernster V, Petitti D. Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: a meta-analysis *Obstet Gynecol* 1995; 85: 304-313.
- ³⁵ Farquhar C, Sarkis A, Roberts H, Jepson R, Barlow D. Hormone replacement therapy in postmenopausal women: endometrial hyperplasia and irregular bleeding (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library*, Issue 4, 2001. Oxford: Update Software.
- ³⁶ Wrintig Group for the Women`s Health Initiative Investigators. Risk and Benefits From the Women`s Health Initiative Randomized Controlled Trial. *JAMA* 2002; 288:321-33.
- ³⁷ Hulley S, Furberg C, Barret-Connor, Cauley, Grady D, Haskell W, et al. Noncardiovascular Disease Outcomes During 6.8 Years of Hormone Replacement Therapy. Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study Follow-up (HERS II). *JAMA* 2002; 288: 58-66.
- ³⁸ Fisher F, Constantino JP, Redmond CK, Fisher ER, Wickerham DL, Cronim WM, et al. Endometrial Cancer in Tamoxifen-Treated Breast Cancer Patients: Findings From the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B 14. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86:527-37.

- ³⁹ Fisher F, Constantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronim WM, et al. Tamoxifen for Prevention of Breast Cancer: Report of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P 1. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:1371-88.
- ⁴⁰ Bergman L, Beelen MI, Gallee Mp, Hollema H, Berraadt J, van Leeuwen FE. Risk and prognosis of endometrial cancer after for tamoxifen and breast cancer. *Lancet* 2000; 356: 881-87.
- ⁴¹ Judd HL, Lucas WE, Tem, SC. Estrogens endometrial cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1976, 43:272-8.
- ⁴² Davidson BJ, Gambone JC, Lagasse LD, Castaldo TW, Hammond GL, Siiteri PK, et al. Free Estradiol in Postmenopausal Women with and without Endometrial Cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 1981, 52:404-8.
- ⁴³ Shoff SM, Newcomb PA. Diabetes, Body Size, and Risk of Endometrial Cancer. *Am J Epidemiol* 1998; 148: 234-40.
- ⁴⁴ Anderson B, Connor CP, Andrews JI, Davis CS, Buller RE, Sorosky JI, et al. Obesity and prognosis in endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174:1171-9.
- ⁴⁵ MacDonald, Edman CD, Hemsell DL, Porter JC, Siiteri PK. Effect of obesity on conversion of plasma androstenedione to estrone in postmenopausal women with and without endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1978; 130: 448-55.
- ⁴⁶ Bulum SE, Economos K, Miller D, Simpsim ER. CYP19 (Aromatase Cytochrome p450) Gene Expression in Human Malignant Endometrial Tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:1831-4.
- ⁴⁷ Parazzini F, La Vecchia C, Negri E, Riboldi GL, Surace M, Benzi G, et al. Diabetes and Endometrial Cancer: an Italian Case-Control Study. *Int J Cancer* 1999; 81:539-42.
- ⁴⁸ Garzo VG, Dorrington JH. Aromatase activity in human granulosa cells during follicular development and the modulation by follicle-stimulating hormone and insulin. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 148: 657-62.

- ⁴⁹ Nestler JE, Powers LP, Matt DW, Steingold KA, Plymate SR, Rittmaster RS, et al. A Direct Effect of Hyperinsulinemia on Serum Sex Hormone-Binding Globuline Levels in Obese Women with Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72: 83-9.
- ⁵⁰ Cheatham B, Kahn R. Insulin Action and Insulin Signaling Network. *Endocrine Rev* 1995; 16: 117-42.
- ⁵¹ Le Roith D. Insulin-like Growth Factors. *N Engl J Med* 1997; 336:633-9.
- ⁵² Barsega R. The Insulin-like Growth Factor I Receptor: A Key to Tumor Growth? *Cancer Res* 1995; 55:249-52.
- ⁵³ Hwa V, Oh Y, Rosenfeld R. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 20:761-87.
- ⁵⁴ Murphy LJ. Insulin-like growth factor-binding proteins: functional diversity or redundancy? *J Mol Endocrinol* 1998; 23:97-107.
- ⁵⁵ Capp E, Corletta HE. Transdução do sinal de insulina no diabetes mellitus tipo II. *Pesq Med* 1998; 32:24-30.
- ⁵⁶ Massagué J, Czech MP. The Subunit Structures of Two Distinct Receptors for Insulin-like Growth Factors I and II and Their Relationship to the Insulin Receptor. *J Biol Chem* 1982; 257: 5038-45.
- ⁵⁷ Capp E, Brandelli A, Monego H, Ribeiro MF, Freitas MS, Pureur R, et al. Binding and tyrosine kinase activity of insulin receptor in human normal and neoplastic endometrium. *Med Sci Res* 1996; 24:621- 3.
- ⁵⁸ Reynolds RK, Hu C, Baker VV. Transforming Growth Factor α and Insulin-like Growth Factor-I but not Epidermal Growth Factor, Elicit Autocrine Stimulation of Mitogenesis in Endometrial Cancer Cell Lines. *Gynecol Oncol* 1998; 70:202-9.
- ⁵⁹ Rutanem E, Stenman S, Blum W, Kärkkäinen T, Lehtovirta P, Stenman U. Relationship between Carbohydrate Metabolism and Serum Insulin-like Growth Factor System in

Postmenopausal Women: Comparison of Endometrial Cancer Patients with Healthy Controls. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77:199-204.

⁶⁰ Poehlman ET, Toth MJ, Ades PA, Rosen CJ. Menopause-associated changes in plasma lipids, insulin-like growth factor I and blood pressure: a longitudinal study. *Eur J Clin Invest* 1997; 27: 322-6.

⁶¹ Shen W, Zhou J, Broussard SR, Freund GG, Dantzer R, Kelley K. Proinflammatory Cytokines Block Growth of Breast Cancer Cells by Impairing Signal from a Growth Factor Receptor. *Cancer Res* 2002; 62:4746-56.

⁶² Sell C, Barsega R, Rubin R. Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) and the IGF-I Receptor Prevent Etoposide-induced Apoptosis. *Cancer Res* 1995; 55:303-6.

⁶³ Zhou J, Dsupin BA, Giudice LC, Bondy CA. Insulin-like Growth Factor System Gene Expression in Human Endometrium during the Menstrual Cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 1723-34.

⁶⁴ Giudice LC, Dsupin BA, Jin IH, Vu TH, Hoffman AR. Differential Expression of Messenger Ribonucleic Acids Encoding Insulin-Like Growth Factors and Their Receptors In Human Uterine Endometrium and Decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76:1115-22.

⁶⁵ Rutanen E, Pekonem F, Mäkinen T. Soluble 34K Binding Protein Inhibits the Binding of Insulin-like Growth Factor I to Its Cell Receptors in Human Secretory Phase Endometrium: Evidence for Autocrine/Paracrine Regulation of Growth Factor Action. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66:173-80.

⁶⁶ Kleiman D, Karas M, Roberts CT, LeRoith D, Phillip M, Segev Y. Modulation of Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I) Receptors and Membrane-Associated IGF-Binding Proteins in Endometrial Cancer Cells by Estradiol. *Endocrinol* 1995; 136: 2531-7.

⁶⁷ Nagamani M, Stuart CA. Specific binding and growth-promoting activity of insulin in endometrial cancer cells in culture. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179:6-12.

- ⁶⁸ Pearl ML, Talavera, Gretz HF, Roberts JA, Menon KM, et al . Mitogenic activity of growth factors in the human endometrial adenocarcinoma cell lines HEC-1A e KLE. *Gynecol Oncol* 1993; 49:325-32.
- ⁶⁹ Bermont L, Lamielle F, Lorchel F, Fauconnet S, Esumi H, Weisz A, et al. Insulin up-regulates vascular endothelial growth factor and stabilizes its messangers in endometrial adenocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:363-368.
- ⁷⁰ Bermont L, Fauconnet S, Lamielle F, Adessi G. Cell-Associated Insulin-like Growth-Factor-Binding Proteins Inhibit Insulin-Like Growth Factor 1-Induced Endometrial Cancer Cell Proliferation. *Cell Mol Biol* 2000; 46:1173-82.
- ⁷¹ Wang H, Wang T, Soong Y. Elevation of insulin-like growth factor binding protein-1 mRNA expression following hormone replacement therapy. *Hum Rep* 2000; 15: 50-4.
- ⁷² Maiorano E, Loverro G, Viale G, Giannini T, Napoli A, Perlino E. Insulin-like growth factor-I expression in normal and disease endometrium. *Int J Cancer* 1999; 80:188-193.
- ⁷³ Giannini S, Maggi M, Cresci B, Finetti L, Bonaccorsi L, Luconi M, et al. Platelet-Activating Factor Enhances Production of Insulin-like Growth Factor Binding Proteins in Human Adenocarcinoma Cell Line (HEC1A). *Gynecol Oncol* 1996; 61:333-40.
- ⁷⁴ Roy R N, Gerulath AH, Cecutti A, Bhavnani BR. Discordant expression of insulin-like growth factors and their receptor messenger ribonucleic acids in endometrial carcinomas relative to normal endometrium. *Mol Cel Endocrinol* 1999; 153:19-27.
- ⁷⁵ Sklar J. Principles of molecular cell biology of cancer: Molecular approaches to cancer diagnosis. In: DeVita Jr, Helmann & Rosenberg AS. JB Lippincott Co. 4th Ed. Philadelphia. 1993:92-1133.
- ⁷⁶ Sivridis E, Giatromanolaki A, Koukourakis M, Anastasiadis P. Endometrial carcinoma: association of steroid hormone receptor expression with low angiogenesis and bcl-2 expression. *Virchow Arch* 2001; 438:470-7.

- ⁷⁷ Fukuda K, Mori M, Uchiyama M, Iwai K, Iwasaka T, Sugimori H. *Gynecol Oncol* 1998; 69:220-5.
- ⁷⁸ Pertschuk LP, Masood S, Simone J, Feldman JG, Fruchter RG, Axiotis CA, et al. Estrogen Receptor Immunocytochemistry in Endometrial Carcinoma: A Prognostic Marker for Survival. *Gynecol Oncol* 1996; 63:28-33.
- ⁷⁹ Kounelis S, Kapranos N, Kouri E, Coppola D, Papadaki. Immunohistochemical Profile of Endometrial Adenocarcinoma: A Study of 61 Cases and Review of Literature. *Mod Pathol* 2000; 13:379-88.
- ⁸⁰ Fanning J, Brown S, Phibbs G, Kramer T, Zaher A. Immunohistochemical evaluations is not prognostic for recurrence in fully stage high-risk endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2002; 12:286-9.
- ⁸¹ Eppler E, Zapf J, Bailer N, Falkmer UG, Falkmer S, Reinecke M. IGF-I in human breast cancer: low differentiation stage is associated with decreased IGF-I content. *Eur J Endocrinol* 2002; 146:813-821.
- ⁸² Elkas J, Gray K, Howard L, Petit N, Pohl J, Armstrong A. The Effects of Tamoxifen on Endometrial Insulin-Like Growth Factor-1 Expression. *Obstet Gynecol* 1998, 91:45-50.
- ⁸³ El-Roeiy A, Chen X, Roberts VJ, LeRoith D, Roberts CT, Yen SC. Expression of Insulin-Like Growth Factor IGF-I Genes and Localization of the Gene Products in the Human Ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 1411-8.

Evaluation of Insulin and Insulin-Like Growth Factor-1 receptors in endometrial carcinoma of obese and non-obese women – a case-control study ¹

Luciana Silveira Campos ^{2,3}

Maria Isabel Albano Edelweiss⁴

Maria Celeste Osório-Wender⁴

Vidal Guerreiro⁵

1) Supported by: Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino do Hospital de Clínicas de Porto Alegre/ Biogen LTDA.

2) Address for correspondence: General Lima e Silva n° 1010/306 Porto Alegre, Brazil CEP 90050-102 e-mail: dlu@terra.com.br

3) This paper was made in order to get master of science degree at Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

4) Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

5) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil

Abstract:

Objective: Uterine body tumors rank fourth in female neoplasia in Brazil. Insulin and Insulin-like Growth Factor I (IGF-I) may be involved in neoplastic transformation. The objective of this paper was to evaluate the association between endometrial carcinoma and insulin, IGF-I, estrogen and progesterone receptor expression by immunohistochemistry. Materials and Methods: Cases were selected among patients that had been diagnosed for endometrial carcinoma from January 1998 to September 2001 and controls were selected from patients that underwent surgery for benign uterine disease at the same time, matched by body mass index and age at Hospital de Clínicas of Porto Alegre. Results: No association was found between IGF-I receptor expression and endometrial carcinoma OR:3.35 (0.71-15.78). Otherwise, there was a significant association between insulin receptor expression and endometrial carcinoma OR:0.15 (0.05-0.42). Conclusion: The lesser number of patients with positive insulin receptor expression in cases may indicate down regulation of receptors. A better comprehension of factors involved in neoplastic transformation could help to develop preventive strategies and/or treatment protocols.

KEYWORDS: endometrial carcinoma, immunohistochemistry, IGF-I, insulin, cancer, menopause.

INTRODUCTION:

Uterine body tumors rank fourth in female neoplasia in Brazil, with an incidence of 12.89 per 100,000 women in 2000 [1]. In 1999, body uterine neoplasia accounted for 2.28% of deaths by cancer in woman in Brazil, as reported by INCA (Instituto Nacional do Cancer, Brazil) [2]. Most patients develop endometrial carcinoma after age of 50 [3,4,5,6] and incidence vary widely around the world [1], probably because of variations in body weight, use of hormonal replacement therapy, reproductive characteristics and endogenous estrogen levels [7].

Epidemiological research has identified several risk factors for endometrial adenocarcinoma. These include age [3,5], early menarche, infertility, nulliparity, obesity [3,4], ovarian dysfunction [8], isolated estrogenic therapy [3,6,9,10,11], late menopause [3,5], *diabetes mellitus* [4,5] and more recently, tamoxifen use [12,13,14].

There is a consensus in literature in relation to the association of obesity and endometrial carcinoma [3,4,5,9,15]. The cut-off point for detection of an increased risk varies in studies, but the risk generally starts to be detected after BMI 28 kg/m² [3,5,6,9,16] and the risk increases with BMI [3,4,16,17]. Although *diabetes mellitus* is an established risk factor for endometrial carcinoma [4,5,9,16], there is some other evidence that the risk disappears when BMI is controlled [6,15].

The insulin-like growth factors (IGFs), their receptors and binding proteins constitute a family of cell modulators that act on growth and development. This family include three related ligands: insulin, IGF-I and IGF-II, three membrane receptors (insulin, IGF-I, IGF-II receptors) [18] and six binding proteins, IGFBP-1-6 [19,20]. Both hiperinsulinemia [21] and high circulating levels of IGF-I [22] may be related to hormone-dependent neoplasias and there is an overexpression of insulin and IGF-I receptors in several tumors [23,24,25,26,27,28].

Women with endometrial carcinoma may have fasting insulin elevated levels and insulin elevated levels after glucose overload [21,29]. High circulating levels of IGF-I may be related to breast carcinoma in tamoxifen users [22]. There is some evidence *in vivo* [28,30] and *in vitro* [31] that IGF system acts in an autocrine/paracrine way in endometrium. Indirect evidence suggest an association among sexual steroids, insulin and IGF-I [30,32,33] in endometrium. Insulin and IGF-I increase mitogenic activity in human endometrial carcinoma cell lines [34,35]. Some studies show an increased expression of IGF-I receptors in endometrial carcinomas compared to controls [27,28], while other studies do not detect differences [36,37]. The objective of this work is to evaluate status of IGF-I, insulin, estrogen and progesterone receptors by immunohistochemistry in endometrial carcinoma patients and compare them with controls.

MATERIALS AND METHODS:

Cases and controls were select from january 1998 to september 2001 at Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Cases and controls could not have used tamoxifen, undergone previous pelvic or abdominal radiotherapy or chemotherapy. Controls could not present endometrial disease. Only patients with weight and height available on hospital charts were included. 40 endometrial carcinomas with histologic confirmation and 80 controls that underwent hysterectomy for benign disease were included. The majority of hysterectomies of controls were done because of uterine leiomyomatosis and genital prolapse

Hospital charts were rewied to collect age, menarche, menopause, parity, weight, height, histological type, hormonal replacement therapy, tobacco use, stage, follow-up and associated disease. Height and weight were obtained in the nurses` preoperative registration.

MATCHING: cases were divided in three levels of BMI – normal (BMI until 25 kg/m²), overweight (IMC from 25.1 to 29.9 kg/m²) and obese (IMC equal or above 30 kg/m²). For each case were selected two controls in the same level of BMI and age as near as possible of case's age.

HISTOLOGY: New hematoxilin-eosin slides were made for diagnostic confirmation. Carcinomas were classified in endometrioid and non-endometrioid, as proposed in literature [38]. Slides were done for each receptor for all patientes: estrogen progesterone, insuline and IGF-I.

IMMUNOHISTOCHEMISTRY

Estrogen and progesterone: The antibodies anti-estrogen receptor (mouse, monoclonal, clone 1D5) and anti-progesterone (monoclonal, mouse, clone PgR 636), Dako, were a gift of Biogen LTDA.

Insulin and IGF-I: The antibodies anti-insulin (policlonal, rabbit, Dako) and anti-IGF-I (monoclonal, mouse, α subunit, Ab-1, Clone 24-31, Neomarkers) were used according to manufacturer specification, adapted to our laboratory resources.

For all antibodies dilution used was 1:50. Negative and positive controls were done for estrogen and progesterone receptor in breast cancer tissue. Positive controls were done for insulin (pancreatic tissue) and for IGF-I receptor (placental tissue).

Slides were heated 60°C for 12 hours and deparafinizaied with xilol and rehydrated in alcohol, distiladed water and PBS. Citrate buffer were added (pH 6,0) and three times heated in a microwave oven 1330W for five minutes. Endogenous peroxidase was blocked with 5% H₂O₂ and the slides were rinsed in distiladed water and PBS. The slides

were incubated with specific antibodies for 1 hour. For secondary antibody we used LSAB kit, Dako laboratory (secondary antibody for 30 minutes, two baths in PBS and streptavidine 30 minutes). For revelation was added diaminobenzine. Counter coloration staining was added with Harris' Hematoxilin.

Positivity criteria: Estrogen and progesterone receptors were considered positive when nuclear staining was visible in more than 10% of constituent tumor cells. Insulin receptors were considered positive when cytoplasmatic staining was visible in more than 10% of constituent tumor cells. IGF-I receptors were considered positive when membrane staining was visible in more than 10% of constituent tumor cells [39,49]. Antibodies stained brown for all receptors.

STATISTICAL ANALYSIS: The statistical evaluation was done by SSP-SS. Quantitative variables were calculated by Student t test. $A < 0,05$ was considered significant. *Odds Ratio* and 95% confidence intervals were calculated for categorical variables

The project was approved by Ethics and Research Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

RESULTS

1. Patients' profile

Table 1: Characteristics of cases and controls

	Cases (40)	Controls (80)	N*
Age	65.37±11.81	55.96±10.95**	120
BMI	29.44±6.26	29.06±5.69	120
Oral Contraception	6 (30%)	34(66,7%)*	71
Diabetes mellitus	5 (12,5%)	7 (8,75%)	120
Tobacco use	7 (18,9%)	15 (19,2%)	115
Menopause	34 (87.2%)	40 (51.3%)*	117
Age of menopause	48.07±4.66	49.82±3.7	117
Previous HRT	5 (16,7%)	12 (20,7%)	88

* total number of patientes with data available for each variable

** p < 0.05

No statistical difference was found between parity in groups. Information about oral contraceptives was available for 71 patients (20 cases and 51 controls) and this difference was significant (30% of cases and 66,7% of controls). There were five diabetic in cases (insulin and non-insulin dependent) and seven in controls and no difference was found in groups. Information about hormonal replacement therapy was available in hospital charts for 88 patients (30 cases e 58 controls). Among patients who were in menopause or in peri-menopause, 16.7% of cases and 20.7% of controls have taken some kind or hormonal replacement therapy without statistical difference. Information about tobacco use was available for 115 patients. 18.9% of cases and 19.2% of controls related current

tobacco use, without statistically significant difference. At time of surgery 15 patients reported some use of hormones. Two patients (controls) were taking progesterone, eight patients (seven controls, one case) were taken combined hormonal replacement therapy and five taking vaginal estrogens (controls).

2. Tumoral Classification

The tumors were classified as endometrioid (36) and non-endometrioid (4) [38].

3. Staging:

38% patients were classified according to FIGO surgical staging [41] and 68.42 % of them presented carcinoma confined to uterus (stage I e II).

4. Receptors expression by immunohistochemistry:

Table 2: Receptors expression in Cases and Controls

Receptors	Cases n=40	Controls n=80	OR*	**CI95%
Estrogen (endometrium)	14 (35.0)	51 (63.8)	0.31	0.14 a 0,68
Estrogen (stroma)	19 (47.5)	50 (62.5)	0.54	0.25 a 1,17
Progesterone (endometrium)	29 (72.5)	61 (76.3)	0.82	0.35 a 1,95
Progesterone (stroma)	31 (77.5)	77 (96.3)	0.13	0.03 a 0,53
Insulin (endometrium)	5 (12.5)	39 (48.8)	0.15	0.05 a 0,42
Insulin (stroma)	-	-	-	-
IGF-I (endometrium)	38 (95.0)	68 (85.0)	3.35	0.71 a 15,78
GFI-I (stroma)	23 (57.5)	58 (72.5)	0.51	0.23 a 1,14

*Odds ratio

** Confidence Interval

The results of receptors evaluation can be seen in Table 2. No association were found between IGF-I and progesterone receptors expression related to carcinoma in endometrium. There was an association between carcinoma and estrogen receptor expression in endometrium and there was a smaller odds of receptor expression in cases (OR: 0.31 IC: 0.14-0.68). There was an association between carcinoma and insulin receptor expression in endometrium in cases and there was a smaller odds of receptor expression in cases (OR:0.15 IC: 0.05-0.42). Estrogen and progesterone receptors were detected in nuclear level, IGF-I receptors were detected in cellular membrane (Fig. 1) and insulin receptors were detected in cytoplasmatic level (Fig. 2).

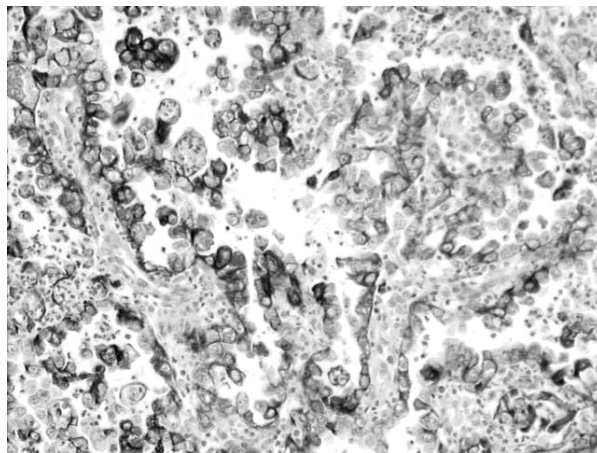


Fig 1. IGF-I receptor expression in endometrial carcinoma

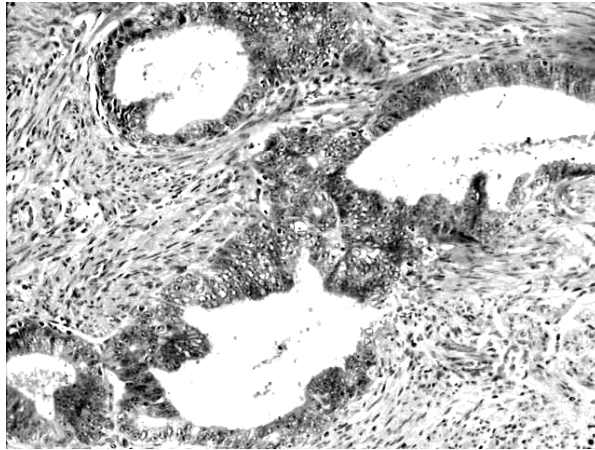


Fig 2. Insulin receptor expression in endometrial carcinoma.

DISCUSSION

The present study compared insulin, IGF-I, estrogen and progesterone receptors expression in patients with endometrial carcinoma with controls with no endometrial disease, matched by BMI and age. The difference in age means was already expected (65.37 ± 11.81 cases, 55.96 ± 10.95 controls) since the great majority of controls underwent hysterectomy for uterine leiomyomatosis, that is a disease of reproductive age [42], while endometrium carcinoma is a disease of postmenopausal age [3,16].

No association was found between IGF-I receptor expression in carcinomas compared to controls in our study and literature presents discordant results [27,28,37,36,43]. Some of studies compare IGF-I receptor expression in patients with endometrial carcinoma and controls detect an increased expression of IGF-I receptor in carcinomas [27,28]. Nagamani, 1991, evaluating insulin and IGF-I receptors by radiolabeled binding sites detected a higher percent of binding in endometrial carcinoma

patients. Nine of 10 cases included in this study were obese and the authors did not reported weight of controls [28]. Talavera in 1990 demonstrated binding sites for IGF-I receptor in normal and neoplastic endometrium with radiolabeled IGF-I. In this study the binding differences were due to an increased of number or receptors, not to a change in receptors affinity. Both undifferentiated and differentiated carcinomas showed an increased expression of receptors when compared to normal controls. Receptors expression in undifferentiated tumors was increased related to differentiated ones [27]. No criteria was described for selecting controls.

Other study compared insulin receptor affinity and tyrosine kinase activity in endometrial carcinoma patients and in normal controls. A insulin affinity for its receptor was similar and there was no difference in receptors concentration ($2.1 \pm 1.34 \text{ fmol } \mu\text{g}^{-1}$ in carcinomas and $3.4 \pm 2.5 \text{ fmol } \mu\text{g}^{-1}$ in controls). Again, no description of specific criteria for selecting control group was found [43]. Study with 30 patients compared IGF-I receptor expression by immunohistochemistry between endometrial carcinoma patients and controls that underwent hysterectomy for benign uterine disease did not detected differences [36]. Study evaluating IGF-I and its receptor by semiquantitative RT-PCR (reverse transcription-polimerase chain reaction) in normal endometrium and endometrial carcinoma, levels of receptors were considered elevated in comparison to IGF-I levels, but no difference was found in receptor expression comparing cases and controls [37].

A study detected increased expression of IGF-I receptors in patients with endometrial carcinoma related to healthy controls and found no difference in circulating IGF-I levels, suggesting that IGF-I could be produced locally and could act in an autocrine/paracrine fashion [28]. Other studies suggest an autocrine or paracrine action of IGF-I system in normal endometrium [33] and in a cyclic fashion [32,33]. Studies evaluating endometrial tissue of patients in reproductive period detected IGF-I e IGF-II and their receptors expression by hybridization techniques. IGF-I mRNA was more abundant in

proliferative phase while IGF-II mRNA was more abundant in secretory phase [32,33]. In the first study IGF-I and II receptors were present in endometrial epithelium and stroma and no cyclic changes were observed [32]. In the second both receptors were more expressed in secretory phase [33]. IGF-I receptor expression and IGFBP-III expression did not vary in menstrual cycle in other study [30]. In *Ishkawa* endometrial cancer cells (cell line originated from well differentiated endometrial carcinoma) estrogen had a synergistic effect with IGF-I in promoting cell growing [44].

Obesity is a main risk factor for endometrial carcinoma [3,6] and the association between hiperinsulinemia and endometrial carcinoma was already described on literature [21,29]. In endometrial cancer cell lines insulin added to culture medium stimulates growing of cells [34,35]. In our study more patients in control group presented insulin receptor expression, in a stastically significant way. One hypothesis is a decrease in number of insulin receptors secondary to effect of elevated peripheral insulin (*down regulation*). Cell number receptors might not be a indicator of magnitude of effect of insulin in cell function. In glucose metabolism just a small percent of receptors are occupied at insulin concentrations that have maximal biological effects, so that a decreased number of receptors might not decrease insulin effect [45] and this phenomena could also happen in cell proliferation.

One limitation of this study was in analysing endometrioid and non-endometrioid carcinomas together, that were suggested to have distinct biological behavior [38,46] and prognosis [47], although the number of non-endometrioid carcinomas in our sample was small (four patients). Another limitation of study was had been including patients that were taking some kind of hormonal therapy. However, a study that included postmenopausal women with abnormal uterine bleeding did not detect variation in IGF-I receptor concentration in comparing biopsies before and after six months of combined hormonal replacement therapy (conjugated equine estrogen 0.625 mg plus medroxiprogesterone

acetate 5 mg) by RT-PCR [48]. In relation to vaginal estrogens, it not seems probably that estrogen use interfered in IGF-I receptor expression.

The disagreement in literature about IGF-I expression receptors can be only related to different techniques used. In Maiorano, IGF-I receptor expression was evaluated just by immunohistochemistry and IGF-I expression was evaluated by immunohistochemistry and Northern Blot and results were conflictive [36]. On the other hand, another study evaluating IGF-I (not the receptor), in breast carcinomas by immunohistochemistry and RIA (radio immune assay) detected concordant results [49]. Differences in histopathological classification, freezing, paraffinization, use of different antibodies, staining protocols, positivity criteria and differences among molecular biology technology, could account for the differences in studies.

It is possible that IGF system binding proteins have a role in endometrial carcinoma [50]. It is believed that IGFBPS modulate the availability of IGF-I competing for its receptor [24]. In normal endometrium IGF-I receptor expression did not vary during menstrual cycle and IGFBP-III expression increased during late secretory phase [30]. Besides, only endometrial cancer cell lines which have IGF-I receptors also secrete IGFBP [24]. Therefore, variation in IGF-I binding may play an important role in endometrial carcinoma proliferation [35]. Exposure to isolated estrogen replacement therapy is an established risk factor for endometrial carcinoma [6,10] and some literature suggest that progesterone could stimulate IGFBP1 secretion, modulating IGF-I action [48], however, some controversy exists [24].

CONCLUSION

In our study an association was found between estrogen receptor expression and insulin receptor expression in cases, with a smaller chance of expression in cases related to controls. No statistical significant association was found between progesterone and IGF-I receptor expression in endometrial carcinomas related to controls. One possible explanation for the increased number of patients positive for insulin receptor expression in controls could be related to down regulation of insulin receptors in carcinomas. Further studies are required for determination of IGF system role endometrial carcinogenesis and for determination of suitable techniques for investigation.

Acknowledgments: Thanks to Pathology Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil, in special to Flavia Giusti, from Research Pathology Laboratory.

REFERENCES

1. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 1.0. IARC CancerBase No. 5. Lyon, IARC Press, 2001. Last updated on 03/02/2001 [cited 2003 May 10]. Limited version available from: URL: <http://www-dep.iarc.fr/globocan/globocan.htm>
2. Instituto Nacional do Câncer. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer: Rio de Janeiro, INCA, 2003.
3. La Vecchia C, Franceschi S, Decarli A, Gallus G, Tognongi G. Risk Factors for Endometrial Cancer at Different Ages. J Natl Cancer Inst 1984; 73: 667-71.

4. Brinton L A, Berman LB, Rodrigue M, Twigss LB, Barret RJ, Wilbanks GD, et al. Reproductive, menstrual, and medical risk factors for endometrial cancer: results from a case-control study. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167:1317-25.
5. Elwood J M, Cole P, Rothman K, Kaplan S. Epidemiology of Endometrial Cancer. *J Natl Cancer Inst* 1977; 59:1055-61.
6. Folsom AR, Kaye AS, Potter JD, Princas RA. Association of Incident Carcinoma of Endometrium with Body Weight and Fat Distribution in Older Women: Findings of Iowa Women's Health Study. *Cancer Research* 1989; 49: 6823-31.
7. Akmedkhanov A, Zeleuniuch-Jacquotte A, Toniolo P. Role of Exogenous and Endogenous Hormones in Endometrial Cancer. Review of the Evidence and Research Perspectives. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 943: 296-315.
8. McDonald, TW, Malkasian GD, Gaffey TA. Endometrial Cancer Associated with Feminizing Ovarian Tumor and Polycystic Ovarian Disease. *Obstet Gynecol* 1977; 49: 654-658.
9. Austin H, Austin JM, Partridge EE, Hatch KD, Shingleton HM. Endometrial Cancer, Obesity and Body Fat Distribution. *Cancer Res* 1991; 51: 568-72.
10. Grady D, Gebretsadik T, Kerlikowske K, Ernster V, Petitti D. Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 1995; 85: 304-313.
11. Farquhar C, Sarkis A, Roberts H, Jepson R, Barlow D. Hormone replacement therapy in postmenopausal women: endometrial hyperplasia and irregular bleeding (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library, Issue 4, 2001*. Oxford: Update Software.
12. Fisher F, Constantino JP, Redmond CK, Fisher ER, Wickerham DL, Cronin WM, et al. Endometrial Cancer in Tamoxifen-Treated Breast Cancer Patients: Findings From the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86:527-37

13. Fisher F, Constantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronim WM, et al. Tamoxifen for Prevention of Breast Cancer: Report of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:1371-88.
14. Bergman L, Beelen MI, Gallee Mp, Hollema H, Berraadt J, van Leeuwen FE. Risk and prognosis of endometrial cancer after for tamoxifen and breast cancer. *Lancet* 2000; 356: 881-87.
15. Shoff SM, Newcomb PA. Diabetes, Body Size, and Risk of Endometrial Cancer. *Am J Epidemiol* 1998; 148: 234-40.
16. Potischman N, Hoover RN, Brinton LA, Siiteri P, Dorgan JF, Swanson CA, et al. Case-Control Study of Endometrial Cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1127-35.
17. Parazzini F, La Vecchia C, Negri E, Riboldi GL, Surace M, Benzi G, et al. Diabetes and Endometrial Cancer: an Italian Case-Control Study. *Int J Cancer* 1999; 81:539-42.
18. LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT. Molecular and Cellular Aspects of the Insulin-Like Growth Factor I Receptor. *Endocr Rev* 1995; 16:143-63.
19. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld R. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 1999; 20:761-87.
20. Murphy LJ. Insulin-like growth factor-binding proteins: functional diversity or redundancy? *J Mol Endocrinol* 1998; 23:97-107.
21. Nagamani M, Hannigan EV, Dinh TV, Stuart CA. Hyperinsulinemia and Stromal Luteinization of the Ovaries in Postmenopausal Women with Endometrial Cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67:144-8.
22. Haskinson SE, Willet WC, Colditz, Hunter DJ, Michaud DS, Derco B, et al. Circulating concentrations of insulin-like growth-factor I and risk of breast cancer. *Lancet* 1998; 351: 1393-96.
23. Kellerer M, Corleta HvE, Mühlhöfer A, Capp E, Mosthaf L, Bock S, et al. Insulin and insulin-like growth factor-I receptor tyrosine – kinase activities in human renal carcinoma.

Int J Cancer 1995; 62:501-7.

24. Pekonem F, Nyman T, Rutament EM. Human endometrial adenocarcinoma cell lines HEC-1B e KLE secrete insulin-like growth factor binding protein-1 and contain IGF-I receptors. Mol Cell Endocrinol 1991; 75: 81-7.

25. Hamelers IH, Schaik RF, Teefelen HA, Sussenbach JS, Steenbergh PH. Synergistic Proliferative Action of Insulin-like Growth Factor I and 17 β -estradiol in MCF-7S Breast Tumor Cells. Exp Cel Res 2002; 273:107-17.

26. Corletta HE, Capp E, Corletta OC. Insulin receptor tyrosine kinase activity in colon carcinoma. Braz J Med Biol Res 1996; 29:1593 – 7.

27. Talavera F, Reynolds RK, Roberts JA, Menon MJ. Insulin-Like Growth Factor I Receptors in Normal and Neoplastic Endometrium. Cancer Res 1990; 50:3019-24.

28. Nagamani M, Stuart CA, Dunhardt PA, Doherty MG. Specific binding sites for insulin and insulin-like growth factor I in human endometrial cancer. Am J Obstet Gynecol 1991; 165:1865-71.

29. Rutanen E, Stenman S, Blum W, Kärkkäinen T, Lehtovirta P, Stenman U. Relationship between Carbohydrate Metabolism and Serum Insulin-like Growth Factor System in Postmenopausal Women: Comparison of Endometrial Cancer Patients with Healthy Controls. J Clin Endocrinol Metab 1993; 77:199-204.

30. Rutanen E, Pekonem F, Mäkinen T. Soluble 34K Binding Protein Inhibits the Binding of Insulin-like Growth Factor I to Its Cell Receptors in Human Secretory Phase Endometrium: Evidence for Autocrine /Paracrine Regulation of Growth Factor Action. J Clin Endocrinol Metab 1988; 66:173-80.

31. Reynolds RK, Hu C, Baker VV. Transforming Growth Factor α and Insulin-like Growth Factor-I, but not Epidermal Growth Factor, Elicit Autocrine Stimulation of Mitogenesis in Endometrial Cancer Cell Lines. Gynecol Oncol 1998; 70:202-9.

32. Zhou J, Dsupin BA, Giudice LC, Bondy CA. Insulin-like Growth Factor System Gene Expression in Human Endometrium during the Menstrual Cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 1723-34.
33. Giudice LC, Dsupin BA, Jin IH, Vu TH, Hoffman AR. Differential Expression of Messenger Ribonucleic Acids Encoding Insulin-Like Growth Factors and Their Receptors In Human Uterine Endometrium and Decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76:1115-22.
34. Nagamani M, Stuart CA. Specific binding and growth-promoting activity of insulin in endometrial cancer cells in culture. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179:6-12.
35. Pearl ML, Talavera F, Gretz HF, Roberts JA, Menon KM. Mitogenic activity of growth factors in the human endometrial adenocarcinoma cell lines HEC-1A e KLE. *Gynecol Oncol* 1993; 49:325-32.
36. Maiorano E, Loverrro G, Viale G, Giannini T, Napoli A, Perlino E. Insulin-like growth factor-I expression in normal and diseased endometrium. *Int J Cancer* 1999; 80:188-193.
37. Roy RN, Gerulath AH, Cecutti A, Bhavnani BR. Discordant expression of insulin-like growth factors and their receptor messenger ribonucleic acids in endometrial carcinomas relative to normal endometrium. *Mol Cel Endocrinol* 1999; 153:19-27.
38. Sherman ME. Theories of Endometrial Carcinogenesis: a Multidisciplinary Approach. *Mod Pathol* 2000; 13: 295-308.
39. Fukuda K, Mori M, Uchiyama M, Iwai K, Iwasaka T, Sugimori H. *Gynecol Oncol* 1998; 69:220-5.
40. Pertschuk LP, Masood S, Simone J, Feldman JG, Fruchter RG, Axiotis CA, et al. Estrogen Receptor Immunocytochemistry in Endometrial Carcinoma: A Prognostic Marker for Survival. *Gynecol Oncol* 1996; 63:28-33.
41. Benedet JL, Bender H, Jones H 3rd, Ngan HYS, Pecorelli S. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *Int J Gyncol Obstet* 2000; 70:209-62.

42. Chaves EC, Corletta HE, Capp E, Toscani G. Miomatose uterina – o papel do IGF-I e seu receptor. *Femina* 2002; 30:255-259.
43. Capp E, Brandelli A, Monego H, Ribeiro MF, Freitas MS, Pureur R, *et al.* Binding and tyrosine kinase activity of insulin receptor in human normal and neoplastic endometrium. *Med Sci Res* 1996; 24:621- 3.
44. Kleiman D, Karas M, Roberts CT, LeRoith D, Phillip M, Segev Y. Modulation of Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I) Receptors and Membrane-Associated IGF-Binding Proteins in Endometrial Cancer Cells by Estradiol. *Endocrinol* 1995; 136: 2531-7.
45. Kono T, Barham F. The Relationship between the Insulin-binding Capacity of Fat Cells and the Cellular Response to Insulin. *J Biol Chem* 1971; 426:6210-6.
46. Basil JD, Goodfellow PJ, Rader J, Muntch DG, Herzog TJ. Clinical Significance of Microsatellite Instability in Endometrial Carcinoma. *Cancer* 2000; 89:1758-64.
47. Westhoff C, Heller D, Drosinos S, Tancer L. Risk factors for hyperplasia-associated versus atrophy-associated endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182:506-8,
48. Wang H, Wang T, Soong Y. Elevation of insulin-like growth factor binding protein-1 mRNA expression following hormone replacement therapy. *Hum Rep* 2000; 15: 50-4.
49. Eppler E, Zapf J, Bailer N, Falkmer UG, Falkmer S, Reinecke M. IGF-I in human breast cancer: low differentiation stage is associated with decreased IGF-I content. *Eur J Endocrinol* 2002; 146:813-821.
50. Bermont L, Fauconnet S, Lamielle F, Adessi G. Cell-Associated Insulin-like Growth-Factor-Binding Proteins Inhibit Insulin-Like Growth Factor1-Induced Endometrial Cancer Cell Proliferation. *Cell Mol Biol* 2000; 46:1173-82.

6. VERSÃO DO ARTIGO EM PORTUGUÊS

AVALIAÇÃO DOS RECEPTORES DE INSULINA E INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-1 NO CARCINOMA DE ENDOMÉTRIO EM PACIENTES OBESAS E NÃO OBESAS – UM ESTUDO DE CASO-CONTROLE¹

Luciana Silveira Campos²

Maria Isabel Edelweiss³

Maria Celeste Wender³

6) Agentes Financeiros: Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre/ Biogen LTDA.

7) Endereço para correspondência: Rua General Lima e Silva nº 1010/306 Porto Alegre/RS - CEP 90050-102 , e-mail: dlu@terra.com.br

8) Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Resumo: Os tumores do corpo uterino ocupam a quarta posição entre as neoplasias diagnosticadas na mulher no Brasil. A insulina e o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-I) podem estar envolvidos na transformação neoplásica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a associação entre carcinoma de endométrio e a expressão dos receptores de insulina, IGF-I, estrogênio e progesterona por imunohistoquímica. Os casos foram selecionados entre as pacientes com diagnóstico histologicamente confirmado de carcinoma endometrial no Hospital de Clínicas de Porto Alegre entre janeiro de 1998 a setembro de 2001 e os controles foram selecionados entre as cirurgias por doença benigna uterina do mesmo período, pareados por índice de

massa corporal e idade. Não houve associação entre expressão dos receptores de IGF-I e carcinoma de endométrio OR:3,35 (0,71 a 15,78). Por outro lado houve uma associação significativa entre a expressão do receptor de insulina e o carcinoma endometrial OR:0,15 (0,05 a 0,42). O menor número de pacientes com positividade para os receptores de insulina nos casos pode indicar *down regulation* dos receptores de insulina. Uma melhor compreensão dos fatores envolvidos na transformação neoplásica poderia contribuir para o estabelecimento de estratégias preventivas e/ou protocolos de tratamento.

INTRODUÇÃO:

Os tumores de corpo uterino ocupam a quarta posição entre todas as neoplasias diagnosticadas na mulher no Brasil, com uma incidência de 12,89 por 100.000 mulheres em 2000 [1]. Em 1999, os tumores de corpo uterino corresponderam a 2,28% dos óbitos por câncer em mulheres no Brasil, segundo o INCA (Instituto Nacional do Câncer) [2]. A maioria das pacientes desenvolvem o carcinoma de endométrio a partir dos 50 anos [3,4,5,6] e a incidência varia amplamente nos vários países [1], possivelmente em função das variações de peso corporal, uso de terapia de reposição hormonal, características reprodutivas e níveis de estrogênios endógenos circulantes [7].

Estudos epidemiológicos identificaram vários fatores de risco para adenocarcinoma de endométrio. Eles incluem idade [3,5], menarca precoce, infertilidade, nuliparidade, obesidade [3,4], disfunções ovarianas [8], terapia de reposição hormonal estrogênica isolada [3,6,9,10,11], menopausa tardia [3,5], *diabetes mellitus* [4,5] e mais recentemente, o uso de tamoxifeno [12,13,14].

Existe consenso na literatura quanto a associação entre obesidade e o carcinoma de endométrio [3,4,5,9,15]. O ponto de corte a partir do qual o aumento no risco começa a

ser detectado varia, mas os estudos geralmente detectam o risco com índice de massa corporal a partir de 28 kg/m² [3,5,6,9,16] e o risco aumenta com o aumento do índice de massa corporal [3,4,16,17]. Embora o *diabetes mellitus* seja classicamente descrito como fator de risco para carcinoma de endométrio [4,5,9,16], existem estudos demonstrando o desaparecimento desse risco quando se controla o índice de massa corporal [6,15].

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), seus receptores e proteínas ligantes constituem uma família de moduladores que atuam no crescimento e desenvolvimento da célula. A família IGF consiste de três peptídeos; insulina, IGF-I e IGF-II, três receptores de membrana celular (os receptores de insulina, IGF-I, IGF-II) [18] e seis proteínas ligantes, IGFBP-1-6 [19,20]. Tanto a hiperinsulinemia [21] quanto altos níveis séricos de IGF-I [22] podem estar associados às neoplasias hormônio-dependentes, havendo uma maior expressão dos receptores de insulina e IGF-I em vários tumores [23,24,25,26,27,28].

Mulheres com carcinoma de endométrio têm níveis elevados de insulina em jejum e após ingestão de glicose [21,29] e níveis elevados de IGF-I podem estar associados a carcinoma de mama em usuárias de tamoxifeno [22]. Existem evidências *in vivo* [28,30] e *in vitro* [31] que o sistema IGF aja de maneira autócrina/parácrina no endométrio. Evidências indiretas demonstram a associação entre os esteróides sexuais, a insulina e o IGF-I [30,32,33] no endométrio. Tanto a insulina como o IGF-I aumentam substancialmente a atividade mitogênica nas linhagens de adenocarcinoma endometrial humano [34,35]. Alguns estudos demonstram uma maior expressão dos receptores de IGF-I em carcinomas endometriais em comparação a controles [27,28], enquanto outros estudos não detectam diferença de expressão entre os grupos [36,37]. O objetivo deste trabalho é avaliar o status dos receptores de IGF-I, insulina, estrogênio e progesterona pela técnica de imuno-histoquímica em pacientes portadoras de carcinoma de endométrio e compará-las com controles.

PACIENTES E MÉTODOS:

Casos e controles foram selecionados no período entre janeiro de 1998 a setembro de 2001 no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Tanto os casos quanto controles não poderiam ter realizado radioterapia abdominal ou pélvica, quimioterapia prévia ou fazer uso de tamoxifeno. Os controles não poderiam apresentar patologias endometriais. Foram incluídas apenas as pacientes em que peso e altura estavam disponíveis no prontuário. Ao todo foram incluídos 40 casos de carcinomas de endométrio histologicamente confirmados e como controles 80 pacientes que foram à histerectomia por doença benigna uterina. A maior parte das histerectomias dos controles foram indicadas por miomatose uterina e prolapso genital.

Os prontuários foram revisados a fim de se obter os seguintes dados: idade, menarca, menopausa, número de filhos, peso, altura, tipo histológico, terapia de reposição hormonal, tabagismo, estágio, seguimento e patologias associadas. Peso e altura foram obtidos a partir dos registros de enfermagem no período pré-operatório.

PAREAMENTO: os casos foram divididos em três faixas de IMC (índice de massa corporal); normal (IMC até 25 kg/m²), sobrepeso (IMC entre 25 a 29,9 kg/m²) e obesas (IMC igual ou acima de 30 kg/m²). Para cada caso foram escolhidos dois controles na mesma faixa de IMC e com idade mais próxima possível dos casos.

HISTOLOGIA: Foram realizados novas lâminas, coradas com hematoxilina-eosina para confirmação diagnóstica. Os carcinomas foram classificados em endometrióides e não endometrióides, conforme proposto na literatura [38]. Foram confeccionadas novas lâminas, uma para cada receptor: estrogênio, progesterona, insulina e IGF-I.

IMUNO-HISTOQUÍMICA: Estrogênio e progesterona: Os anticorpos anti-receptor de estrogênio (anticorpo monoclonal de camundongo, clone 1D5) e progesterona (anticorpo monoclonal de camundongo, clone PgR 636) do laboratório Dako foram cortesia da importadora Biogen LTDA.

Insulina e IGF-I: Os anticorpos anti-insulina (anticorpo policlonal de coelho, laboratório Dako) e anti-IGF-I (anticorpo monoclonal de camundongo, subunidade α , Ab-1, Clone 24-31, laboratório Neomarkers) foram utilizados de acordo com a especificação do fabricante, adaptados para a infra-estrutura do nosso laboratório.

Para todos os anticorpos foi utilizada a diluição de 1:50. Foram realizados controles positivos e negativos com carcinoma de mama para receptor de estrogênio e progesterona. Para IGF-I foi realizado o controle positivo em placenta e para insulina foi realizado controle positivo em tecido pancreático.

Para todos os anticorpos foi realizada a seguinte técnica: as lâminas foram aquecidas a 60°C por 12 horas. Foram desparafinadas em xilol e hidratadas em álcool, água destilada e PBS (solução tampão fosfato). Foi adicionado tampão citrato (pH 6,0) e foi realizada irradiação por microondas a 1330W de potência 3 vezes por cinco minutos. O bloqueio da atividade de peroxidase endógena foi realizado com uma solução a 5% de peróxido de hidrogênio em água destilada e após as lâminas foram lavadas em água destilada e PBS. Foram adicionados os anticorpos específicos diluídos em PBS e as lâminas foram deixadas em câmara úmida e escura por 1h em temperatura ambiente. Para o anticorpo secundário foi utilizado o kit LSAB do laboratório Dako (anticorpo secundário por 30 minutos, dois banhos em PBS e estreptavidina 30 minutos) e para a revelação foi adicionado o diaminobenzina. A contra-coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris.

Foram estabelecidos os seguintes critérios de positividade: receptores de

estrogênio e progesterona foram considerados positivos quando o núcleo estava corado em 10% ou mais das células epiteliais. Receptores de insulina foram considerados positivos quando o citoplasma da célula estava homoganeamente corado em 10% das células ou mais e os receptores de IGF-I quando ocorria coloração da membrana celular em 10% ou mais das células [39,40]. Para todos os receptores foi observada uma coloração marrom dos anticorpos.

ANÁLISE DOS DADOS: A análise dos dados foi realizada pelo programa SSP-SS. Para variáveis quantitativas foi realizado o teste t. Um valor P menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. As variáveis categóricas foram estimadas com Razão de Chances e intervalos de confiança.

CONSIDERAÇÕES ÉTICAS: O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

RESULTADOS

4. Perfil das pacientes:

Algumas características clínicas das pacientes estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Perfil das pacientes (N=120)

	Casos (40)	Controles (80)	N*
Idade	65,37±11,81	55,96±10,95**	120
IMC	29,44±6,26	29,06±5,69	120
Contraceptivo oral	6 (30%)	34 (66,7%)*	71
Diabetes mellitus	5 (12,5%)	7 (8,75%)	120
Tabagismo	7 (18,9%)	15 (19,2%)	115
Menopausa	34 (87,2%)	40 (51,3%)*	117
Idade da menopausa	48,07±4,66	49,82±3,7	117
TRH prévia***	5 (16,7%)	12 (20,7%)	88

* número de pacientes com dados disponíveis para cada variável

**p < 0,05

*** terapia de reposição hormonal

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a paridade das pacientes nos dois grupos. A informação sobre uso de anticoncepcional oral prévio estava disponível para 71 pacientes (20 casos e 51 controles) e essa diferença foi estatisticamente significativa (30% dos casos e 66,7% dos controles). Havia cinco diabéticas (contabilizando *diabetes mellitus* insulino-dependente e não insulino-dependente) entre os casos e sete entre os controles e a diferença não foi estatisticamente significativa entre os grupos. A informação sobre terapia de reposição hormonal prévia estava disponível nos prontuários para 88 pacientes (30 casos e 58 controles). Entre as pacientes que estavam na menopausa ou na peri-menopausa 16,7% dos casos e 20,7% dos controles utilizaram algum tipo de terapia de reposição hormonal anteriormente à cirurgia, sem diferença estatisticamente significativa. Na data da cirurgia 15 pacientes dos dois grupos relataram alguma forma de hormonioterapia. Duas pacientes (controles) estavam em uso de progestogênio, oito pacientes (sete controles, um caso) estavam em uso de terapia de reposição hormonal combinada e cinco pacientes estavam em uso de creme vaginal à base de estrogênios (controles). A informação sobre tabagismo estava disponível para 115 pacientes: 18,9% dos casos e 19,2% dos controles relataram tabagismo atual, sem diferença estatisticamente significativa.

5. Tipos tumorais:

Os tumores foram classificados em endometrióides e não endometrióides, correspondendo a 36 carcinomas endometrióides e 4 não-endometrióides [38].

6. Estádio:

Trinta e oito pacientes foram estadiadas conforme o estágio cirúrgico da FIGO [41] e 68,42 % apresentavam doença restrita ao útero (estádios I e II).

7. Expressão imuno-histoquímica dos fatores em estudo:

Tabela 2: Expressão dos receptores em Casos e Controles

Variável	Casos* (n=40)	Controles* (n=80)	RC**	IC95%***
Receptor de estrogênio (endométrio)	14 (35,0)	51 (63,8)	0,31	0,14 a 0,68
Receptor de estrogênio (estroma)	19 (47,5)	50 (62,5)	0,54	0,25 a 1,17
Receptor de progesterona (endométrio)	29 (72,5)	61 (76,3)	0,82	0,35 a 1,95
Receptor de progesterona (estroma)	31 (77,5)	77 (96,3)	0,13	0,03 a 0,53
Receptor de insulina (endométrio)	5 (12,5)	39 (48,8)	0,15	0,05 a 0,42
Receptor de insulina (estroma)	-	-	-	-
Receptor de IGF-I (endométrio)	38 (95,0)	68 (85,0)	3,35	0,71 a 15,78
Receptor de IGFI-I (estroma)	23 (57,5)	58 (72,5)	0,51	0,23 a 1,14

* valores absolutos e percentuais

** Razão de chances

*** Intervalo de confiança

Os resultados da avaliação dos receptores podem ser vistos na Tabela 2. Não houve uma associação entre expressão dos receptores IGF-I e progesterona no endométrio e os carcinomas. Houve uma associação entre carcinoma e a expressão do receptor de estrogênio no endométrio, havendo uma menor chance da expressão do receptor nos casos (RC: 0,31 IC: 0,14-0,68). Houve uma associação entre carcinomas e a expressão do receptor de insulina no endométrio, havendo uma menor chance da expressão do receptor nos casos (RC:0,15 IC: 0,05-0,42). O receptor de IGF-I foi

detectado em nível de membrana celular (Fig 1-2) e o de insulina foi detectado no citoplasma (Fig 3-4).

DISCUSSÃO

Este estudo comparou a expressão dos receptores de insulina, IGF-I, estrogênio e progesterona em pacientes com carcinoma de endométrio com controles sem doença endometrial, pareadas por IMC e idade. A diferença estatisticamente significativa nas médias de idade entre casos ($65,37 \pm 11,81$) e controles ($55,96 \pm 10,95$) era de certa forma esperada já que a maioria das pacientes incluídas nos controles foi à histerectomia por miomatose uterina, que é uma doença típica da idade reprodutiva [42], enquanto a maior parte dos carcinomas de endométrio acontece na pós-menopausa [3,16].

Não foi detectado um aumento na expressão dos receptores de IGF-I nos carcinomas em comparação aos controles neste estudo. A literatura tem dados conflitantes [27,28,37,36,43]. Existem alguns estudos comparando a expressão do receptor de IGF-I em pacientes com carcinoma de endométrio e controles, alguns deles detectando uma maior expressão do receptor de IGF-I em carcinomas [27,28]. Nagamani, 1991, avaliando receptores de insulina e IGF-I por estudos de ligação com insulina e IGF-I radiomarcados, observou um maior percentual de ligação para IGF-I nas pacientes com carcinoma. Nesse estudo, das 10 pacientes incluídas, nove eram obesas, mas os autores não relataram o peso dos controles [28]. Talavera em 1990 demonstrou sítios de ligação para o receptor de IGF-I em endométrio normal e neoplásico com IGF-I radiomarcado. Nesse estudo as diferenças de ligação entre endométrios normais e neoplásicos foram devidas a um aumento no número de receptores e não devido a uma mudança na

afinidade destes. Tanto os carcinomas indiferenciados quanto os diferenciados mostraram uma expressão maior de receptores quando comparados com os controles normais e a expressão dos receptores nos tumores indiferenciados foi maior que nos tumores diferenciados [27]. Não foi descrito o critério para a escolha dos controles.

Outro estudo comparou afinidade do receptor de insulina e atividade tirosina-quinase no endométrio entre pacientes portadoras de carcinoma endometrial e controles normais. A afinidade da insulina pelo seu receptor foi similar e não houve diferença estatisticamente significativa nas concentrações de receptores ($2,1 \pm 1,34 \text{ fmol } \mu\text{g}^{-1}$ nos carcinomas e $3,4 \pm 2,5 \text{ fmol } \mu\text{g}^{-1}$ nos controles). Novamente não há descrição de critérios para a seleção de grupo controle [43]. Estudo de 30 pacientes comparando a expressão do receptor de IGF-I entre pacientes com carcinoma de endométrio e pacientes que foram hysterectomizadas por doença benigna, por imuno-histoquímica, não detectou diferença estatisticamente significativa entre os grupos [36]. Em um estudo avaliando a expressão de IGF-I e seu receptor por RT-PCR (*reverse-transcription-polymerase chain reaction*) semiquantitativa em endométrios normais e carcinomas endometriais, os níveis dos receptores nos carcinomas foram considerados altos em comparação aos níveis de IGF-I, mas não houve diferença na expressão do receptor de IGF-I entre casos e controles [37].

Outro estudo detectou uma maior expressão de receptores de IGF-I no endométrio em pacientes portadoras de carcinoma de endométrio em comparação a controles saudáveis, não encontrando uma diferença entre os grupos no IGF-I sérico, sugerindo que IGF-I possa ser produzido localmente no tecido e aja de maneira autócrina ou parácrina [28]. Existem outros estudos sugerindo uma ação autócrina ou parácrina do sistema IGF no endométrio em endométrios normais [33] e de maneira cíclica [32,33]. Estudos avaliando tecido endometrial de pacientes no menacme avaliaram a expressão de IGF-I e IGF-II e seus receptores por técnicas de hibridização. O mRNA de IGF-I foi

mais abundante na fase proliferativa enquanto o mRNA de IGF-II era mais abundante na fase secretora [32,33]. No primeiro os receptores de IGF-I e II estavam presentes tanto no epitélio quanto no estroma endometrial e não houve mudanças cíclicas em ambos [32]. No segundo estudo os receptores estavam expressos mais abundantemente na fase secretora [33]. Um outro estudo comparando a expressão do receptor de IGF-I e de IGBP-III nas fases do ciclo menstrual, detectou a expressão de IGFBP-III apenas na fase secretora e a expressão do receptor não variou ao longo do ciclo [30]. Em cultura de células de *Ishkawa* (linhagem celular originária de carcinoma bem diferenciado de endométrio) o estrogênio teve uma ação sinérgica com o IGF-I promovendo a multiplicação celular [44].

A obesidade é considerada um dos principais fatores de risco para o carcinoma endometrial [3,6] e a associação entre hiperinsulinemia e carcinoma endometrial já foi documentada na literatura [21,29]. Em linhagens celulares de carcinoma endometrial a insulina adicionada ao meio de cultura estimula o crescimento das colônias [34,35]. No nosso estudo um maior número de controles apresentou receptores positivos para insulina, de maneira estatisticamente significativa. Uma hipótese para explicar esse achado seria a diminuição dos receptores que pode ocorrer em função do estímulo crônico pela insulina (*down regulation*). O número de receptores por si só não seria um indicativo da magnitude da influência da insulina nos processos celulares. No metabolismo da glicose apenas um pequeno percentual dos receptores está ocupado em altas concentrações de insulina, exercendo um efeito biológico máximo [45]. Por isso, uma diminuição dos receptores provavelmente não diminuiria o efeito da insulina e esse fenômeno também poderia ocorrer na proliferação celular.

Uma das limitações deste estudo foi analisar conjuntamente os carcinomas endometrióides e não endometrióides, que a literatura sugere como tendo mecanismos biológicos [38,46] e comportamentos prognósticos distintos [47], embora o número de

carcinomas não-endometrióides incluído na amostra tenha sido pequeno (quatro pacientes). Outra limitação do estudo foi termos incluído 15 pacientes que estavam recebendo alguma forma de hormonioterapia. Entretanto, um estudo incluindo mulheres pós-menopáusicas com sangramento uterino anormal, não detectou variação nas concentrações do receptor de IGF-I comparando biópsias endometriais antes e após 6 meses após o uso de terapia de reposição hormonal combinada (estrogênios conjugados 0,625mg e acetato de medroxiprogesterona 5mg) por RT-PCR [48]. Parece pouco provável que o uso de estrogênio tópico possa ter interferido na expressão dos receptores de IGF-I.

A controvérsia entre os resultados na literatura para os receptores de IGF-I pode se dever apenas às diferentes técnicas utilizadas. Em Maiorano, os receptores de IGF-I foram avaliados apenas por imuno-histoquímica e o IGF-I foi avaliado por imuno-histoquímica e por *Northern Blot*, sendo os resultados discrepantes [36]. Por outro lado, outro estudo avaliando apenas IGF-I em carcinomas de mama por imuno-histoquímica e RIA (radioimunoensaio) demonstrou uma similaridade nos resultados [49]. Diferenças na classificação histopatológica, congelamento, parafinização, uso de diferentes anticorpos, protocolos de coloração, critérios para positividade e diferenças entre as técnicas de biologia molecular podem ser responsáveis pelas diferenças entre os estudos.

É possível que as proteínas ligantes do sistema IGF tenham influência na gênese do carcinoma de endométrio [50]. Acredita-se que as IGFbps modulem a disponibilidade do IGF-I competindo pelo seu receptor [24]. Em estudo avaliando endométrios normais a expressão do receptor de IGF-I não variou ao longo do ciclo enquanto que os níveis de IGFbp-III aumentam durante a fase secretora tardia [30]. Em estudo em linhagens de carcinoma endometrial, apenas as linhagens que continham receptores para IGF-I, secretavam IGFbps [24]. Por isso, a variação na ligação do IGF-I pode desempenhar um papel importante na proliferação do carcinoma endometrial [35]. A exposição à terapia de

reposição hormonal com estrogênio isoladamente é um fator de risco bem estabelecido para o carcinoma de endométrio [6,10] e existem trabalhos que sugerem que a presença de progesterona estimularia a secreção de IGFBP-1, modulando a ação do IGF-I [48], embora os resultados sejam controversos [24].

CONCLUSÕES

No nosso estudo houve associação entre a expressão dos receptores de estrogênio e insulina nos casos, com uma chance de expressão menor neles em relação aos controles. Não houve associação estatisticamente significativa entre os receptores de progesterona e IGF-I com carcinoma endometrial em comparação aos controles. Uma possível explicação para o maior número de pacientes entre os controles com positividade para o receptor de insulina poderia se relacionar a *down regulation* do receptor de insulina nos carcinomas. Mais estudos são necessários para o esclarecimento do papel do sistema IGF na carcinogênese endometrial e para o estabelecimento das técnicas mais acuradas para a sua investigação.

BIBLIOGRAFIA

1. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. GLOBOCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 1.0. IARC CancerBase No. 5. Lyon, IARC Press, 2001. Last updated on 03/02/2001 [cited 2003 May 10]. Limited version available from: URL: <http://www-dep.iarc.fr/globocan/globocan.htm>
2. Instituto Nacional do Câncer. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer: Rio de Janeiro, INCA, 2003.
3. La Vecchia C, Franceschi S, Decarli A, Gallus G, Tognongi G. Risk Factors for Endometrial Cancer at Different Ages. *J Natl Cancer Inst* 1984; 73(3): 667-71.
4. Brinton LA, Berman LB, Rodrigue M, Twiggs LB, Barret RJ, Wilbanks GD et al. Reproductive, menstrual, and medical risk factors for endometrial cancer: results from a case-control study. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167:1317-25.
5. Elwood JM, Cole P, Rothman K, Kaplan S. Epidemiology of Endometrial Cancer. *J Natl Cancer Inst* 1977; 59:1055-61.
6. Folsom AR, Kaye AS, Potter JD, Princas RA. Association of Incident Carcinoma of Endometrium with Body Weight and Fat Distribution in Older Woman: Findings of Iowa Woman's Health Study. *Cancer Res* 1989; 49: 6823-31.
7. Akmedkhanov A, Zeleuniuch-Jacquotte A, Toniolo P. Role of Exogenous and Endogenous Hormones in Endometrial Cancer. Review of the Evidence and Research Perspectives. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 943: 296-315.
8. McDonald, TW, Malkasian GD, Gaffey TA. Endometrial Cancer Associated with Feminizing Ovarian Tumor and Polycystic Ovarian Disease. *Obstet Gynecol* 1977; 49: 654-658.
9. Austin H, Austin JM, Partridge EE, Hatch KD, Shingleton HM. Endometrial Cancer, Obesity and Body Fat Distribution. *Cancer Res* 1991; 51: 568-72.

10. Grady D, Gebretsadik T, Kerlikowske K, Ernster V, Petitti D. Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: a meta-analysis *Obstet Gynecol* 1995; 85: 304-313.
11. Farquhar C, Sarkis A, Roberts H, Jepson R, Barlow D. Hormone replacement therapy in postmenopausal women: endometrial hyperplasia and irregular bleeding (Cochrane Review). In: *The Cochrane Library*, Issue 4, 2001. Oxford: Update Software.
12. Fisher F, Constantino JP, Redmond CK, Fisher ER, Wickerham DL, Cronim WM, et al. Endometrial Cancer in Tamoxifen-Treated Breast Cancer Patients: Findings From the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B 14. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86:527-37.
13. Fisher F, Constantino JP, Wickerham DL, Redmond CK, Kavanah M, Cronim WM, et al. Tamoxifen for Prevention of Breast Cancer: Report of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P 1. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90(18):1371-88.
14. Bergman L, Beelen MI, Gallee MP, Hollema H, Berraadt J, van Leeuwen FE. Risk and prognosis of endometrial cancer after for tamoxifen and breast cancer. *Lancet* 2000; 356: 881-87.
15. Shoff SM, Newcomb PA. Diabetes, Body Size and Risk of Endometrial Cancer. *Am J Epidemiol* 1998; 148: 234-40.
16. Potischman N, Hoover RN, Brinton LA, Siiteri P, Dorgan JF, Swanson CA, et al. Case-Control Study of Endometrial Cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 1127-35.
17. Parazzini F, La Vecchia C, Negri E, Riboldi GL, Surace M, Benzi G, et al. Diabetes and Endometrial Cancer: an Italian Case-Control Study. *Int J Cancer* 1999; 81:539-42.
18. LeRoith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT. Molecular and Cellular Aspects of the Insulin-Like Growth Factor I Receptor. *Endocr Rev* 1995; 16:143-63.
19. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld R. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 1999; 20:761-87.

20. Murphy LJ. Insulin-like growth factor-binding proteins: functional diversity or redundancy? *J Mol Endocrinol* 1998; 23:97-107.
21. Nagamani M, Hannigan EV, Dinh TV, Stuart CA. Hyperinsulinemia and Stromal Luteinization of the Ovaries in Postmenopausal Women with Endometrial Cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67:144-8.
22. Haskinson SE, Willet WC, Colditz, Hunter DJ, Michaud DS, Derco B, et al. Circulating concentrations of insulin-like growth-factor I and risk of breast cancer. *Lancet* 1998; 351: 1393-96.
23. Kellerer M, Corleta HvE, Mühlhöfer A, Capp E, Mosthaf L, Bock S, et al. Insulin and insulin-like growth factor-I receptor tyrosine – kinase activities in human renal carcinoma. *Int J Cancer* 1995; 62:501-7.
24. Pekonem F, Nyman T, Rutament EM. Human endometrial adenocarcinoma cell lines HEC-1B e KLE secrete insulin-like growth factor binding protein-1 and contain IGF-I receptors. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 75: 81-7.
25. Hamelers IH, Schaik RF, Teefelen HA, Sussenbach JS, Steenbergh PH. Synergistic Proliferative Action of Insulin-like Growth Factor I and 17 β estradiol in MCF-7S Breast Tumor Cells. *Exp Cel Res* 2002; 273:107-17.
26. Corletta HE, Capp E, Corletta OC. Insulin receptor tyrosine kinase activity in colon carcinoma. *Braz J Med Biol Res* 1996; 29:1593 – 7.
27. Talavera F, Reynolds RK, Roberts JA, Menon MJ. Insulin-Like Growth Factor I Receptors in Normal and Neoplastic Endometrium. *Cancer Res* 1990; 50:3019-24.
28. Nagamani M, Stuart CA, Dunhardt PA, Doherty MG. Specific binding sites for insulin and insulin-like growth factor I in human endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165:1865-71.
29. Rutanem E, Stenman S, Blum W, Kärkkäinen T, Lehtovirta P, Stenman U. Relationship between Carbohydrate Metabolism and Serum Insulin-like Growth Factor

System in Postmenopausal Women: Comparison of Endometrial Cancer Patientes with Healthy Controls. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77:199-204.

30. Rutanen E, Pekonem F, Mäkinen T. Soluble 34K Binding Protein Inhibits the Binding of Insulin-like Growth Factor I to Its Cell Receptors in Human Secretory Phase Endometrium: Evidence for Autocrine/Paracrine Regulation of Growth Factor Action. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66:173-80.

31. Reynolds RK, Hu C, Baker VV. Transforming Growth Factor α and Insulin-like Growth Factor-I but not Epidermal Growth Factor, Elicit Autocrine Stimulation of Mitogenesis in Endometrial Cancer Cell Lines. *Gynecol Oncol* 1998; 70:202-9.

32. Zhou J, Dsupin BA, Giudice LC, Bondy CA. Insulin-like Growth Factor System Gene Expression in Human Endometrium during the Menstrual Cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 1723-34.

33. Giudice LC, Dsupin BA, Jin IH, Vu TH, Hoffman AR. Differential Expression of Messenger Ribonucleic Acids Encoding Insulin-Like Growth Factors and Their Receptors In Human Uterine Endometrium and Decidua. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 76:1115-22.

34. Nagamani M, Stuart CA. Specific binding and growth-promoting activity of insulin in endometrial cancer cells in culture. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179:6-12.

35. Pearl ML, Talavera F, Gretz HF, Roberts JA, Menon KM. Mitogenic activity of growth factors in the human endometrial adenocarcinoma cell lines HEC-1A e KLE. *Gynecol Oncol* 1993; 49:325-32.

36. Maiorano E, Loverro G, Viale G, Giannini T, Napoli A, Perlino E. Insulin-like growth factor-I expression in normal and disease endometrium. *Int J Cancer* 1999; 80:188-193.

37. Roy R N, Gerulath AH, Cecutti A, Bhavnani BR. Discordant expression of insulin-like growth factors and their receptor messenger ribonucleic acids in endometrial carcinomas relative to normal endometrium. *Mol Cel Endocrinol* 1999; 153:19-27.

38. Sherman ME. Theories of Endometrial Carcinogenesis: a Multidisciplinary Approach. *Mod Pathol* 2000; 13: 295-308.
39. Fukuda K, Mori M, Uchiyama M, Iwai K, Iwasaka T, Sugimori H. *Gynecol Oncol* 1998; 69:220-5.
40. Pertschuk LP, Shahla M, Simone J, Feldman JG, Fruchter RG, Axiotis CA, et al. Estrogen Receptor Immunocytochemistry in Endometrial Carcinoma: A Prognostic Marker for Survival. *Gynecol Oncol* 1996; 63:28-33.
41. Benedet JL, Bender H, Jones H III, Ngan HYS, Pecorelli S. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *Int J Gynecol Obstet* 2000; 70:209-62.
42. Chaves EC, Corletta HE, Capp E, Toscani G. Miomatose uterina – o papel do IGF-I e seu receptor. *Femina* 2002; 30:255-259.
43. Capp E, Brandelli A, Monego H, Ribeiro MF, Freitas MS, Pureur R, et al. Binding and tyrosine kinase activity of insulin receptor in human normal and neoplastic endometrium. *Med Sci Res* 1996; 24:621-3.
44. Kleiman D, Karas M, Roberts CT, LeRoith D, Phillip M, Segev Y. Modulation of Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I) Receptors and Membrane-Associated IGF-Binding Proteins in Endometrial Cancer Cells by Estradiol. *Endocrinol* 1995; 136: 2531-7.
45. Kono T, Barham F. The Relationship between the Insulin-binding Capacity of Fat Cells and the Cellular Response to Insulin. *J Biol Chem* 1971; 426:6210-6.
46. Basil JD, Goodfellow PJ, Rader J, Muntch DG, Herzog. Clinical Significance of Microsatellite Instability in Endometrial Carcinoma. *Cancer* 2000; 89:1758-64.
47. Westhoff C, Heller D, Drosinos S, Tancer L. Risk factors for hyperplasia-associated versus atrophy-associated endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182:506-8,
48. Wang H, Wang T, Soong Y. Elevation of insulin-like growth factor binding protein-1 mRNA expression following hormone replacement therapy. *Hum Rep* 2000; 15: 50-4.

49. Eppler E, Zapf J, Bailer N, Falkmer UG, Falkmer S, Reinecke M. IGF-I in human breast cancer: low differentiation stage is associated with decreased IGF-I content. *Eur J Endocrinol* 2002; 146:813-821.
50. Bermont L, Fauconnet S, Lamielle F, Adessi G. Cell-Associated Insulin-like Growth-Factor-Binding Proteins Inhibit Insulin-Like Growth Factor1-Induced Endometrial Cancer Cell Proliferation. *Cell Mol Biol* 2000; 46:1173-82.

7. ANEXOS: FIGURAS

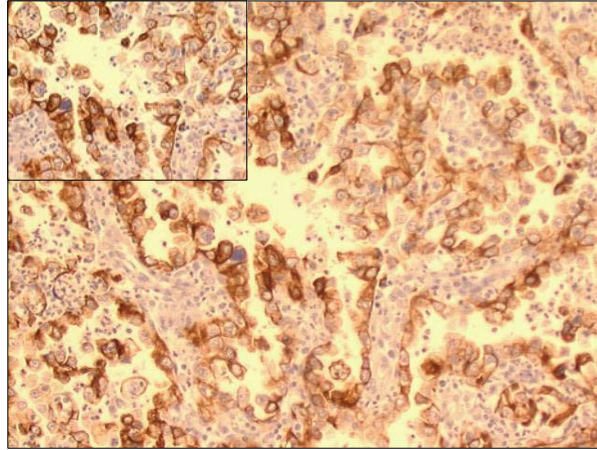


Fig 1. Positividade dos receptores de IGF-I em carcinoma de endométrio. Observar a positividade marrom na membrana celular. (Imuno-histoquímica 200x, inset 100x)

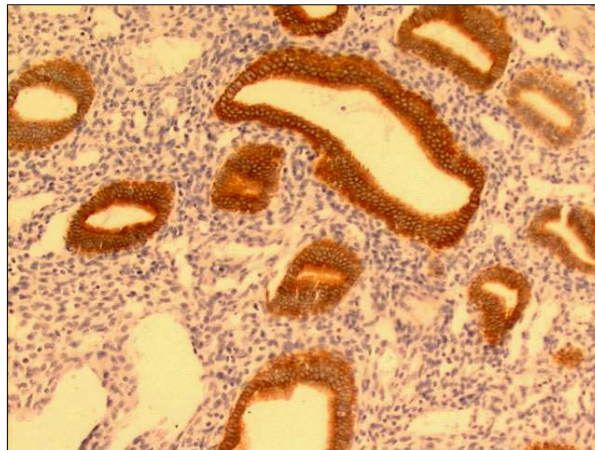


Fig 2. Positividade dos receptores de IGF-I em endométrio normal em paciente do grupo controle. Notar a forte positividade na membrana celular. (Imuno-histoquímica 200x)

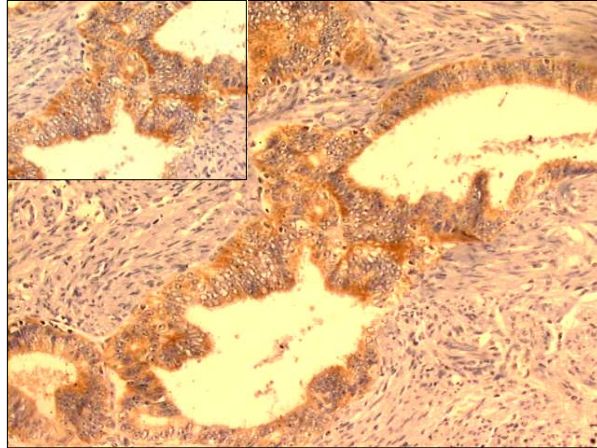


Fig 3. Expressão do receptores de insulina em carcinoma de endométrio. Observar a positividade para o anticorpo no citoplasma, mais acentuada no ápice da célula (Imuno-histoquímica 200x, inset 100x)

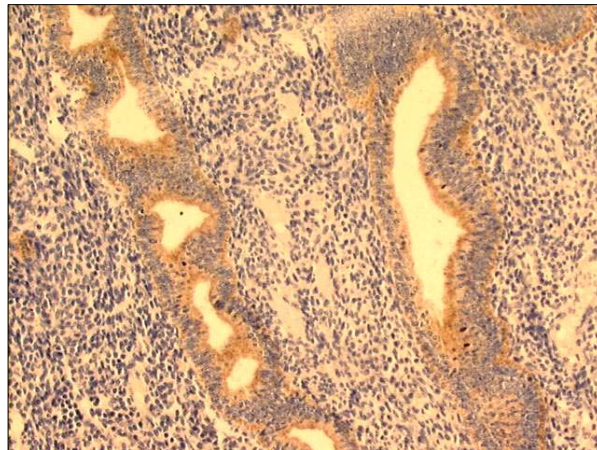


Fig 4. Expressão do receptor de insulina no endométrio normal no grupo controles. Observar a positividade difusa no citoplasma. (Imuno-histoquímica 200x)

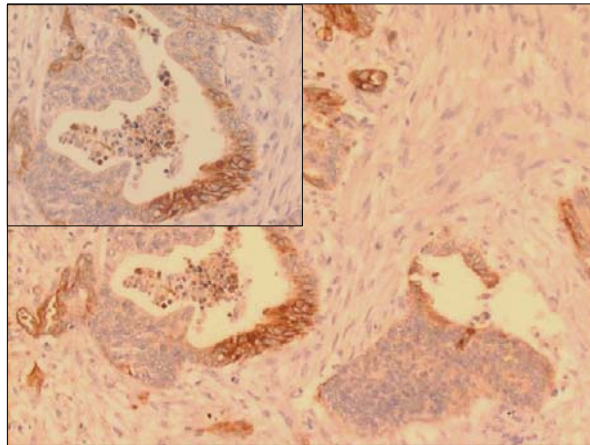


Fig 5 Expressão dos receptores de IGF-I em carcinoma de endométrio. (Imuno-histoquímica 200x, inset 100x)

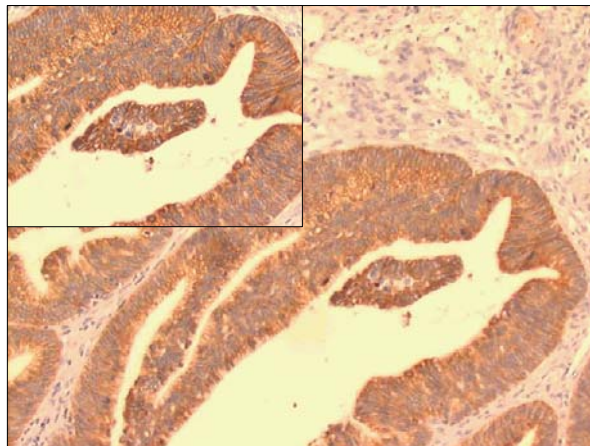


Fig 6. Expressão dos receptores de IGF-I em carcinoma de endométrio. (Imuno-histoquímica 200x, inset 100x)

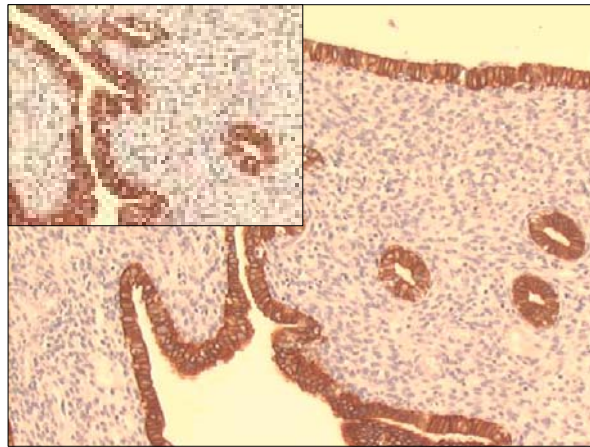


Fig 7. Expressão dos receptores de IGF-I em endométrio normal em paciente do grupo controle. Notar a forte positividade na membrana celular. (Imuno-histoquímica 200x, inset 100x)

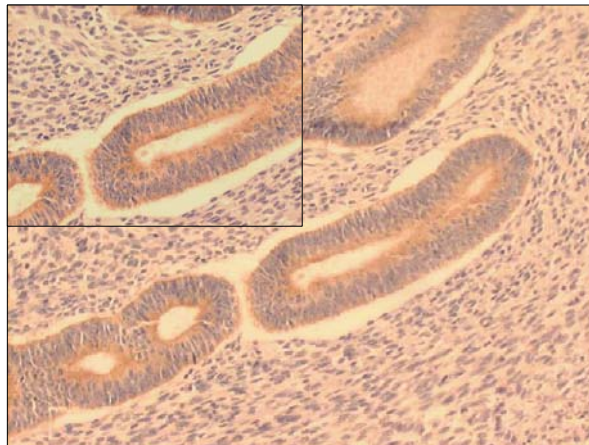


Fig 8. Expressão do receptor de insulina no endométrio normal no grupo controles. Observar a positividade difusa no citoplasma. (Imuno-histoquímica 200x, inset 100x)

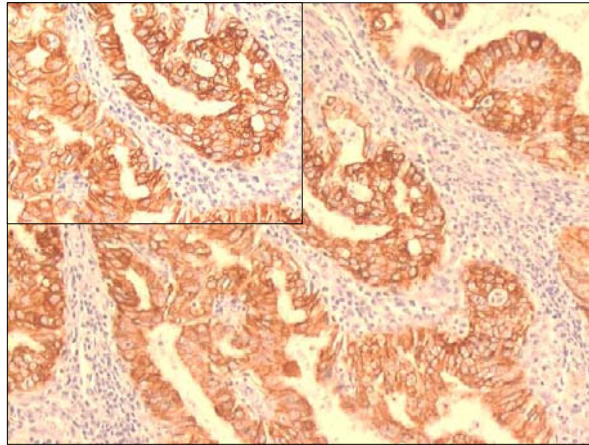


Fig 9. Expressão dos receptores de IGF-I em carcinoma de endométrio. Observar a positividade marrom na membrana celular. (Imuno-histoquímica 200x, inset 100x)

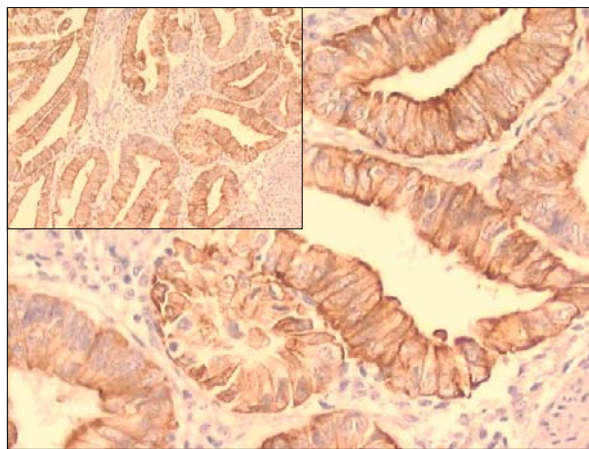


Fig 10. Expressão dos receptores de IGF-I em carcinoma de endométrio. (Imuno-histoquímica 200x, inset 100x)

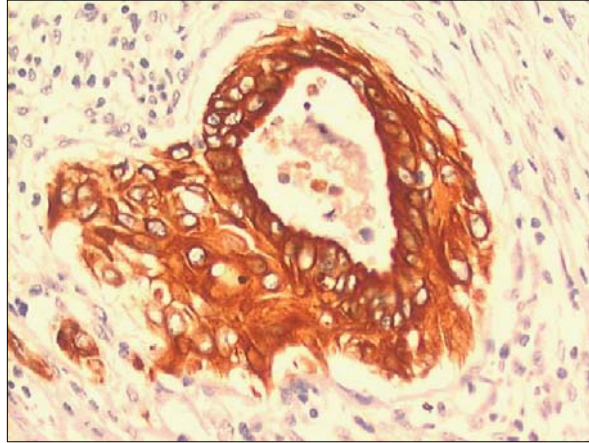


Fig 10. Expressão dos receptores de IGF-I em estroma de carcinoma de endométrio. Invasão não detectada na coloração por hematoxilina-eosina. (Imuno-histoquímica 200x)

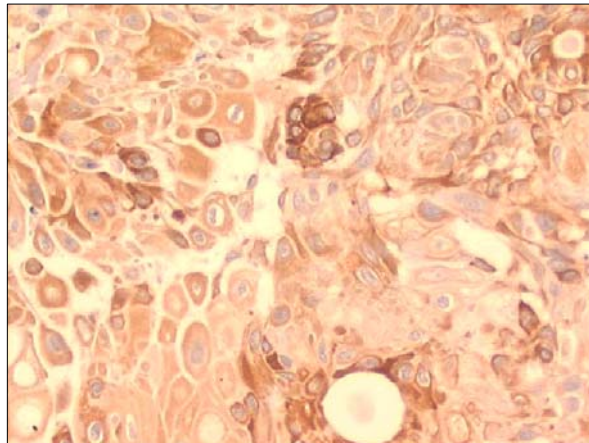


Fig 11. Expressão dos receptores de IGF-I em carcinoma de endométrio. (Imuno-histoquímica 200x)