



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

**AVALIAÇÃO DE RECEPTORES ESTERÓIDES ENDOMETRIAIS, KI-67
E BCL-2 E SUAS CORRELAÇÕES COM ÍNDICE DE MASSA CORPORAL
E RESISTÊNCIA INSULÍNICA EM MULHERES APÓS A MENOPAUSA**

LUIS PAULO GALVÃO WOLFF

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde, área concentração em Fisiologia Ginecológica, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Ilza Maria Urbano Monteiro e coorientação da Prof^a. Dr^a. Cristina Laguna Benetti Pinto

Campinas, 2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Rosana Evangelista Poderoso – CRB8/6652

W832a Wolff, Luis Paulo Galvão, 1972
Avaliação de receptores esteróides endometriais, KI-67 e BCL-2 e suas correlações com índice de massa corporal e resistência insulínica em mulheres após a menopausa. / Luis Paulo Galvão Wolff. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientador: Ilza Maria Urbano Monteiro
Coorientador: Cristina Laguna Benetti Pinto
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Obesidade. 2. Endométrio. 3. Resistência à insulina. 4. Proliferação Celular. 5. Apoptose. I. Monteiro, Ilza Maria Urbano. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Assessment of endometrial steroids receptors, KI-67 and BCL-2 and their correlation with body mass index and insulin resistance in postmenopausal women.

Palavras-chave em inglês:

Obesity
Endometrium
Insulin resistance
Endometrial proliferation
Apoptosis

Área de concentração: Fisiopatologia Ginecológica

Titulação: Doutor em Ciências da Saúde

Banca examinadora:

Ilza Maria Urbano Monteiro [Orientador]
José Mendes Aldrighi
Carolina Sales Vieira
Aarão Mendes Pinto Neto
Lúcia Helena Simões da Costa Paiva

Data da defesa: 15-07-2011

Programa de Pós-Graduação: Faculdade de Ciências Médicas

Diagramação e arte-final: Assessoria Técnica do CAISM (ASTEC)

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluno: LUIS PAULO GALVÃO WOLFF

Orientadora: Prof^a. Dr^a. ILZA MARIA URBANO MONTEIRO

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. CRISTINA LAGUNA BENETTI PINTO

Membros:

1.

2.

3.

4.

5.

The image shows five horizontal rows, each containing a handwritten signature. The signatures are written in black ink on a light background. The first signature is the most legible, appearing to be 'Adel'. The second signature is 'Luiz Paulo Galvão Wolff'. The third signature is 'Cristina Laguna Benetti Pinto'. The fourth signature is 'Ilza Maria Urbano Monteiro'. The fifth signature is 'Luiz Paulo Galvão Wolff'.

67.689.777.76

Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 15/07/2011

Dedico este trabalho...

...à minha família:

*Almério e Maria Antônia, meus pais.
Pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis.*

*Luciana, Eliana, Juliana e Paulo Augusto, meus irmãos.
Pelo companheirismo e amizade verdadeira.*

*Ana Carolina, minha filha.
Que no desabrochar da vida,
este trabalho lhe sirva de inspiração.*

*Helen, minha esposa.
Pelo carinho e amor com que me ajudou
nos momentos mais importantes.*

Agradecimentos

Prof.^a Dr.^a Ilza Maria Urbano Monteiro
Minha orientadora, mostrou-se mais do que isto durante os anos.
Uma grande amiga.

Prof.^a Dr.^a Cristina Laguna Benetti Pinto
Pelo apoio na elaboração deste trabalho.

Prof. Dr. José Vassallo
Colaborou de forma desprendida na elaboração da pesquisa, possibilitando a conclusão deste trabalho com êxito.

Prof.^a Dr.^a Liliana Aparecida Lucci De Ângelo Andrade
Auxiliou na leitura das lâminas e orientou para aperfeiçoar este trabalho.

Prof. Dr. José Mendes Aldrighi
Pessoa ímpar, verdadeiro professor, que eleva seus alunos
Para enxergarem mais longe

Prof. Dr. Paulo Latuf Filho
Sempre disposto e prestativo, contribuiu de forma essencial na elaboração e conclusão deste trabalho.

Prof. Dr. Luis Otávio Zanatta Sarian
Pelas correções na qualificação, contribuindo para o aprimoramento deste trabalho.

Prof.^a Dr.^a Arlete Maria dos Santos Fernandes
Pelas contribuições na qualificação para a melhoria deste trabalho.

Sr.^{ta} Ana Carolina de Souza Atti
Pela ajuda despendida nas coletas das amostras.

Sra. Sirlei Siani Moraes
“Realizou as análises estatísticas, sempre prestativa e disposta a ajudar”.

Sr. Samyr Elias Abrahão, setor de finanças – CAISM/UNICAMP
Colaborou para que as contas e relatórios financeiros fossem elaborados.

Sr.^a Adriana Barros - CEMICAMP
Auxiliou-me no projeto à FAPESP e nos orçamentos. Orientou-me na elaboração dos relatórios.

*Dr. André Aguiar do Monte
Grande amigo que contribuiu para efetivação deste trabalho.*

*Dr.^a Ana Emília Gaspar, Secretária de Saúde de Pindamonhangaba e Sr.^a Sandra Lujan, Diretora de Saúde de Pindamonhangaba
Agradecimentos pelo apoio na realização deste trabalho.*

*Dr.^a Shirley Cristina de Abreu
Responsável pela realização dos exames laboratoriais com qualidade. Sempre se mostrou disponível para ajudar.*

*A todos os funcionários do Laboratório Municipal “Dr. Paulo Emilio D’Alessandro”
Agradecimento pela ajuda despendida. Desejo felicidade a todos.*

*A todos os colegas da pós-graduação
Juntos, passamos por momentos felizes e difíceis;
Desejo sucesso a todos, e tenho certeza de que atingirão seus objetivos.*

*A todos os colaboradores da Astec
Pelo auxílio, paciência e tolerância frente à minha ansiedade;
Por estarem sempre prestativos e dispostos a ajudar.*

*Hospital Municipal Dr. José de Carvalho Florence
Pelo acolhimento e apoio que contribuíram para a realização desta pesquisa.*

*Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas
Departamento de Tocoginecologia
Onde adquiri conhecimento e novos amigos.
Será sempre uma referência em minha vida.*

*Hospital Frei Galvão de Pindamonhangaba
Pelo apoio no desenvolvimento desta pesquisa.*

*Às mulheres que aceitaram participar desta pesquisa
Meus mais sinceros agradecimentos e certeza que
o mundo somente se torna melhor devido a pessoas assim.*

*À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, financiadora
deste projeto.*

*Pelo apoio fornecido por esta instituição de fomento que visa o aperfeiçoamento
tecnológico e científico do país, sempre auxiliando no desenvolvimento de novas
pesquisas de qualidade.*

**...“O homem que consagra suas horas com infatigável empenho
a honrosos objetivos, traça luminosamente o seu destino”**

Edward Kong

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	xiii
Resumo	xv
Summary	xvii
1. Introdução	19
2. Objetivos	29
2.1. Objetivo Geral.....	29
2.2. Objetivos Específicos	29
3. Publicações.....	31
3.1. Artigo 1	32
3.2. Artigo 2	46
3.3. Artigo 3	58
4. Discussão.....	73
5. Conclusões.....	87
6. Referências Bibliográficas.....	89
7. Anexos	99
7.1. Anexo 1 – Sujeitos e Métodos.....	99
7.2. Anexo 2 – Resultados	110
7.3. Anexo 3 – <i>Check List</i>	124
7.4. Anexo 4 – Ficha de Coleta de Dados.....	125
7.5. Anexo 5 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	127

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

Antígeno Ki-67 – Marcador do ciclo celular e crescimento tumoral

Bcl-2 – *B cell-lymphoma/leukemia-2 Gene*

CA – Circunferência abdominal

CAISM – Centro Atenção Integral à Saúde da Mulher

CEMICAMP – Centro de Pesquisas em Saúde Reprodutiva de Campinas

CIPED – Centro de Investigação em Pediatria - Laboratório de Investigação em Patologia Molecular

CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

DP – Desvio padrão

EP – Erro padrão

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FCM – Faculdade de Ciências Médicas

FSH – Hormônio Folículo-Estimulante

HOMA-IR – Índice HOMA (*Homeostasis Model Assessment*)

IGF – Fator de Crescimento Insulinóide

- IGF-1R** – Receptor do Fator de Crescimento Insulinóide 1
- IGFBP** – Globulina transportadora IGF
- IL** – Interleucina
- IMC** – Índice de Massa Corpórea
- p-valor** – Probabilidade de Significância Estatística
- r** – Índice de correlação
- RE** – Receptor estrogênico
- RG** – Registro geral
- RI** – Resistência insulínica
- RP** – Receptor progestogênico
- SHBG** – Proteína Carreadora Hormônios Esteróides
- SM** – Síndrome Metabólica
- TNF- α** – Fator de necrose tumoral alfa
- UNICAMP** – Universidade Estadual de Campinas
- VEGF** – Fator de Crescimento Vascular

Resumo

Introdução: Após a menopausa, o ganho de peso e a distribuição dos depósitos de gordura podem estar alterados com o predomínio da gordura abdominal, favorecendo o aparecimento de doenças metabólicas e neoplásicas. O mecanismo pelo qual a obesidade promove o aparecimento destas doenças ainda não está totalmente esclarecido. No entanto, sugere-se que a produção de estrogênios, decorrentes da conversão dos andrógenos no tecido adiposo e os efeitos metabólicos relacionados à hiperinsulinemia, mediados pelo IGF-1, possam estar relacionados. Embora se espere que o endométrio após a menopausa esteja atrófico, existe uma proporção que mantém padrão proliferativo fraco, provavelmente como resposta ao baixo e constante estímulo estrogênico. O objetivo deste estudo é avaliar a associação existente entre a expressão de receptores esteróides, IGF-1, Bcl-2 e Ki-67 no endométrio, correlacionando-os com índice de massa corporal e resistência tecidual insulínica. **Sujeitos e Métodos:** Foi realizado estudo de corte transversal, sendo selecionadas 85 mulheres após a menopausa, do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (Caism - Unicamp) e do Hospital Dr. José de Carvalho Florence (São José dos Campos-SP). Foram avaliados os receptores endometriais para estrogênio (RE), progesterona (RP),

fator de crescimento insulinóide 1 (IGF-1), Ki-67 e Bcl-2 na amostra endometrial obtida correlacionando-os com a resistência tecidual insulínica (RI) e índice de massa corporal (IMC). Os dados foram analisados através dos testes de Pearson e de Spearman, considerando-se o valor α de 0,05. **Resultados:** Obtivemos 36,5% de mulheres com sobrepeso e 40% com obesidade. Não foi encontrada correlação estatística entre IMC com variável estudada. Observou-se expressão moderada e intensa para os RE (94,1%), RP (80%) e IGF-1R (78,8%) nas glândulas endometriais. A expressão do Ki-67 foi moderada e intensa em 75,3% e Bcl-2 em 65,9% das amostras. O índice HOMA-IR correlacionou-se com os RE ($p=0,0402$) e RP ($p=0,0034$). Os IGF-1R e RP se correlacionaram com CA ($p=0,0189$ e $0,0170$) respectivamente. Observou-se correlação entre RE, RP e Ki-67 e Bcl-2. **Conclusão:** Mulheres após a menopausa apresentam grande expressão endometrial dos receptores estrogênicos, progestogênicos e IGF-1, independentemente do seu peso corporal ou do índice de massa corporal. Houve correlação entre os RE, RP e IGF-1R com marcadores de resistência tecidual insulínica.

Palavras-chave: Obesidade, endométrio, resistência à insulina, proliferação celular, apoptose.

Summary

Introduction: After menopause, weight gain and the distribution of fat deposits may be altered with a predominance of abdominal fat, favoring the development of metabolic diseases and cancer. The mechanism by which obesity promotes the onset of these diseases is not fully understood. However it is suggested that the production of estrogens, resulting from the conversion of androgens in adipose tissue and metabolic effects associated with hyperinsulinemia, mediated by IGF-1, may be related. While it is hoped that the postmenopausal endometrium is atrophic, there is a proportion that maintains low proliferative index, probably in response to low estrogen and constant encouragement. The aim of this study is to evaluate the association between the expression of steroid receptors, IGF-1, Bcl-2 and Ki-67 in the endometrium, correlating them with body mass index and insulin resistance tissue. **Subjects and Methods:** Was conducted cross-sectional study, were 85 selected women after menopause, in the Center for Integral Attention to Women's Health (Caism - Unicamp) and the Hospital Dr. José de Carvalho Florence (São José dos Campos-SP). We evaluated the endometrial receptors for estrogen (ER), progesterone (PR), IGF-1, Ki-67 and Bcl-2 in endometrial sample obtained by correlating them with tissue insulin

resistance (IR) and body mass index (BMI). Data were analyzed using Pearson tests and Spearman, considering α value of 0.05. **Results:** We obtained 36.5% of overweight women and 40% were obese. We don't found statistical correlation between body mass index with no variable studied. We observed moderate to intense expression for ER (94.1%) PR (80%) and IGF-1R (78.8%) in the endometrial glands. The expression of Ki-67 was moderate and severe in 75.3% and Bcl-2 in 65.9% of samples. The index of HOMA-IR was correlated with the ER ($p = 0.0402$) and PR ($p = 0.0034$). The IGF-1R and PR were correlated with CA ($p = 0.0189$ and 0.0170) respectively. There was a correlation between ER, PR and Ki-67 and Bcl-2. **Conclusion:** Women after menopause have a great expression of endometrial estrogen, progestin and IGF-1 receptors, independent of their BMI. There was a correlation between the ER, PR and IGF-1R with tissue insulin resistance markers.

Key words: Obesity, endometrium, insulin resistance, endometrial proliferation, apoptosis

1. Introdução

A obesidade e o sobrepeso caracterizam-se por serem problemas de saúde pública, implicando elevada morbimortalidade e associações com diversas patologias clínicas (1,2). Ao menos 2,8 milhões de adultos morrem anualmente em todo o mundo, resultado do sobrepeso e obesidade (3). Nos Estados Unidos da América existe crescente prevalência da obesidade com aumento de 14,2% em 1978 para 30% em 2009, mostrando a magnitude do problema (3,4). No Brasil, estudos corroboram estes achados com prevalência de sobrepeso e obesidade entre 30% e 48% das mulheres (5,6).

A alteração no ganho de peso e sua distribuição corporal relacionam-se a vários fatores que vão desde hábitos de vida, influências do meio ambiente, fatores genéticos, hormonais e metabólicos (1). Entretanto, o desequilíbrio causado pelo aumento na ingestão calórica e a diminuição no consumo energético são os responsáveis pelo balanço positivo, levando ao aumento do ganho de peso corporal (7).

Após a menopausa, período em que os níveis hormonais apresentam variações importantes, o ganho de peso e a distribuição destes depósitos de

gordura podem estar alterados (8), com predomínio de depósito de gordura abdominal (9). A gordura abdominal é formada pelo tecido adiposo subcutâneo e pela gordura intra-abdominal, localizados no intra e retroperitôneos. A gordura visceral compreende predominantemente os depósitos mesentéricos e o omento, representando 5% a 10% da gordura corporal total na mulher (10).

Este padrão de distribuição dos depósitos de gordura pode influenciar no aparecimento de doenças metabólicas e neoplásicas, sendo que a obesidade associada aos efeitos da dieta inadequada é responsável por um terço dos óbitos causados por cânceres (7). Dentre as doenças neoplásicas ginecológicas, as mais frequentes são mama e endométrio (11,12).

Existem divergências a respeito da influência da distribuição destes depósitos de gordura no organismo e o risco de aparecimento de câncer. Alguns estudos mostraram um aumento no risco para carcinoma endometrial em mulheres com obesidade abdominal (13,14), porém outros reportaram que este padrão de distribuição da gordura corporal não teria nenhum efeito no desenvolvimento do câncer de endométrio (15,16). Quando se avalia a associação entre a hiperplasia do endométrio e a circunferência abdominal (CA), a relação desaparece quando é feito o ajuste para o índice de massa corporal (IMC) sugerindo que a quantidade, mas não a localização da gordura corporal, seria fator de risco para estas alterações (16,17). Porém, o ganho de peso e o incremento do IMC relacionam-se com o aumento do risco de câncer de endométrio. Mulheres que tiveram aumento anual do IMC maior ou igual a 1% apresentaram risco 3,2 vezes maior, comparado com mulheres que mantiveram estável seu IMC (18). Além do peso corporal e do

IMC, outros fatores também influenciam no aparecimento das alterações proliferativas no endométrio, como idade e tempo de menopausa (7).

Após a menopausa, as lesões proliferativas endometriais, como a hiperplasia adenomatosa, diminuem com a idade, ao contrário do que ocorre com o carcinoma endometrial (19). No entanto, quando presente, a hiperplasia pode preceder o carcinoma endometrial (7). Isto ocorre porque a hiperplasia usualmente está envolvida com a proliferação do endométrio, resultado da estimulação tecidual pelo estrogênio na ausência de ação progesteronal (7), condição mais frequentemente encontrada no período da perimenopausa. No entanto, apenas 15% a 20% dos adenocarcinomas de endométrio se desenvolvem a partir de lesões hiperplásicas (20).

Entre os mecanismos propostos para se associar à obesidade e ao risco de câncer, destacam-se os efeitos endócrinos e metabólicos da obesidade (Renehan et al., 2008).

Após a menopausa, devido à falência folicular, predomina a produção ovariana de andrógenos (21), que são transportados principalmente pela globulina transportadora de hormônios esteróides (SHBG). Os principais andrógenos são a testosterona e a androstenediona, precursores imediatos do estradiol e da estrona (22). No tecido adiposo, principalmente de localização abdominal, a androstenediona e a testosterona são convertidas em estrona e estradiol respectivamente (23;24). Em mulheres com sobrepeso e obesidade, e também naquelas com CA aumentada, ocorre diminuição da SHBG (25, 26). A redução dos níveis séricos de SHBG resultantes das alterações metabólicas ocasiona aumento de estrogênios e

androgênios livres (26, 27). Os androgênios circulantes sofrem aromatização no tecido adiposo, aumentando ainda mais os níveis plasmáticos dos estrogênios, particularmente da estrona nas mulheres após a menopausa (27). A diminuição da SHBG também está associada à resistência insulínica (RI) após a menopausa, sugerindo que a SHBG possa ser um índice de RI nessas mulheres (25).

Diversos fatores relacionados ao acúmulo de gordura corporal podem interferir na ação dos adipócitos. Os adipócitos possuem a capacidade de sintetizar e secretar várias substâncias, de forma que a obesidade pode ser considerada como um estado pró-inflamatório, levando a ativação crônica do sistema imune (15). Estas substâncias como leptina, adiponectina, VEGF (Fator de crescimento vascular) e citocinas inflamatórias: TNF- α (Fator de necrose tumoral), IL-6 (Interleucina), IL-8, IL-10 podem provocar mudanças no controle do apetite, balanço energético, nas reações inflamatórias, na resistência e sensibilidade insulínica, angiogênese, metabolismo lipídico, aterosclerose, proliferação e apoptose celular (28). Estas mudanças influenciam o desenvolvimento de doenças metabólicas como a dislipidemia, hiperglicemia e hiperinsulinemia podendo caracterizar a Síndrome Metabólica (SM) (29).

A Síndrome Metabólica pode se associar a diversas doenças, entre elas as neoplasias (29), sendo a hiperinsulinemia um dos principais fatores relacionados ao desenvolvimento de cânceres (29). A insulina é hormônio anabólico que possui a capacidade de estimular a proliferação celular. Quando presente a RI tecidual, as células β do pâncreas aumentam ainda mais a produção de insulina, de forma a manter normal a concentração plasmática de glicose (29). Esta hiperinsulinemia

associada à obesidade central promove aumento da concentração sérica de ácidos graxos livres e fator de necrose tumoral, com manutenção dos níveis séricos aumentados de insulina. A insulina e os fatores de crescimento insulinóides podem desenvolver papel relevante no desenvolvimento do câncer, mas não existem evidências de que indivíduos com altos níveis séricos de insulina, como em diabéticos não insulino-dependentes, tenham um aumento desta incidência (30).

São controversas as relações existentes entre as neoplasias ginecológicas e o diabetes *melittus*. As razões para estas associações não são bem compreendidas e têm sido objeto de diferentes hipóteses. Entre estas hipóteses encontram-se as mesmas propostas para a SM, como obesidade, hiperinsulinemia e estado hiperestrogênico (31).

O mecanismo pelo qual a insulina sérica promove alterações proliferativas celulares envolve mecanismos indiretos relacionados com fator de crescimento insulinóide (IGF-1). Portanto, este fator é regulado pela secreção de insulina (26, 31).

A insulina, o IGF-1 e outros fatores de crescimento estão envolvidos em processos da angiogênese e carcinogênese endometrial, promovendo mitoses responsáveis por ocasionar proliferação e diferenciação celular (32). Foi encontrado aumento dos receptores de IGF-1 em células de câncer de mama e cólon (33). Esses receptores apresentam importante ação proliferativa e anti-apoptótica, interferindo tanto na supressão como na redução do tumor (34). Também foi sugerido que IGF-1, IGF-2 e IGFBP-3 totais poderiam servir como

marcadores para câncer de cólon (35). No endométrio foram encontradas altas expressões de IGF-1R em células tumorais, sugerindo que IGF-1, IGF-2 e seus receptores possam estar envolvidos na progressão de tumores (36).

Os níveis de insulina e IGF-1 livre parecem estar relacionados à regulação de hormônios esteróides sexuais, afetando o desenvolvimento de cânceres hormônio-dependentes (26). A hiperinsulinemia e IGF-1 inibem a síntese de SHBG hepática, aumentando os hormônios sexuais livres no plasma, favorecendo o aparecimento das neoplasias hormônio-dependentes, como de mama e de endométrio (26).

A ação dos hormônios esteróides no tecido endometrial ocorre através da ligação a receptores específicos (37). Na célula o receptor estrogênico (RE) tem alta afinidade pelo estradiol, estrona e outros estrogênios (22).

Os RE agem através da ligação a proteínas específicas, localizadas no interior da célula-alvo. São responsáveis pela regulação das ações sinérgicas e antagônicas nestas células e sob ação hormonal dos estrogênios, progestogênios e androgênios modulam os efeitos proliferativos e secretórios no endométrio (37). Os RE em endométrio normal também regulam a vascularização tecidual (38). A quantificação, distribuição e tipo dos RE nos tecidos podem ter papel relevante como fator para estimar a sensibilidade tecidual hormonal, e inferir prévia exposição estrogênica (39).

A concentração e distribuição dos receptores nos tecidos também determinam sua capacidade de ligação ao hormônio, e a maior parte dos tecidos

considerados como não responsivos ao hormônio possuem baixas concentrações e distribuição de receptores hormonais específicos (40,41).

O endométrio atrófico após a menopausa frequentemente apresenta atividade proliferativa fraca (42). Foi encontrada uma expressão do RE de 61,5% no endométrio atrófico (43), demonstrando que mesmo após a menopausa o endométrio atrófico sofre estímulo hormonal, provavelmente devido à ação continua de baixos níveis estrogênicos (42).

Analisando receptores esteróides após a menopausa, comparando mulheres obesas e não obesas, observou-se que no grupo das obesas havia concentração maior de RE em fragmentos de pele. O mesmo não foi observado para receptores de progesterona (RP) (39).

Os RP interagem com os esteróides promovendo sua ação através de transcrição genética, ocasionando uma cascata de eventos celulares. Possuem uma ciclicidade na menacme de acordo com a fase do ciclo menstrual, demonstrando uma resposta aos níveis hormonais. Na fase proliferativa, a concentração dos RP é menor do que RE, aumentando na fase pré-ovulatória. A partir daí, ocorre diminuição até o final da fase secretora. Portanto, as concentrações de RP não refletem os níveis de progesterona circulantes, sugerindo que exista uma influência estrogênica na concentração dos RP teciduais (44). A indução na formação de RP como uma resposta específica do tecido-alvo pela estimulação estrogênica, pode ser mostrada em estudo em que houve aumento das concentrações de RE e RP após a utilização de estrogênio vaginal (43).

Após a menopausa, tanto o endométrio inativo como ativo podem apresentar altas concentrações de RE e RP. No entanto para que tenha capacidade proliferativa deve apresentar expressão da proteína Ki-67 (20). O Ki-67 é uma proteína expressa em tecidos com atividade mitogênica, indicando atividade proliferativa tecidual (45). Pequenas quantidades de estrogênios apresentam capacidade de promover atividade mitogênica no tecido (46). A expressão do Ki-67 é regulada pela variação hormonal, sendo aumentada no ciclo menstrual normal durante a fase proliferativa (45).

No endométrio a manutenção da homeostase celular deve-se também à apoptose (47). O desequilíbrio entre proliferação e apoptose celular pode estar relacionado ao desenvolvimento de lesões proliferativas endometriais (48). A apoptose celular é regulada, entre outros, por um proto-oncogene denominado Bcl-2 que previne a morte celular, diminuindo a apoptose. O seu modo de ação e a sua regulação não estão claros, no entanto sabe-se que a sua expressão no tecido endometrial é maior durante a fase secretora do ciclo menstrual, diminuindo na fase proliferativa. (47). Isto sugere que a expressão do Bcl-2 ocorre seguindo as variações hormonais de estrógeno e progesterona (47). Durante o ciclo menstrual, a distribuição específica de RE e RP nas células dos epitélios glandular e estromal sofre regulação hormonal, interferindo diretamente na expressão da Bcl-2, sugerindo que a mesma possa exercer papel importante na ocorrência de tumores hormônio-dependentes (49). Em pólipos a expressão da Bcl-2 está aumentada, principalmente na fase proliferativa do ciclo menstrual, sendo que alguma atividade antiapoptótica também possa ocorrer (45).

Vários outros fatores estão implicados na resposta endometrial. Ainda existem dúvidas a respeito das relações existentes entre a obesidade, distribuição de gordura, hiperinsulinemia, alterações hormonais e o risco para desenvolvimento de neoplasias, bem como os mecanismos envolvidos nestas relações (50).

Este estudo se propõe a avaliar fatores relacionados à apoptose (Bcl-2) e proliferação celular (Ki-67), bem como a interação dos diversos receptores (RE, RP e IGF-1R) com o estado hormonal e metabólico da mulher, a obesidade e as relações que poderiam estar envolvidas no desenvolvimento de alterações proliferativas endometriais.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliar em mulheres após a menopausa as associações entre a expressão de RE, RP, IGF-1R, Ki-67 e Bcl-2, correlacionando-os com IMC e RI tecidual.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar e comparar nas células endometriais, estromais e glandulares, a expressão de RE, RP, IGF-1R, Ki-67 e Bcl-2.
- Correlacionar nas células endometriais, estromais e glandulares, a expressão de RE, RP e IGF-1R, com Ki-67 e Bcl-2.
- Correlacionar nas células endometriais, estromais e glandulares a expressão de RE, RP, IGF-1R, Ki-67 e Bcl-2 com IMC.
- Correlacionar nas células endometriais, estromais e glandulares a expressão de RE, RP, IGF-1R, Ki-67 e Bcl-2 com a medida da CA e índice HOMA-IR.

3. Publicações

Artigo 1 – **ASSESSMENT OF THE ESTROGEN AND PROGESTOGEN ENDOMETRIAL RECEPTORS, BCL-2 AND KI-67 AFTER MENOPAUSE**

Luis Paulo Galvão Wolff^{a1*} MD, José Vassallo^b Phd. Paulo Latuf Filho^c PhD, Liliana Aparecida De Ângelo Andrade^b PhD, Ilza Maria Urbano Monteiro^a PhD

Artigo 2 – **CORRELATION BETWEEN STEROID ENDOMETRIAL RECEPTORS, KI-67 AND BCL-2 WITH BODY MASS INDEX IN POST-MENOPAUSAL WOMEN**

Luis Paulo Galvão Wolff^{a1*} MD, Carolina de Souza Atti^a, José Vassallo^b PhD, Liliana Aparecida De Ângelo Andrade^b PhD, Ilza Maria Urbano Monteiro^a PhD

Artigo 3 – **CORRELATION BETWEEN STEROID ENDOMETRIAL RECEPTORS, KI-67 AND BCL-2 WITH INSULIN RESISTANCE AFTER MENOPAUSE**

Luis Paulo Galvão Wolff^{a1*} MD, José Vassallo^b PhD, Cristina Laguna Benetti Pinto^a PhD, Luis Guillermo Bahamondes^a PhD, Ilza Maria Urbano Monteiro^a PhD

3.1. Artigo 1



Author's Decision

Thank you for approving "Assessment of the estrogen and progesterone endometrial receptors, Bcl-2 and Ki-67 after menopause".

[Main Menu](#)

ASSESSMENT OF THE ESTROGEN AND PROGESTOGEN ENDOMETRIAL RECEPTORS, BCL-2 AND KI-67 AFTER MENOPAUSE

Luis Paulo Galvão Wolff^{a1*} MD, José Vassallo^b Phd. Paulo Latuf Filho^c PhD, Liliana Aparecida De Ângelo Andrade^b PhD, Ilza Maria Urbano Monterio^a PhD

^aDepartment of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (Unicamp/Brazil)

^bDepartment of Anatomical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (Unicamp/Brazil)

^cPathology Investigation Laboratory, State University of Campinas (Unicamp/Brazil)

¹Supported by FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo).

The authors have not declared any conflict of interest.

*Corresponding author

Av. Fortunato Moreira, 255, Centro Pindamonhangaba/SP-Brasil

CEP: 12400-370

Tel: +55 12-9144-6477, Fax: +55 12-3645-5353

e-mail address: luis.wolff@bol.com.br

Abstract

Introduction: After menopause, even in the atrophic endometrium, a weak proliferative activity is frequently observed. This proliferative activity may be a consequence to estrogen stimulus due to peripheral conversion of the androgens. The objective of this study is to evaluate the expression of the estrogen (ER) and progesterone (PR) receptors, Bcl-2 and Ki-67 in the endometrium after menopause. **Methods:** A study of a cross section from 85 post-menopausal women in the period from January to December 2010. An endometrial sample was obtained and the ER, PR, Bcl-2 and Ki-67 were evaluated in the stromal and glandular compartments. **Results:** The average age of the women in this study was of 56.8 years, with average of menopause 81.5 months (SE=6.39). A great expression in the endometrial glands was observed in the ER (94.1%), e PR (80%), Ki-67 (75.3%) and Bcl-2 (65.9%). The ER and PR correlated themselves with Ki-67 ($p=0.0017$ and $p<0.0001$) and Bcl-2 ($p=0.0354$ and $p=0.0427$) respectively. **Conclusions:** The women in this study presented great endometrial expression in the ER, PR, Ki-67 and Bcl-2, probably due to continuous stimulus caused by the estrogens, which even at low levels may cause endometrial stimulation.

Key words: Endometrium, menopause, steroid receptor, Ki-67, Bcl-2

1. Introduction

After menopause, gonadal failure brings about hypoestrogenic state, causing endometrial atrophy and becoming inactive. However, weak proliferative activity is frequently observed [1].

This proliferative activity may be a consequence of the production of estrogens due to the conversion of androgens from the adrenals glands and the ovarian stroma. According to this concept the androgens, mainly testosterone and androstenedione, are converted into estradiol and estrone in extra-gonadal sites such as adipose tissue, liver and kidneys. The androgens and the estrogens are transported mainly through a protein called SHBG (Sex Hormone Binding Globulin) [2].

After menopause it is common a weight gain, causing overweight and obesity [3]. These fat deposits bring about a reduction of the SHBG [4,5], increasing the level of free estrogens and androgens [5,6]. The increased circulating androgens suffer aromatization in the adipose tissue, increasing even more the plasmatic levels of estrogens [6].

The action of the steroid hormones in the endometrial tissue occurs through the bond of specific receptors, modulating the proliferative and secretory effects in the endometrium [7]. The concentration and distribution of the receptors in the tissues are responsible for the bonding capacity of the hormone, and most part of the tissues considered as unresponsive to hormones have low concentrations and distribution of hormonal receptors [8,9].

After menopause, the inactive endometrium as well as the active, may present high concentrations of estrogenic (ER) and progestogenic (PR) receptors [1,10]. The quantification, distribution and type of receptors in the tissues may have relevant role as a factor to estimate the hormonal tissue sensibility, and infer previous estrogenic exposition [11]. The objective of this study was to evaluate the expression of the ER, PR, Ki-67 and Bcl-2 in the endometrium of post-menopausal women.

2. Materials and methods

A study of a cross section of 85 postmenopausal women attended at the Center for Integral Women Health (Caism) from the State Universtiy of Campinas

(Unicamp) and at the Municipal Hospital of São José dos Campos, in the period from January to December 2010. These women were indicated to gynecological surgery for benign diseases. The ages of the women included in this study ranged from 40 to 75 years. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Institution, and an informed consent was obtained from all participants. Menopause was confirmed through a serum dosage of the follicle stimulating hormone (FSH) >40 UI/L. The expression of ER, PR, Ki-67 and Bcl-2 was evaluated in the stroma and glands endometrial cells. The endometrial tissue sample was collected at the moment of surgery in a region without macroscopic lesions. It was properly prepared under standard techniques; for immunohistochemistry, the procedure used primary monoclonal antibodies for ER (Dako® code M7047, clone 1D5, dilution 1:250), PR (Dako® code M3569, clone PgR 636, dilution 1:500), Bcl-2 (Biogen® code M887, dilution 1:200) e Ki-67 (Dako® code M7240, clone MIB 1, dilution 1:1000). The ER, PR and Bcl-2 expressions were evaluated in the stroma and in the endometrial glands in a semi-objective manner. Afterwards, they were categorized according to the number of stained endometrial cells; as absent (0), positivity until 25% (1), positivity from 26-50% (2), positivity from 51-75% (3), and positivity above 76% (4). For cellular stained intensity, it was classified as absent (0), staining slightly positive (1), moderately positive (2) and strongly positive (3).

The sum of positivity and intensity points was carried out so, that for each tissue segment, stroma and gland, the expression of the receptors was defined as 0 (negative), 2 and 3 (weak), 4 and 5 (moderate) and 6 and 7 (intense).

The reading of the Ki-67 was carried out through a semi-objective evaluation, according to the percentage of endometrial, stromal and glandular cells which were stained.

The statistical analyses were carried out using Pearson's correlation index for dependent variables and their correlations, and Spearman's correlation index to determine the strength of the linear relation between the two variables, having been considered a level of significance of 5%. The statistical software from the SAS Institute Inc. (SAS/STAT Release 8.2, Cary NC, USA) was used.

3. Results

The average age of the women in this study was of 56.8 years, with average menopause period of 81.5 months (SE=6.39). Menopause was confirmed by the levels of FSH and time in menopause. The serum levels of estradiol presented an average of 14.8pg/ml (SD=12.96). Fourteen women (16.4%) presented increased estradiol serum levels, with values upper to 25pg/ml.

The endometrial histology presented four samples with proliferative characteristics. The characteristics of the samples with endometrial alterations are displayed on table 1.

There were no statistical differences in the analyzed variables between the samples with proliferation and endometrial atrophy. After analyzing eighty-five samples, in the ER and PR expressions, it was observed that the higher the positivity of the cells, the greater the intensity of the stain, demonstrating that intensity is directly related to the number of positive cells (data not shown).

When the tissue expression of the ER was evaluated, it was observed that in the ER the cells were moderately and intensely stained in 78.8% in the stroma and 94.1% in the endometrial glands (Table 2).

When the ER expression was intense, the glandular cells presented a greater percentage of expressed receptors than in the stroma; on the other hand, when the ER expression was negative, weak or moderate, the stromal cells presented a greater percentage of expressed receptors than the glandular (Fig. 1).

The PR presented a moderate and intense expression in 61.2% of the samples in the stroma and 80% in the glands (Table 3).

Similar to the ER, when the expression of the PR was intense, the glandular cells presented greater percentage of receptors than the stromal cells. When the expression of the PR was negative, weak or moderate, the cells in the stromal compartment prevailed.

It was observed, however, that the expression of the ER and the PR varied under similar pattern, which suggests the same stimulus in both receptors.

The Ki-67 presented expression in 75.3% of the samples, being greater in the glands than in the stroma. In spite of the high expression of Ki-67 in the endometrial tissue, the number of cells under mitosis was rarely over 10% (Fig. 3).

A statistical correlation was observed from Ki-67 with ER ($p=0.0017$), PR ($p=0.0003$) and Bcl-2 ($p=0.0003$) in the glands, although being weakly positive with ($r<0,5$) (data not shown).

When analyzing the stromal and glandular receptors Bcl-2, moderate to intense expression was found in 44.7% of stromal cells and 65.9% of the glandular cells. It was observed that the percentage of receptors in the stroma is greater when the expression is negative or weak. When the intensity of the expression is moderate or intense, there is a greater percentage of receptors found in the endometrial glands (Fig. 4).

The Bcl-2 receptors correlated with ER ($p=0.0354$), PR ($p=0.0105$) e Ki-67 ($p<0.0001$).

4. Discussion

In the histological endometrial evaluation, only four samples were found with proliferative characteristics. No correlation was found between the proliferative alterations and the serum levels of estradiol. Eighty-one samples presented endometrial atrophy, also without correlation with the estrogenic levels found. There were no statistical differences found between the analyzed receptors in the proliferative samples and the atrophic samples, probably due to their small number.

When all samples were analyzed, high concentrations and intense expression were found in the ER and PR. Evaluating the number of positive cells and the stained RE and RP, a direct relationship was observed between them, suggesting that the same stimulus is responsible for both formation as well as for the bond capacity of the receptors.

The ER and PR are specific nuclear receptors which are part of the super-family of steroid receptors [9]. The ER maintains the magnitude of its activity based on specific regions of the gene [12]. The formation of new ER [13] and its

concentration [14] may be related to self-regulation dependent on hormonal factors; however, its activation does not depend on hormonal presence [13].

For the PR, the high tissue expression does not correlate with the hormonal state found after menopause, where no progestational activity was observed. In fact, the PR concentration does not reflect the levels of circulating progesterone [10,15]. The induction of the formation of PR in the endometrial tissue is a consequence of mainly estrogenic stimulation. This stimulus in the formation of PR was demonstrated in a study which analyzed samples of atrophied endometrium, which observed an increase of PR expression after administration of vaginal estrogen [10].

It was observed that for the ER and PR, the glandular cells presented a more intense expression than the stromal cells, suggesting that the glandular cells present greater response to estrogenic stimulus than the stromal cells. In fact, when the expression of tissue receptors is more intense, the glandular cells present a greater percentage of positivity than the stromal cells. This greater glandular expression of the ER and PR was also observed in polyps and in the adjacent endometrium in other studies [16,17].

The high expressions of ER and PR found in the samples are possibly caused by the continuous effect of estrogens in the endometrium, even in levels considered low [1]. Not only the estrogen levels, but the extended action time in the target tissue could promote the formation of new endometrial receptors [13,14], being common after menopause the presence of high concentrations of ER and PR, even in endometrial samples with atrophy or with low proliferative activity.

The cellular proliferative activity in the endometrium was analyzed using the antigen Ki-67 and the apoptosis using the protein Bcl-2, and in the analyzed samples a high concentration of Ki-67 with positivity 75.3% was observed, mainly in the glandular cells, however these cells presented a small number of mitoses. In the samples of proliferative endometrium, high expressions of Ki-67 with a high number of mitoses was observed, however it was not possible to infer statistical correlation. It was observed that both the Ki-67 and the Bcl-2 correlated with ER and PR.

The variations in the expressions of Ki-67 and Bcl-2 suffer hormonal interference and may be observed during the menstrual cycle. The Ki-67 presents maximum expression at the end of the proliferative phase, when the serum levels of estrogen are high [18]. The intensity and the stain of the Bcl-2 also increase gradually, reaching its maximum expression at the end of the follicular phase [18]. It disappears in the glandular epithelium when the secretion characteristics appear, suggesting that that expression of Bcl-2 may be inhibited by progesterone [18].

In the atrophic endometrium, the number of apoptotic cells is greater, with smaller Bcl-2 expression than in the proliferative endometrium [19]. A greater expression of Bcl-2 was found in the atrophic endometrium in the glands with more uniform cellular positivity, intensity and staining, without any difference in relation with the endometrium with proliferation.

In hormone-responsive tissues, the hormonal stimulation, mainly through estrogen, would increase cellular survival, making it possible through the stimulation of Bcl-2, a greater risk of malign transformation of the cells [20]. In the endometrial hyperplasia and in the endometrial carcinoma the expression of Bcl-2 is greater than in the proliferative endometrium [20,21], suggesting that the estrogen is the hormone which would function first in the modeling of the expression of the Bcl-2 [20].

After menopause it is common to find positive ER and PR in the atrophic endometrium, however the samples containing proliferative activity present greater positivity for Ki-67 [1]. Gompel et al. (1994) observed that in the glands all cells presented positivity to Bcl-2, but only some for Ki-67, in such a way that the simultaneous expression for both proteins would occur only in some cells. Only 23.5% of the samples responded to both proteins in this study, demonstrating a strict relationship between the mechanisms of cellular proliferation and cellular death.

Through the assessment of the ER, PR receptors, Ki-67 and Bcl-2, a endometrial stimulus was observed, mainly in glandular cells, that even in postmenopausal women with atrophic endometriums, may have some activity that increases the risk of proliferative alterations.

5. References

- [1] Sivridis E, Giatromanolaki A. Proliferative activity in postmenopausal endometrium: the lurking potential for giving rise to an endometrial adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 2004;57:840-44.
- [2] Grodin JM, Stiiteri PK, Mac-Donald PC. Source of estrogen production in post-menopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1973;36:207-18.
- [3] Guthrie JR, Dennerstein L, Taffe JR, Ebeling PR, Randolph JF, Burger HG, et al. Central abdominal fat and endogenous hormones during the menopausal transition. *Fertil Steril* 2003;79(6):1335-40.
- [4] Akin F, Bastemir M, Alkis E, Kaptanoglu B. SHBG levels correlate with insulin resistance in postmenopausal women. *Europ J Intern Med* 2008;01-06.
- [5] Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2004;4:579-91.
- [6] Pichard C, Bureau GP. Insulin resistance, obesity and breast cancer risk. *Maturitas* 2008;60:19-30.
- [7] Brentani MM, Feldamn J. Receptores esteroídicos. In: Lima GR. & Baracat EC. *Ginecologia Endócrina*. São Paulo, SP: Atheneu, 1995:40-9.
- [8] Morito K, Hirose T, Kinjo J, Hirakawa T, Okawa M, Nohara T. Interaction of Phytoestrogens with Estrogen Receptors α and β . *Biol Pharm Bull* 2001;24:351-6.
- [9] Utsunomiya H, Suzuki T, Harada N, Kiyoshi I, Matsuzaki S, Konnor R, et al. Analysis of Estrogen Receptor α and β in Endometrial Carcinomas: Correlation with ER β and Clinicopathologic Findings in 45 Cases. *Int J Gynecol Pathol* 2000;19:335-41.
- [10] Brys M, Szylo K, Romanowicz-Makowska H, Dobrowolski Z, Maslowska I, Krajewska W. Expression of estrogen and progesterone receptor genes in endometrium, myometrium and vagina of postmenopausal women treated with estriol. *Sao Paulo Med J* 2009;127(3):128-33.
- [11] Meza-Muñoz DE, Fajardo ME, Perez-Luque EL, Malacara JM. Factors associated with estrogen receptors- α (ER- α) and - β (ER- β) and progesterone receptor abundance in obese and non obese pre- and post-menopausal women. *Steroids* 2006;71:498-503.

- [12] Speroff L. The estrogen receptor: changing concepts. Clinical lessons from molecular biology. In: Coutinho EM, Spinola P. *Reproductive medicine - a millennium review*. New York, NY: The Parthenon Publishing Group, 1999:155-61.
- [13] Punyadeera C, Verboost P, Groothuis P. Oestrogen and progestin responses in human endometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;84:393-410.
- [14] Lipsett MB. Hormônios Esteróides. In: Yen SSC, Jaffe RB. *Endocrinologia reprodutiva – fisiologia, fisiopatologia e tratamento clínico*. São Paulo, SP: Roca, 1999:135-47.
- [15] Yen SSC. Ciclo Menstrual Humano. In: Yen SSC, Jaffe RB. *Endocrinologia reprodutiva – fisiologia, fisiopatologia e tratamento clínico*. São Paulo, SP: Roca, 1999:193-227.
- [16] Lopes RG, Baracat EC, Albuquerque Neto LC, Ramos JFD, Yatabe S, Depes DB, Lippi UG. Analysis of estrogen- and progesterone-receptor expression in endometrial polyps. *J Min Inv Gyn* 2007;14:300-03.
- [17] Belisiário, MSN, Vassalo J, Andrade LALA, Alvarenga M, Pinto GA, Monteiro IMU. The expression of the hormone receptors in the endometrium and endometrial polyps in postmenopausal women and its relationship to body mass index. *Maturitas* 2006;53(1):114-18.
- [18] Gompel A, Sabourin JC, Martin A, Yaneva H, Audouin J, Decroix Y, et al. Bcl-2 Expression in Normal Endometrium during the Menstrual Cycle. *Am J Pathol* 1994;144-6.
- [19] Vaskivuo TE, Stenbäck F, Tapanainen JS. Apoptosis and Apoptosis-Related Factors Bcl-2, Bax, Tumor Necrosis Factor- α , and NF- $\kappa\beta$ in Human Endometrial Hyperplasia and Carcinoma. *Cancer* 2002;95:1463-71.
- [20] Bozdogan O, Atasoy P, Ereku S, Bozdogan N and Bayran M. Apoptosis-Related Proteins and Steroid Hormone Receptors in Normal, hyperplastic and Neoplastic Endometrium. *Int J Gynecol Pathol* 2002;21(4):375-82.
- [21] Kokawa K, Shikone T, Otani T, Nishiyama R, Ishii Y, Yagi S, Yamoto M. Apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 in hyperplasia and adenocarcinoma of the uterine endometrium. *Hum Reprod* 2001;16(10):2211-18.

Figures

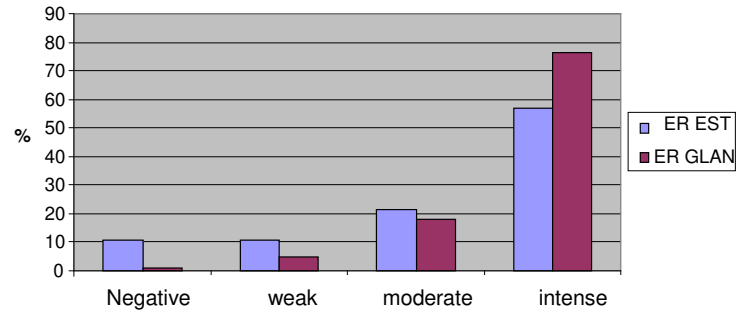


Figure 1. Percentage of cells expressed with estrogen receptor in the stroma and gland according to its expression.

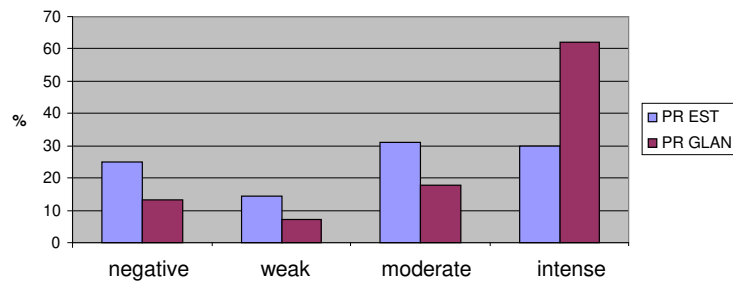


Figure 2. Percentage of cells expressed with progesterone receptors in the stroma and gland according to its expression.

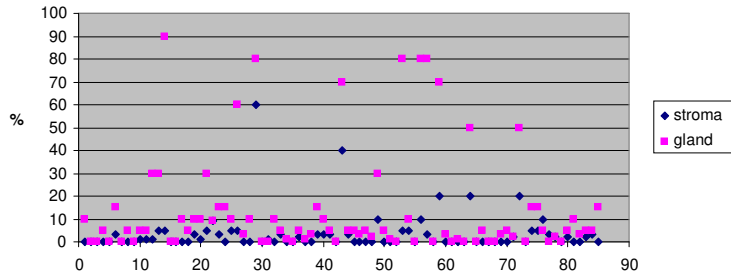


Figure 3. Percentage of cells expressed with Ki-67 in the stroma and gland.

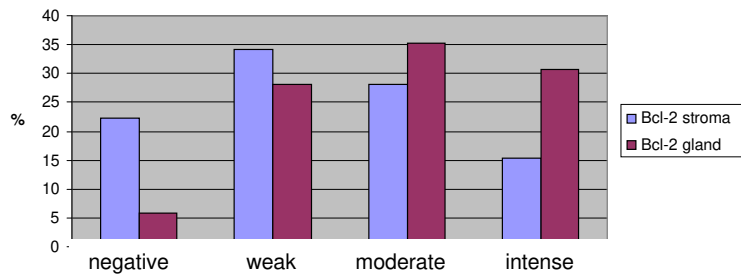


Figure 4. Percentage of cells expressed with Bcl-2 in the stroma and gland.

Tables

Table 1. Expression of estrogen, progesterone, Bcl-2 and Ki-67 receptors in proliferative endometrial samples

Case	Age	MP	E2	FSH	ER		PR		Bcl-2		Ki-67
					E	G	E	G	E	G	%
1	52	12	41,9	61,5	4	5	5	7	3	7	15
2	52	48	10,5	81,3	7	7	7	7	0	7	70
3	61	120	8,5	63,2	7	7	6	7	0	6	30
4	50	48	54	49	7	7	7	7	5	6	50

ER: estrogen receptors; PR: progesterone receptors; G: gland; E: estroma;
MP: menopause period; E2: estradiol; FSH: follicle stimulating hormone

Table 2. Expression of the estrogen receptors in the stroma and in the glands

Receptor	Expression			
	negative	weak	moderate	Intense
ER ^a stroma	8 (9,4)	10 (11,8)	18 (21,2)	49 (57,6)
ER gland	1 (1,2)	4 (4,7)	15 (17,6)	65 (76,5)

^aER: estrogen receptors

Table 3. Expression of progesterone receptors in the stroma and in endometrial glands







Receptor	Expression			
	negative	weak	moderate	Intense
PR ^a stroma	21(24,7)	12(14,1)	27 (31,8)	25 (29,4)
PR gland	11 (13)	6 (7,0)	16 (18,8)	52 (61,2)

^aPR: progesterone receptors

3.2. Artigo 2

MATURITAS  Contact us 
Help 

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#)

Action 	Manuscript Number 	Title 	Initial Date Submitted 	Status Date 	Current Status 
<p data-bbox="420 958 567 982">Action Links</p> <p data-bbox="180 982 714 1039">View Submission View Artwork Quality Results Send E-mail</p>		Correlation between steroid endometrial receptors, Ki-67 and Bcl-2 with body mass index in postmenopausal women	Jun 07, 2011	Jun 07, 2011	Submitted to Journal

CORRELATION BETWEEN STEROID ENDOMETRIAL RECEPTORS, KI-67 AND BCL-2 WITH BODY MASS INDEX IN POST-MENOPAUSAL WOMEN

Luis Paulo Galvão Wolff^{a1*} MD, Carolina de Souza Atti^a, José Vassallo^b PhD, Liliansa Aparecida De Ângelo Andrade^b PhD, Ilza Maria Urbano Monteiro^a PhD

^aDepartment of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (Unicamp/Brazil)

^bDepartment of Anatomical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (Unicamp/Brazil)

¹Supported by FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo).

The authors have not declared any conflict of interest.

*Corresponding author

Av. Fortunato Moreira, 255, Centro Pindamonhangaba/SP-Brasil

CEP: 12400-370

Tel: +55 12-9144-6477, Fax: +55 12-3645-5353

e-mail address: luis.wolff@bol.com.br

Abstract

Introduction: After menopause, there may exist a proportion of endometriums with weak proliferative patterns, probably in response to a constant and low estrogen stimulus. The endometrial proliferative lesions may be related to obesity after menopause. The objective of this study was to evaluate the body mass index (BMI) and to correlate the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), cellular proliferation antigen (Ki-67) and apoptosis (Bcl-2). **Methods:** Study of a cross section, with 85 post-menopausal women in the period from January to December 2010. An endometrial sample was collected and the ER, PR, Ki-67 and Bcl-2 were evaluated, and correlated with BMI. **Results:** the overweight and obesity indexes were 36.5% and 40% respectively. Great expression was observed in the endometrial glands of the ER (94.1%) and PR (80%). The ER and PR correlated with Ki-67 ($p=0.0017$ and $p<0.0001$) and Bcl-2 ($p=0.0354$ and $p=0.0427$) respectively. No statistical correlation of any receptor with BMI was found. **Conclusion:** There was a great tissue expression of the ER, PR, Ki-67 and Bcl-2, probably due to the continuous stimulus caused by synthesized estrogens through peripheral conversion in the adipose tissue, considering that the target population has presented a predominance of overweight and obesity.

Key words: Menopause, body mass index, steroid receptors, Ki-67 and Bcl-2.

1. Introduction

Diseases like cancer and endometrial polyps after menopause have been associated with many factors, among them obesity [1,2]. The mechanism through which obesity causes the occurrence of these diseases has not yet been totally clarified.

Although the endometrium after menopause is expected to be atrophied, there is an yet undefined proportion of women whose endometrium, despite seeming to be inactive, maintain a weak proliferative pattern, probably as a response to a constant and low estrogen stimulus [3]. This persistent stimulus may be a consequence of the peripheral conversion of androgens into estrogens in the adipose tissue [4].

In a study carried out with polyps and adjacent endometriums, an inverse correlation was observed between the body mass index (BMI) and estrogen receptors in the endometrial glands [1]. Through these results, this study proposes to evaluate the expression of estrogen (ER) and progesterone (PR), Ki-67 and Bcl-2 receptors in the endometrium of post-menopausal women and correlate the data with BMI.

2. Materials and methods

A study of a cross section of 85 post-menopausal women attended at the Center for Integral Women Health (Caism) from the State University of Campinas (Unicamp) and at the Municipal Hospital of São José dos Campos, in the period from January to December 2010. These women were indicated to gynecological surgery for benign diseases. The ages of the women included in this study ranged from 40 to 75 years. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Institution, and an informed consent was obtained from all participants. Menopause was confirmed through a serum dosage of the follicle stimulating hormone (FSH) >40 UI/L.

The correlation between ER, PR, Ki-67 and Bcl-2 and BMI was evaluated. Body mass index was categorized as normal from 18.5-24.9; overweight from 25.0-29.9; obesity GI from 30.0-34.9; obesity GII from 35.0-39.9; and obesity GIII \geq 40.0.

The endometrial tissue was collected during surgery and was properly prepared according to standard techniques, and to carry out the immunohistochemistry procedure, were used: primary monoclonal antibodies for ER (Dako® code M7047, clone 1D5, dilution 1:250); PR (Dako® code M3569, clone PgR 636, dilution 1:500); Bcl-2 (Biogen® code M887, dilution 1:200) and Ki-67 (Dako® code M7240, clone MIB1, dilution 1:1000). After the slides were prepared, the same pathologist was responsible for the reading and evaluation of all the fragments. The expressions of the ER, PR and Bcl-2 were evaluated in the stroma and in the endometrial glands in a semi-objective manner. Afterwards, they were categorized in accordance with the number of stained endometrial cells, and classified as absent (0), positivity until 25% (1), 26 to 50% (2), 51 to 75% (3), and over 76% (4). For cellular stained intensity, it was classified as absent (0), staining slightly positive (1), moderately positive (2) and strongly positive (3).

The sum of positivity and intensity points was carried out so, that for each tissue segment, stroma and gland, the expression of the receptors was defined as 0 (negative), 2 and 3 (weak), 4 and 5 (moderate) and 6 and 7 (intense).

The reading of the Ki-67 was carried out through a semi-objective evaluation, according to the percentage of endometrial, stromal and glandular cells which were stained.

The statistical analyses were carried out using Pearson's correlation index for dependent variables and their correlations, and Spearman's correlation index to determine the strength of the linear relation between the two variables, having been considered a level of significance of 5%. The statistical software from the SAS Institute Inc. (SAS/STAT Release 8.2, Cary NC, USA) was used.

3. Results

Eighty-five women were evaluated, with average age of 56.8 years (SD=6.5 years) and an average menopause time of 81.5 months (SE=6.39 months). The average BMI was 29.2, with an overweight rate of 36.5% and obesity GI, 27%, GII 9.4%, and GIII 3.6%.

The ER and the PR were expressed in almost all samples on the glandular portion and with smaller frequency in the stromal portion. In cases where intensity was greater, there was prevalence of expression in the glandular portion, and when the intensity was smaller the expression was greater in the stromal portion (Table 1).

There was no statistical correlation between BMI with the ER and PR (Table 2). Although 75.3% of the samples presented positive expression for Ki-67, the number of cells under mitosis rarely exceeded 10%. The expression of the Ki-67 was greater in the glands than in the stroma (data not shown).

The expression of the receptors Bcl-2 was also present in almost all samples (moderate and intense in 44.7% in the stroma and 65.9% in the glands), being that the greater the intensity of the expression, the greater the participation of the glandular component.

The expression of the ER was similar in several BMI categories (Fig. 2). The same was observed in relation to the PR, Ki-67 and Bcl-2 (data not shown). A statistical correlation was observed between ER and Ki-67 ($p=0.0017$) and Bcl-2 ($p=0.0354$), and between PR and Ki-67 ($p<0.0001$) and Bcl-2 ($p=0.0427$) (data not shown).

4. Discussion

No correlation between BMI and the analyzed receptors was found in this study. However, when the distribution of these receptors was analyzed according to BMI, it was observed that the percentage of positive cells increases proportionally, as does the receptor expression in the tissue. This takes place in all BMI categories in a similar manner, suggesting that this parameter may not be adequate to evaluate endometrial alterations. At any rate, maybe a statistical correlation of receptors was not found due to the high BMI of the women in the study.

High concentrations and intense expression of ER and PR were observed in the atrophied endometrial samples. Evaluating the number of positive cells and the intensity of the stain of the ER and RP, a direct relationship was formed between them, suggesting that there is a common stimulus responsible for the both the formation as well as the intensity and the binding capacity of the receptors. In

fact, the ER are specific nuclear receptors which have the capacity to form new receptors, depending on hormonal levels [8], in such a way that the ER and RP expression, mainly in the glands, demonstrated that even in the atrophied endometrium after menopause there may exist hormonal activity, not being uncommon to find weak tissue proliferation in this phase [3]. This endometrial activity after menopause was observed in obese women, many times asymptomatic [9], possibly caused by the continuous effect of estrogens in the endometrium even under levels considered low. In fact, not only the estrogen levels, but the extended time of contact with the target tissue could promote the formation of new endometrial receptors [8,10].

On the other hand, the high tissue expression of the RP does not correlate with the hormonal state found after menopause, where no progestin action was observed, being that the RP concentrations do not reflect the levels of circulating progesterone [11]. The induction of formation of RP in the endometrial tissue is mainly brought about through estrogen stimulation. This stimulus in the formation of RP was demonstrated in a study which analyzed samples of atrophied endometrium, which observed an increase in the expression of RP after administration of vaginal estrogen [12].

We evaluated the endometrial cellular mitosis by Ki-67 antigen and apoptosis by Bcl-2 protein and observed high expression of Ki-67, with 75,3% positivity cells, mainly in the glandular compartment. However these cells presented a small number of mitoses. It was observed that the Ki-67 as well as Bcl-2, correlated themselves with the ER and PR, which was also observed during the menstrual cycle, were the expression of Bcl-2 and its location presented similar variation and distribution to the ER and PR [13].

In the atrophied endometrium, the number of apoptotic cells is larger, with smaller expression of Bcl-2 than in the proliferative endometrium [14]. In hormone-responsive tissues, the estrogen stimulation increases cellular survival, allowing through the Bcl-2 stimulation, increase the risk of malign transformation of cells [15]. Therefore, the cyclical alterations of apoptosis in a normal endometrium suggest that the hormonal levels of estrogen and progesterone regulate the signs which

result in apoptosis [15,16,17], being that the high expression of Bcl-2 found, even in the atrophied endometrium, suggests estrogen stimulation.

In fact, the estradiol bonds itself to its receptor resulting in a proliferative effect in the tissue and apoptosis inhibition by Bcl-2 [15]. Gompel et al. [1994] observed that in the endometrial glands, all the cells presented positivity to Bcl-2, but only some for Ki-67, so that the simultaneous expression for both proteins occurred only in some cells. This study has determined that only 23.5% of the samples presented expression for both proteins. The coexistence of the expression of Bcl-2 and Ki-67 in the endometrium is not totally clarified, but in the menstrual cycle the maximum simultaneous positivity for both proteins took place in the glandular epithelium at the end of the proliferative phase [13], the period in which the estrogen levels are at their highest.

After menopause it is common to find positive ER and RP in the atrophied endometrium, however only the samples which contained some proliferative activity presented positivity to Ki-67 [3].

Through the evaluation of ER, RP of the factor Ki-67 and Bcl-2, it was observed that the continuous stimulus caused by the estrogens, even at low levels [3], may exceed the stimulation action mainly in the glandular cells. No statistical correlation was established between overweight and obesity with the expression of endometrial receptors, however the high BMI found, associated with the great tissue expression in steroid receptors, Ki-67 and Bcl-2, allows some inference between obesity and endometrial stimulation after menopause.

5. References

- [1] Belisiário, MSN, Vassallo J, Andrade LALA, Alvarenga M, Pinto GA, Monteiro IMU. The expression of the hormone receptors in the endometrium and endometrial polyps in postmenopausal women and its relationship to body mass index. *Maturitas* 2006;53(1):114-18.
- [2] Schapira DV, Kumar NB, Lyman GH, Cavanagh D, Roberts WS, Lapolla J. Upper-body fat. Distribution and endometrial cancer. *J Am Med Assoc* 1991;266:1808-11.
- [3] Sivridis E, Giatromanolaki A. Proliferative activity in postmenopausal endometrium: the lurking potential for giving rise to an endometrial adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 2004;57:840-44.
- [4] Pichard C, Bureau GP. Insulin resistance, obesity and breast cancer risk. *Maturitas* 2008;60:19-30.
- [5] World Health Organization. Media centre—Obesity and overweight (on line) (2011). [Access in May 2nd, 2011]. Available at: URL: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/
- [6] Brazil. Health Secretariat. National Health Council. Resolution n° 196/96 about Research Regulatory Norms Involving Human Beings, Brasilia (DF). Available at: <http://conselho.saude.gov.br/resoluções/1996/Reso196.doc>. Access in July 13th, 2010.
- [7] World Medical Association. Declaration of Helsinki: Recommendations Guiding Physicians in Biomedical Research Involving Human Subjects. Somerset West, Republic of South Africa, 2000.
- [8] Punyadeera C, Verbost P, Groothuis P. Oestrogen and progestin responses in human endometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;84:393-410.
- [9] Gouveia DAC, Bahamondes L, Aldrighi JM, Tamanaha S, Ribeiro AL, Aoki T. Prevalência de Lesões Endometriais em Mulheres Obesas Assintomáticas. *Rev Assoc Med Bras* 2007; 53(4):344-8.

- [10] Lipsett MB. Steroid Hormones. In: Yen SSC, Jaffe RB. *Endocrinologia reprodutiva – fisiologia, fisiopatologia e tratamento clínico*. São Paulo, SP: Roca, 1999:135-47.
- [11] Yen SSC. Human Menstrual Cycle. In: Yen SSC, Jaffe RB. *Endocrinologia reprodutiva – fisiologia, fisiopatologia e tratamento clínico*. São Paulo, SP: Roca. 1999;(8):93-227.
- [12] Brys M, Szylo K, Romanowicz-Makowska H, Dobrowolski Z, Maslowska I, Krajewska W. Expression of estrogen and progesterone receptor genes in endometrium, myometrium and vagina of postmenopausal women treated with estriol. *Sao Paulo Med J* 2009;127(3):128-33.
- [13] Gompel A, Sabourin JC, Martin A, Yaneva H, Audouin J, Decroix Y, et al. Bcl-2 Expression in Normal Endometrium during the Menstrual Cycle. *Am J Pathol* 1994;144-6.
- [14] Vaskivuo TE, Stenbäck F, Tapanainen JS. Apoptosis and Apoptosis-Related Factors Bcl-2, Bax, Tumor Necrosis Factor- α , and NF- κ B in Human Endometrial Hyperplasia and Carcinoma. *Cancer* 2002;95:1463-71.
- [15] Bozdogan O, Atasoy P, Ereku S, Bozdogan N and Bayran M. Apoptosis-Related Proteins and Steroid Hormone Receptors in Normal, hyperplastic and Neoplastic Endometrium. *Int J Gynecol Pathol* 2002;21(4):375-82.
- [16] Zubor P, Hatok J, Galo S, Dokus K, Klobusiakova D, Danko J, Racay P. Anti-apoptotic and pro-apoptotic gene expression evaluated from eutopic endometrium in the proliferative phase of the menstrual cycle among women with endometriosis and healthy controls. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;145:172-76.
- [17] Castro A, Johnson MC, Anido M, Cortinez A, Glaber F, Vega M. Role of nitric oxide and bcl-2 family genes in the regulation of human endometrial apoptosis. *Fertil Steril* 2002;78(3):587-595.

Figures

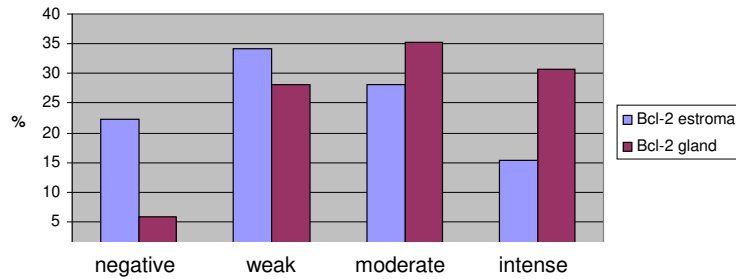
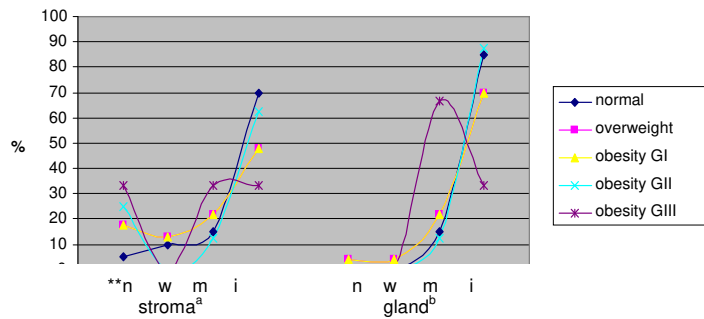


Figure 1. Percentage of cells with Bcl-2 expression in the stroma and in the glands according to tissue distribution.



*BMI: Body Mass Index

**n: negative, w: weak, m: moderate: i: intense

^a (p= 0.2849), ^b (p=0.6418)

Figure 2. Percentage of cells with estrogenic receptor expression in the stroma and in the glands according to BMI* categories.

Tables

Table 1. Expression of estrogen and progesterone receptors in the stroma and glands

Receptor	Expression			
	negative	weak	moderate	Intense
ER ^a stroma	8 (9,4)	10 (11,8)	18 (21,2)	49 (57,6)
ER gland	1 (1,2)	4 (4,7)	15 (17,6)	65(76,5)
RP ^b stroma	21(24,7)	12(14,1)	27 (31,8)	25 (29,4)
RP gland	11 (13)	6 (7,0)	16 (18,8)	52 (61,2)

^aER: estrogen receptors

^bRP: progesterone receptors

Table 2. Correlation between the expression of estrogen receptors (ER) and body mass index (BMI) in the stroma and in the glands

BMI ^a	n ^b	ER* Stroma				ER** Gland		
		w	m	i	n	w	m	i
Normal	1 (5)	2 (10)	3 (15)	14 (70)	0	0	3 (15)	17 (85)
Overweight	2 (6,4)	4 (12,9)	8 (25,9)	17 (54,8)	1 (3,2)	3 (9,7)	4 (12,9)	23 (74,2)
Obesity GI	4 (17,4)	3 (13)	5 (21,7)	11 (47,8)	1 (4,3)	1 (4,3)	5 (21,7)	16 (69,6)
Obesity GII	2 (25)	0	1 (12,5)	5 (62,5)	0	0	1 (12,5)	7 (87,5)
Obesity GIII	1(33,3)	0	1 (33,3)	1 (33,3)	0	0	2 (66,6)	1 (33,3)

*a ($p= 0.2849$), **a ($p=0.6418$)

^bn=negative, w=weak, m=moderate, i=intense

3.3. Artigo 3

JAMA

[MANUSCRIPT HOME](#) [AUTHOR INSTRUCTIONS](#) [REVIEWER INSTRUCTIONS](#) [HELP](#) [TIPS](#) [LOGOUT](#) [JOURNAL HOME](#)

Author's Decision

Thank you for approving "Correlation between steroid endometrial receptors, Ki-67 and Bcl-2 with insulin resistance after menopause".

Detailed Status Information

Manuscript #	JAMA11-3790
Current Revision #	0

CORRELATION BETWEEN STEROID ENDOMETRIAL RECEPTORS, KI-67 AND BCL-2 WITH INSULIN RESISTANCE AFTER MENOPAUSE

Luis Paulo Galvão Wolff^{a1*} MD, José Vassallo^b PhD, Cristina Laguna Benetti Pinto^a PhD, Luis Guillermo Bahamondes^a PhD, Ilza Maria Urbano Monteiro^a PhD

^aDepartment of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (Unicamp/Brazil)

^bDepartment of Anatomical Pathology, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas (Unicamp/Brazil)

The authors have not declared any conflict of interest.

¹Corresponding author

Av. Fortunato Moreira, 255, Centro Pindamonhangaba/SP-Brasil

CEP: 12400-370

Tel: +55 12-9144-6477, Fax: +55 12-3645-5353

e-mail address: luis.wolff@bol.com.br

*Supported by FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo).

Abstract

Introduction: After menopause, gain weight and fat deposits distribution may be altered, with predominance of abdominal fat. The abdominal fat has been correlated with the surge of metabolic and neoplastic diseases. In the endometrium, proliferative lesions precursors to cancer may be mediated by steroid endometrial receptors. The objective of this study was to evaluate the association between steroids receptors, proliferation and apoptosis factors and the presence of insulin resistance (IR) in women after menopause. **Methods:** Study of a cross section, from January to December 2010, with 85 postmenopausal Brazilian women. An endometrial sample was collected and the estrogenic (ER) progestogenic (PR) and insulin growth factor-1 (IGF-1R) receptors, Ki-67 and Bcl-2 were evaluated, and were correlated with IR. **Results:** There was great expression in the endometrial glands of the ER (94.1%), PR (80%) and IGF-1R (78.8%), and correlation between the HOMA-IR index and the stromal ER ($p=0.378$) and PR ($p=0.0083$). Correlation between ER and PR with Ki-67 and Bcl-2 ($p<0.05$) was observed. **Conclusion:** The results obtained indicate that IR may stimulate the expression of endometrial receptors, contributing to the increase of the risk of endometrial proliferative diseases.

Key words: Menopause, insulin resistance, steroid receptors, Ki-67 and Bcl-2.

Introduction

Obesity and overweight are a public health problem with elevated mortality rate and are associated with several diseases [1,2]. After menopause, gain weight and distribution of these fat deposits may be altered, with predominance of abdominal fat deposits [3]. The abdominal fat is related to the surge of metabolic and neoplastic diseases [4], and among the gynecological neoplasias, the most frequent are breast and endometrium [5,6]. The proposed mechanisms to associate obesity and the risk of cancer are controversial, and the most evident are related to endocrinal and metabolic alterations promoted by the adipose tissue [7]. The endocrinal factors are related with the production of estrogens resulting from the conversion of androgens in the adipose tissue [8,9]. The metabolic effects are related with hyperinsulemia, mediated by insulin growth factor (IGF-1) [7].

The endocrinal effects take place when, in the adipose tissue, mainly in the abdominal region, androstenedione and testosterone are converted into estrone and estradiol [10,11]. In obese and overweight women, there is a reduction of the steroid hormone binding globulin (SHBG) [12], promoting an increase of free estrogens and androgens.

The metabolic effects are a consequence to chronic hyperinsulinemia, which bring about a reduction of the serum concentration of the IGF bonding protein-1 (IGFBP-1) and of the IGF bonding protein-2 (IGFBP-2), increasing the bioavailability of free IGF-1 [6]. The IGF-1 exerts its action through IGF-1R, having been found increased expression of IGF-1R in endometrial tumors [14]. After analysis of the relation between estrogen receptor (ER) and IGF-1R, it was observed that in tumors with positive ER the expression of the IGF-1R was greater than in tumors with negative ERs [15]. After menopause, contrary to expectations, the endometrium may present weak proliferative activity [16]. High expressions of the ER were found in the atrophied endometrium [17] demonstrating that even in this period, there may be hormonal stimulation, probably due to the continuous action of low estrogen levels [16].

Although the endometrium after menopause may present elevated concentrations of ER, the proliferative capacity depends on the presence of the protein Ki-67 [16]. The Ki-67 is a protein expressed in tissues with mitogenic

activity, indicating tissue proliferation [18]. The increase in the expression of Ki-67 is found during the proliferative phase of the normal menstrual cycle, demonstrating dependent hormonal regulation [18].

During this phase, expression of Bcl-2 is also found, and this protein is related with cellular apoptosis [16,19]. Its cyclical expression throughout the menstrual cycle suggests that Bcl-2 alterations take place following hormonal variations, and may exert important role in the surge of hormone-dependant tumors [19].

Several other factors are implied in endometrial response, but there still are doubts in respect to the relationship among hormonal alterations, hyperinsulemia and the risk of developing neoplasias, as well as the mechanisms involved in these relationships. The objective of this study was to evaluate the factors related to endometrial stimulation and cellular apoptosis, as well as the interaction of ER and IGF-1R with the metabolic state of the women, and the mechanisms involved in these relationships which may elevate the risk of developing endometrial neoplasias.

Materials and methods

This was a descriptive study of a cross section, carried out in the period from January to December 2010 at the Center for Integral Women Health (Caism) from the State University of Campinas (Unicamp) and at the Municipal Hospital of São José dos Campos. Postmenopausal women who were indicated to gynecological surgery for benign diseases were invited to participate in this study. The ages of the women included in this study ranged from 40 to 75 years, and an informed consent was obtained from all participants. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Institution. Menopause was confirmed through a serum dosage of the follicle stimulating hormone (FSH) >40 UI/L.

The correlation between the ER, progesterone receptor (PR), IGF-1R, Ki-67 and Bcl-2 with insulin resistance (IR) was evaluated using HOMA-IR index and abdominal circumference (AC). The HOMA-IR index normal values are below 2.7 [20] and AC below 88 cm [20].

The endometrial tissue sample was obtained at the moment of surgery in a region without macroscopic lesions. It was properly prepared under standard

techniques, and to carry out the immunohistochemistry procedure were used: primary monoclonal antibodies for ER (Dako® code M7047, clone 1D5, dilution 1:250), PR (Dako® code M3569, clone PgR 636, dilution 1:500) Receptor IGF-1 (Genetex® USA GTX24065, dilution 1:15), Bcl-2 (Biogen® code M887, dilution 1:200) and Ki-67 (Dako® code M7240, clone MIB 1, dilution 1:1000). After the slides were prepared, the same pathologist was responsible for analyzing all the fragments in an optic microscope under 400X magnification. The expression of the ER, IGF-1R and Bcl-2 were evaluated in the stroma and in the endometrial cells in a semi-objective manner. Afterwards, they were categorized as follows: the number of stained endometrial cells was classified as absent (0); positivity until 25% (1); positivity from 26–50% (2); positivity from 51–75% (3); and positivity above 76% (4). The intensity of cellular staining was classified as absent (0); stain slightly positive (1); moderately positive (2); and strongly positive (3).

The expression of the receptors in the tissues depends on the number of positive cells and on the intensity in which they stain. The positivity and intensity was analyzed, and the sum of these points was carried out so that for every tissue segment, stroma and gland, the expression of the receptors was 0 (negative); 2 and 3 (weak); 4 and 5 (moderate), and 6 and 7 (intense). The readings were carried out in semi-objective manner, according to the percentage of endometrial, stroma and glandular cells which were stained after evaluation of all fields in all fragments, with an optic microscope under 400X magnification.

A statistical analysis was carried out using Pearson's correlation index for dependent variables and their correlations, and Spearman's correlation index to determine the strength of the linear relation between two variables, having been considered a level of significance of 5%. The statistical software from the SAS Institute Inc. (SAS/STAT Release 8.2, Cary NC, USA) was used.

Results

A total of 85 women were evaluated. The average age was 56.8 years (SD=6.5) and average menopause time of 81.5 months (EP=6.4). In the IR

analysis, there were 31 women (36.5%) with HOMA-IR index above 2.7. The average HOMA-IR index was 3.6 (SE=6.5).

Analyzing the endometrial receptors, there was great expression of the ER, PR, IGF-IR in the stroma as well as in the glands. When the tissue expression of the ER was evaluated, it was observed that the cells were stained in a moderate and intense manner in 78.8% in the stroma and in 92.2% in the endometrial glands. They were negative or weakly stained in 21.2% of the samples in the stroma and in 5.9% in the glands. The PR presented moderate and intense expression in 61.2% in the stroma samples and 80% in the glands. The PR expression was negative or weak in 38.8% in the stroma and 20% in the glands. The ER and PR presented greater expression in the group with enhanced HOMA-IR (Table 1), except for RE glandular expression.

Analyzing IGF-1R, moderate and intense expression was observed in 57.6% in the stroma and in 78.8% in the glands, 42.4% of the stroma and 21.2% gland samples presented negative or weak expression. In the proportion analysis of positive cells, and stain intensity of the IGF-1R, in the stroma as well as in glandular cells, it was observed that similar to the ER, the greater the positivity, the greater the intensity of the stain (data not shown).

Similar to the ER, when the expression of the IGF-1R was negative, weak or moderate, the stroma presented greater percentage of receptors; however, when the IGF-1R expression was intense, the glandular cells presented a greater percentage of receptors (data not shown). Correlation was found between the levels of expression between IGF-1R and ER ($p=0.025$) in the stroma.

No statistical correlation was found in the IGF-1R with HOMA-IR ($p=0.7932$), but correlation was observed with AC ($p=0.0080$) in the glands. The glandular PR also correlated with AC ($p=0.0261$). Table 2 demonstrates the correlations between RP, IGF-1R and AC.

Inverse correlation of the IGF-1R was observed with levels of serum estrogen ($p=0.0410$) ($r=-0.224$) (data not shown).

In 75.3% of the samples, it was observed that the Ki-67 presented some expression. However, even with positive expression, the number of cells under

mitosis was rarely over 10%. The expression of the Ki-67 was greater in the glands than in the stroma (Fig. 1).

Statistical correlation was observed between ER and Ki-67 ($p=0.0253$) and Bcl-2 ($p=0.0354$), although weakly positive ($r<0.5$), and there was no correlation between Ki-67 and IGF-1R ($p=0.420$).

Analyzing the stromal and glandular expression of Bcl-2, 44.7% of moderate and intense expression was found in the stroma and 65.9% of moderate and intense expression was found in the glandular cells. No significant correlation was found between Bcl-2 and any other variable in this study.

Discussion

In this study, women after menopause with IR, evaluated through a HOMA-1R index, presented greater endometrial expression of the ER and PR. In the clinical evaluation through AC, correlation between the expressions of glandular PR and IGF-1R was observed, suggesting that IR may bring about endometrial stimulation. In the atrophied endometrium samples, there was high concentration and intense expression of ER. Evaluating the number of positive cells and the intensity of the stain of the ER, a direct correlation between them was found, suggesting that the same stimulus is responsible for both the formation as well as the intensity of the bonding capacity of the receptors.

The ER are specific nuclear receptors which have the capacity to promote the formation of new ER related to hormonal factors, however, its activation is independent of hormonal presence [22]. The high expressions of ER found in the samples are probably caused by the continuous effect of the estrogens in the endometrium, even in levels considered low.

During perimenopause there are changes in the pattern of fat deposits with an increase of adipose tissue in the abdominal region [23,24]. This abdominal fat is clinically evaluated through the measure of AC relates with hyperinsulinemia interfering with hormonal production [12]. After menopause there is a persistent androgen production for a few years, influenced by factors such as age and weight. These androgens suffer peripheral conversion in the adipose tissue with

estrogen formation (9). Similarly, obesity and hyperinsulinemia increase free serum steroids due to the decrease of SHBG [12]. In fact, the SHBG levels correlate with the levels of estrogens [3,12].

Not only the estrogen levels, but the extended time of exposure in the target tissue could promote the formation of new endometrial receptors [24,26], so that it is not uncommon to find weak proliferative activity in the atrophied endometrium [16].

A great expression of IGF-1R was also observed mainly in the endometrial cells, inversely to the serum levels of estradiol. It was demonstrated during a study with postmenopausal women submitted to bilateral oophorectomy a significant increase of IGF, suggesting that this increase is a result of hypoestrogenism [26].

When the IR is analyzed through the HOMA-IR index and AC, it was observed that the expression of the IGF-1R only correlated with AC. However, Papaxoinis et al. (2007), when evaluating IR markers did not find any isolated marker associated with the increase of expression of the IGF-1R.

It was observed that the expression of the IGF-1R is also related with the RE expression. In a study with neoplastic cells presenting positive ER, it was observed that IGF-1R stimulation induces cellular proliferation [27]. Similarly, in tumors with positive ER, the expression of the IGF-1R was greater than with negative ER. In fact, the observation that the IGF-1R and the steroid receptors presented similar expression suggests that there is a common regulator for these receptors [15].

A combined and reciprocal action of estrogens and IGF-1 was observed in order to promote mitogenic effects in the cells [13]. In tissues presenting ER expression were observed anti-apoptotic effects of the IGF-1 and an increase of the expression IGF-1R [27], so that the IGF-1 also may bring forth cellular alterations such as mitogenesis, favoring tumor formation.

The cellular mitoses in the endometrium were evaluated through the use of Ki-67 and cellular apoptosis through the protein Bcl-2, and it was observed in the analyzed samples a high expression of the Ki-67 with 75.3% positivity, mainly in the glandular cells. In spite of the high expression of the Ki-67, the percentage of cells

under mitosis found in the tissue was small. It was observed that the Ki-67 as well as the Bcl-2 correlated with the ER, but not with the IGF-1R. During the menstrual cycle changes of expression of Bcl-2 were also observed, suggesting that its regulation is mediated by the hormonal levels of estrogen and progesterone [28,29,30].

In the atrophied endometrium, the number of apoptotic cells is larger, with smaller expression of the Bcl-2 than in the proliferative endometrium [31]. A greater expression of Bcl-2 was found in the glands with more uniform positivity and cellular staining, suggesting that the pattern of expression of the Bcl-2 in premenopause is due to cyclical hormonal alterations which are not found after menopause.

In the endometrial hyperplasia and in the endometrial carcinoma the Bcl-2 expression is greater than in the proliferative endometrium [30,32]. In fact, the estradiol bonds itself to its receptor, resulting in a proliferative effect in the tissue and inhibition of apoptosis by Bcl-2 [30].

After menopause it is common to find positive ER in the atrophied endometrium, however, only the samples containing some proliferative activity presented positivity to Ki-67 [16]. The Bcl-2 is an important anti-apoptotic factor, related to the susceptibility of cells to enter apoptosis, promoting a renewal of endometrial cells [29]. In hormone-responsive tissues, the estrogen stimulation increases cellular survival, allowing through Bcl-2 stimulation, an increase of the risk of malign transformation of cells [30].

Through the evaluation of ER, IGF-1R and the Ki-67 factor and Bcl-2 and their correlation with the insulin resistance indexes, we suggest that the continuous stimulus caused by the estrogens, even at levels considered low [16], associated with hyperinsulinemia, acted together in the endometrium, perhaps causing its stimulation.

References

- [1] Stein C, Colditz GA. The Epidemic of Obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(6):2522-25.

- [2] Raskin DBF, Pinto-Neto AM, Paiva LHSC, Raskin A, Martinez Z. Fatores Associados à Obesidade e ao Padrão Andróide de Distribuição da Gordura Corporal em Mulheres Climatéricas. *RBGO* 2000;22(7):435-441.
- [3] Guthrie JR, Dennerstein L, Taffe JR, Ebeling PR, Randolph JF, Burger HG, et al. Central abdominal fat and endogenous hormones during the menopausal transition. *Fertil Steril* 2003;79(6):1335-40.
- [4] Chen YL, Cheng WF, Lin MC, Huang CY, Hsieh CY, Chen CA. Current Endometrial Carcinoma in Patients with a Curettage Diagnosis of Endometrial Hyperplasia. *J Formos Med Assoc* 2009;108(6):502-7.
- [5] Linkov F, Edwards R, Balk J, Yurkovetsky Z, Sadterman B, Lokshin A, et al. Endometrial hyperplasia, endometrial cancer and prevention: Gaps in existing research of modifiable risk factors. *Eur J Cancer* 2008;44:1632-44.
- [6] Renehan A, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 2008;371:569-78.
- [7] Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Canc* 2004;4:579-91.
- [8] American Cancer Society. Cancer Facts & Figures. (online) 2010. [Available at: URL :www.cancer.org/acs/groups/content/@nho/documens/acspc-024113.pdf. Acess in July 13, 2010.
- [9] Grodin JM, Stiiteri PK, Mac-Donald PC. Source of estrogen production in post-menopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1973;36:207-18.
- [10] Parslov M, Lidegaard O, Klintorp S, Pedersen B, Jonsson L, Eriksen PS, Ottesen B. Risk factors Amon Young women writ endometrial câncer: A Danish case-control study. *Am J Obstet Gynecol.*2000;182(1):23-29.
- [11] MacDonald PC, Edman CD, Hemsell DL, Porter JC, Siiteri PK. Effect of. Obesity in convert of. Plasma androstenedione to estrone in postmenopausal women with and without endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 1978; 130:448.
- [12] Akin F, Bastemir M, Alkis E, Kaptanoglu B. SHBG levels correlate with insulin resistance in postmenopausal women. *Europ J Intern Med* 2008;01-06.

- [13] Pichard C, Bureau GP. Insulin resistance, obesity and breast cancer risk. *Maturitas*. 2008;60:19-30.
- [14] Papaxoinis K, Patsouris E, Kittas C, Nicolopoulou-Stamati P. Insulinlike growth factor I receptor and estrogen receptor β expressions are inversely correlated in colorectal neoplasms and affected by the insulin resistance syndrome. *Hum Pathol* 2007;38:1037-46.
- [15] Peyrat JP, Bonnetterre J, Beuscart R, Djiane J, Demaille A. Insulin-like Growth Factor 1 Receptors in Human Breast Cancer and Their Relation to Estradiol and Progesterone Receptors. *Cancer Res* 1988;48:6429-33.
- [16] Sivridis E, Giatromanolaki A. Proliferative activity in postmenopausal endometrium: the lurking potential for giving rise to an endometrial adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 2004;57:840-44.
- [17] Brys M, Szylo K, Romanowicz-Makowska H, Dobrowolski Z, Maslowska I, Krajewska W. Expression of estrogen and progesterone receptor genes in endometrium, myometrium and vagina of postmenopausal women treated with estriol. *Sao Paulo Med J* 2009;127(3):128-33.
- [18] Taylor LJ, Jackson TL, Reid JG, Duffy SRG. The differential expression of oestrogen receptors, progesterone receptors, Bcl-2 and Ki67 in endometrial polyps. *Int J Obstet Gynaecol* 2003;110:794-8.
- [19] Gompel A, Sabourin JC, Martin A, Yaneva H, Audouin J, Decroix Y, et al. Bcl-2 Expression in Normal Endometrium during the Menstrual Cycle. *Am J Pathol* 1994;144-6.
- [20] Geloneze B, Vasques ACJ, Stabe CFC, Pareja JC, Rosado LEFPL, Queiroz EC, et al. HOMA1-IR and HOMA2-IR indexes in identifying insulin resistance and metabolic syndrome – Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS). *Arq Bras Endocrinol Metab* 2009;53(2):281-87.
- [21] Ross R, Freeman J, Hudson R, Janssen I. Abdominal Obesity, Muscle Composition, and Insulin Resistance in Premenopausal Women. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(11):5044-51.
- [22] Punyadeera C, Verboost P, Groothuis P. Oestrogen and progestin responses in human endometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;84:393-410.

- [23] Austin H, Austin JM, Partridge EE, Hatch KD, Shingleton HM. Endometrial cancer, obesity, and body fat distribution. *Cancer Res* 1991;51:568-72.
- [24] Svendsen OL, Hassager C, Christiansen. Age- and Menopause-Associated Variations in Body Composition and Fat Distribution in Healthy Women as Measured by Dual-Energy X-Ray Absorptiometry. *Metabolism* 1995;44(3):369-373.
- [25] Lipsett MB. Hormônios Esteróides. In: Yen SSC, Jaffe RB. *Endocrinologia reprodutiva – fisiologia, fisiopatologia e tratamento clínico*. São Paulo, SP: Roca; 1999:135-47.
- [26] Fogle RH. Increased insulin-like growth factor-1 after oophorectomy in postmenopausal women. *Fertil Steril* 2008;90(4):1236-39.
- [27] Bartucci M, Morelli C, Mauro L, Ando S, Surmacz E. Differential Insulin-like Growth Factor I Receptor Signaling and Function in Estrogen Receptor (ER)-positive MCF-7 and ER-negative MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Cancer Res* 2001;61:6747-54.
- [28] Zubor P, Hatok J, Galo S, Dokus K, Klobusiakova D, Danko J, Racay P. Anti-apoptotic and pro-apoptotic gene expression evaluated from eutopic endometrium in the proliferative phase of the menstrual cycle among women with endometriosis and healthy controls. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009;145:172-76.
- [29] Castro A, Johnson MC, Anido M, Cortinez A, Glaber F, Vega M. Role of nitric oxide and bcl-2 family genes in the regulation of human endometrial apoptosis. *Fertil Steril* 2002;78(3):587-595.
- [30] Bozdogan O, Atasoy P, Erekul S, Bozdogan N and Bayran M. Apoptosis-Related Proteins and Steroid Hormone Receptors in Normal, hyperplastic and Neoplastic Endometrium. *Int J Gynecol Pathol* 2002;21(4):375-82.
- [31] Vaskivuo TE, Stenbäck F, Tapanainen JS. Apoptosis and Apoptosis-Related Factors Bcl-2, Bax, Tumor Necrosis Factor- α , and NF- $\kappa\beta$ in Human Endometrial Hyperplasia and Carcinoma. *Cancer* 2002;95:1463-71.
- [32] Kokawa K, Shikone T, Otani T, Nishiyama R, Ishii Y, Yagi S, Yamoto M. Apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 in hyperplasia and adenocarcinoma of the uterine endometrium. *Hum Reprod* 2001;16 (10):2211-18.

Figures

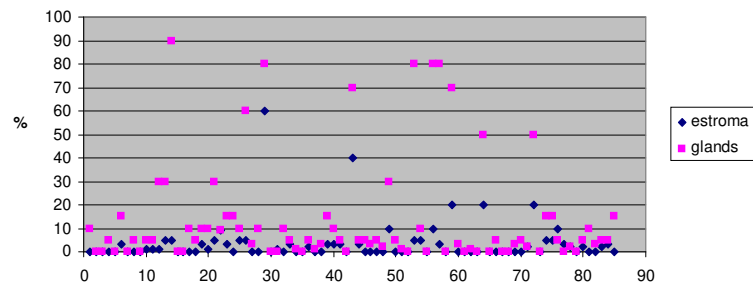


Figure 1. Expression of Ki-67 in the stroma and in the endometrial glands.

Tables

Table 1. Correlation between HOMA-IR* index and the expression of estrogen and progesterone receptors in the stroma and in endometrial glands.

Receptors	HOMA-IR			
	< 2,7		> 2,7	
	n	%	n	%
ER Stromal ^a				
Negative/weak	15	27,7	4	13
Moderate/intense	39	72,3	27	87
ER Glandular ^b				
Negative/weak	4	7,4	2	6,5
Moderate/intense	50	92,6	29	93,5
PR Stromal ^c				
Negative/weak	25	46,3	8	25,8
Moderate/intense	29	53,7	23	74,2
PR Glandular ^d				
Negative/weak	15	27,8	2	6,5
Moderate/intense	39	72,2	29	93,5

*Homeostasis Model Assessment

^ap=0.0378, ^bp=0.1932, ^cp=0.0083, ^dp=0.0101

Table 2. Correlation between abdominal circumference and progesterone receptors and IGF-1R in the stroma and gland.

	AC*			
	< 88		> 88	
	n	%	n	%
PR Stromal ^a				
Negative/weak	5	45,5	28	37,8
Moderate/intense	6	54,5	46	62,1
PR glandular ^b				
Negative/weak	0	0	17	23
Moderate/intense	11	100	57	77
IGF-1R Stromal ^c				
Negative/weak	5	45,5	31	42
Moderate/intense	6	54,5	43	58
IGF-1R glandular ^d				
Negative/weak	2	18,2	16	21,6
Moderate/intense	9	81,8	58	78,4

*AC: Abdominal circumference, PR: progesterone receptors

^ap=0.3518, ^bp=0.0261, ^cp=0.7932, ^dp=0.0080

4. Discussão

Neste estudo observamos que mulheres com resistência insulínica (RI) após a menopausa apresentam maior expressão endometrial dos receptores estrogênicos (RE), progesterogênicos (RP) e fator de crescimento insulínico (IGF-1), independentemente do seu peso corporal ou índice de massa corporal (IMC). Os RE, RP se correlacionaram com o índice HOMA-IR. A avaliação da RI através da circunferência abdominal (CA) apresentou correlação com a expressão do RP e do IGF-1R. Este estudo também evidenciou que a expressão dos RE e RP associaram-se ao fator de proliferação celular Ki-67 e anti-apoptose Bcl-2, sugerindo que os fatores responsáveis pela maior expressão destes receptores possam estar implicados na perda da homeostase celular com aumento do risco de alterações proliferativas.

Foi observado que as mulheres apresentaram índices de sobrepeso e obesidade aumentados. Foram encontrados 76,5% de mulheres com alteração do IMC, em que o peso médio foi de 71kg. Altos índices de sobrepeso e obesidade após a menopausa também foram relatados por outros autores (2,9). Avaliando-se mulheres antes e após a menopausa, De Lorenzi et al. (6), encontraram 63,7% de

alterações no IMC, relacionado principalmente com a idade e não com o estado menopausal. No entanto, outro estudo observou que a composição e distribuição de gordura corporal não se alteravam significativamente antes da menopausa, porém após a menopausa estes depósitos de gordura aumentavam, independentemente da idade da mulher, sugerindo que a deficiência estrogênica durante os anos da perimenopausa seria o responsável pelas alterações nos depósitos de gordura (51).

Não houve correlação estatística entre o IMC, tempo de menopausa e idade das mulheres, provavelmente pela amostra ser formada apenas por mulheres após a menopausa e com IMC elevados. Acreditamos que os achados relativos aos altos IMC sejam decorrentes principalmente dos fatores hormonais relacionados ao hipoestrogenismo. De fato, o estado hipoestrogênico interfere nos depósitos de gordura após a menopausa (9). No entanto, devemos considerar que outros fatores, além dos estritamente biológicos ligados ao processo de envelhecimento, também podem interferir no ganho de peso ponderal, como diferenças no estilo de vida, alimentação e fatores psicossociais (6).

Avaliando o nível estrogênico, foram encontrados 14 (16,4%) casos com dosagem sérica de estradiol maior que 25pg/ml, mas sem correlação estatística com RI, obesidade ou alterações endometriais. A ausência de correlação entre os níveis estrogênicos e a obesidade abdominal após a menopausa também foi observada por outros autores (16,39). Provavelmente o motivo pelo qual não se encontrou correlação estatística entre os níveis de estradiol e obesidade seja pelos baixos níveis estrogênicos após a menopausa, associados aos altos IMC. Outro fator é que a estrona é o principal estrogênio circulante após a menopausa. Não

avaliamos a estrona sérica, pois não era objetivo deste estudo correlacionar os receptores com níveis hormonais. A dosagem sérica de estradiol foi realizada com o intuito de excluir da amostra as mulheres que não fossem menopausadas.

O mecanismo pelo qual ocorre produção estrogênica após a menopausa envolve a metabolização dos androgênios no tecido adiposo. Após a menopausa ocorre a persistência da produção androgênica por alguns anos, proveniente principalmente do estroma ovariano, mas também das glândulas suprarrenais. Estes androgênios sofrem aromatização nos adipócitos com formação de estrogênios (21) que são transportados, conjugados à proteína SHBG (25). A obesidade e a hiperinsulinemia, por sua vez, diminuem a SHBG sérica, aumentando os androgênios e estrogênios livres na circulação (25). Os estrogênios, sob a forma livre, vão promover ação tecidual pela atuação em células-alvo, através da ligação aos seus receptores. O aumento dos androgênios livres atua diretamente nos depósitos de gordura, modificando o metabolismo e a diferenciação dos adipócitos. (9,25), levando ao aumento dos depósitos de gordura abdominal (9).

Por outro lado, o hipoestrogenismo durante a perimenopausa também determina mudança no padrão dos depósitos de gordura, ocasionando aumento do tecido adiposo, com predomínio no acúmulo de gordura abdominal e consequente diminuição da massa magra corporal (15,51). Clinicamente estes depósitos manifestam-se através do aumento da CA (52), de forma que as mulheres, após a menopausa, apresentam porcentagem de gordura abdominal maior do que na pré-menopausa (2,9).

Utilizamos a CA para avaliar a gordura abdominal, pois esta medida, além de servir como preditor clínico da RI, apresenta maior correlação com a gordura visceral do que o IMC isolado (53). Não houve correlação estatística entre CA e IMC. Nas mulheres com IMC superior a 25 encontrou-se 93,5% de CA alterada, mas também observamos que mesmo nas mulheres com IMC normal, mais da metade (55%) dos casos apresentavam alteração na CA, demonstrando altos índices de obesidade abdominal. Provavelmente não se encontrou correlação entre CA e IMC devido ao grande número de mulheres com sobrepeso, obesidade e alterações das CA. Raskin et al. (2) também observaram predomínio do tecido adiposo abdominal em mulheres após a menopausa, independente da associação com obesidade.

Foi realizada a avaliação laboratorial da RI através do índice HOMA-IR. Encontramos porcentagem maior de mulheres com alteração na CA do que com índice HOMA-IR alterado. Esta divergência encontrada entre a CA e o índice HOMA-IR deve-se à dificuldade de, na prática, realizar diagnóstico de RI e da predominância do sobrepeso e obesidade da amostra estudada, uma vez que a obesidade é o principal responsável pela RI em mulheres após a menopausa (52).

Vários fatores interferem no índice HOMA-IR, entre eles a reação cruzada com pró-insulina (54), hemólise (55) e o número de amostras sanguíneas coletadas (56). Sugere-se que os níveis séricos de glicose também podem interferir no índice HOMA-IR. Na amostra deste estudo obtivemos 28 (33%) mulheres com glicemia sérica alterada; no entanto, não as excluímos, pois em estudo realizado comparando-se a sensibilidade insulínica através do *clamp* glicêmico e HOMA-IR, observou-se forte correlação com a consistência dos resultados nos vários

grupos estudados, mulheres e homens, jovens e idosos, obesos e não obesos, diabéticos e não diabéticos (54).

O índice HOMA-IR é significativamente maior em indivíduos com obesidade abdominal, elevação da trigliceridemia e aumento da glicemia (57). Apesar da metabolização da glicose sanguínea poder ser influenciada pela gordura visceral após a menopausa, a RI pode não estar presente em mulheres obesas, o que refletiria a heterogenicidade da obesidade, que poderia ser decorrente de um efeito hormonal (27). De fato, o nível estrogênico pode promover efeito benéfico na sensibilidade tecidual à insulina (58).

É comum assumir, portanto, que a RI ocorre em mulheres com obesidade associada à Síndrome Metabólica (SM) (52,57). Não apenas a obesidade, mas a redistribuição dos depósitos de gordura após a menopausa predispõe ao desenvolvimento de SM (52). Não investigamos a ocorrência de SM. Correlacionamos os receptores endometriais apenas com a RI, pois não era interesse deste estudo associar as alterações endometriais a outras alterações metabólicas. No entanto, após a menopausa, ocorre claramente aumento da prevalência da SM associado às alterações hormonais, sendo que alguns autores indicam terapia hormonal com estrogênio devido ao benefício na redução de diversos parâmetros metabólicos (58).

Na avaliação histológica endometrial, encontramos apenas quatro amostras com características proliferativas. Não excluímos estas amostras, pois eram de mulheres com confirmação clínica e laboratorial da menopausa. Oitenta e uma amostras apresentaram atrofia endometrial, sem relação estatística com os níveis

estrogênicos encontrados. Observamos nas amostras endometriais atróficas, altas concentrações e intensa expressão dos RE e RP sem diferença estatística em relação às amostras com proliferação, provavelmente devido a seu pequeno número.

Avaliando o número de células positivas e a intensidade da coloração dos RE e RP encontramos relação direta entre elas, sugerindo que exista um mesmo estímulo responsável tanto pela formação quanto pela intensidade da capacidade de ligação dos receptores.

Os RE e RP são receptores nucleares específicos que fazem parte da superfamília dos receptores esteroídicos (41). Os RE possuem a magnitude da sua atividade baseada em regiões específicas do gene. A formação de novos RE (59) e sua concentração (22) parece estar relacionada à autorregulação dependente de fatores hormonais; entretanto sua ativação independe da presença hormonal (59).

Observamos uma expressão moderada e intensa para os RE em 78,8% das amostras no estroma e 94,1% nas glândulas, sugerindo que mesmo no endométrio atrófico exista atividade hormonal após a menopausa, não sendo incomum encontrar, nesta fase, atividade proliferativa fraca (42).

Para os RP encontramos expressão endometrial moderada e intensa em 60,2% das amostras no estroma e 80% nas glândulas. Esta alta expressão tecidual dos RP não condiz com o estado hormonal encontrado após a menopausa, onde não se observa ação progesteronal. De fato, a concentração dos RP não reflete os níveis de progesterona circulante (43,44). A indução da formação dos RP no tecido endometrial decorre principalmente da estimulação estrogênica. Este estímulo

na formação de RP foi demonstrado em estudo que analisou amostras de endométrio atrófico observando aumento da expressão de RP após a administração de estrogênio vaginal (43).

Observamos que para os RE e RP as células glandulares apresentam uma expressão mais intensa do que as células estromais, sugerindo que as células glandulares apresentam maior resposta ao estímulo estrogênico do que as células estromais. De fato, quando a expressão dos receptores no tecido é mais intensa, as células glandulares apresentam maior porcentagem de positividade que as estromais. Esta maior expressão glandular dos RE e RP também foram observadas em pólipos e no endométrio adjacente em outros estudos (60,61).

As altas expressões dos RE e RP encontrada nas amostras, possivelmente são causadas pelo efeito contínuo dos estrogênios no endométrio, mesmo em níveis considerados baixos (42). Não somente os níveis estrogênicos, mas também o tempo prolongado de ação no tecido-alvo poderia promover a formação de novos receptores endometriais (22,59), sendo comum após a menopausa presença de altas concentrações de RE e RP, mesmo nas amostras endometriais com atrofia ou com atividade proliferativa leve (42).

Não encontramos correlação entre RE e RP com IMC, no entanto a associação entre obesidade e alterações endometriais foi demonstrada por Gouveia et al. (62) em estudo onde analisando mulheres assintomáticas após a menopausa, encontrou 40,4% de alterações endometriais. Observamos, no entanto, correlação dos receptores esteróides com índice HOMA-IR, sugerindo que

nas mulheres após a menopausa a resistência insulínica teria maior expressão nas alterações endometriais do que o sobrepeso e a obesidade isolados. Provavelmente não encontramos correlação entre os receptores esteróides e o IMC devido altos índices de sobrepeso e obesidade das mulheres.

Observamos expressão do IGF-1R moderada e intensa em 57,6% no estroma e 78,8% nas glândulas. Da mesma forma que para os RE e RP, quando a expressão dos receptores é intensa, a porcentagem de células positivas é maior nas glândulas do que no estroma. Esta distribuição dos IGF-1R também foi relatada por outros autores, que observaram no endométrio atrófico altos graus de positividade para IGF-1R, no entanto com maior expressão estromal (63). Encontramos neste estudo correlação entre os IGF-1R com os RE e RP, sugerindo influencia hormonal na formação destes receptores.

No ciclo menstrual não foi evidenciada diferença no número de IGF-1R durante as diferentes fases do ciclo, apesar de ocorrer aumento do IGF-1 durante a fase secretora. Provavelmente ações hormonais da progesterona nesta fase ocasionam alteração do IGFBP, reduzindo a biodisponibilidade do IGF-1 de forma a manter os níveis do IGF-1R (64).

Em tumores *in vitro*, os IGFs são conhecidos por serem potentes mitogênicos, porém em amostras de carcinoma endometrial foram encontrados baixos níveis de IGF e expressão aumentada de IGF-1R, sugerindo que no carcinoma endometrial precedido pela hiperplasia adenomatosa possa existir estado de hiperestrogenismo (65). Outros estudos também demonstraram

maior expressão dos IGF-1R no tecido neoplásico endometrial do que no hiperplásico ou normal (36,66).

Esta relação entre estrogênio e IGF-1, foi demonstrada em tumores de mama onde se observou que os estrogênios e os IGF-1 agem de forma conjunta e recíproca promovendo efeitos mitogênicos nas células (27). Evidenciou-se que a expressão do IGF-1R está relacionada também à expressão dos RE, de forma que em células neoplásicas apresentando RE positivos a estimulação do IGF-1R sempre induz a proliferação celular (67). Observou-se que em tumores com RE positivos, a expressão do IGF-1R foi maior do que com RE negativo. Os níveis de IGF-1R em tumores RP positivos também foram maiores do que RP negativos, no entanto não significativos (68). De fato a observação de que os IGF-1R e os receptores esteróides apresentam expressão semelhante sugere que exista um regulador comum para estes receptores (68).

Não encontramos correlação estatística do IGF-1R com o IMC. No entanto quando analisamos a distribuição destes receptores conforme o IMC observamos que a porcentagem de células positivas aumenta conforme aumenta a expressão do receptor tecidual. Este aumento, entretanto ocorre para todas as categorizações do IMC de forma semelhante, sugerindo que este parâmetro não seja adequado para avaliação das alterações endometriais. Por outro lado, foi demonstrado que o IGF-1 pode estar aumentado no tecido adiposo (68).

Quando analisamos a resistência insulínica através do índice HOMA-IR e CA, observamos que a expressão dos IGF-1R apenas se correlacionou com a

CA. Entretanto, Papaxoinis et al (65) avaliando marcadores de RI não encontraram nenhum marcador isolado associado ao aumento da expressão do IGF-1R. Mesmo sem correlação estatística entre o IGF-IR e HOMA-IR e também entre RE e CA, podemos observar um padrão de expressão semelhante para todos os receptores, onde a porcentagem de células com receptor positivo aumenta conforme o aumento da expressão do receptor no tecido, independentemente do índice HOMA-IR.

Os níveis séricos de insulina aumentados ficaram evidentes após a menopausa em mulheres com CA aumentada. Também se observou correlação entre os níveis de SHBG e as medidas antropométricas em mulheres após a menopausa, porém não na pré-menopausa (25). De fato, a hiperinsulinemia promove diminuição sérica da SHBG proporcionando maior biodisponibilidade de esteróides livres (25). O aumento nos níveis séricos de estrogênios interfere na produção de IGF-1. Observou-se que a administração de estrogênios orais após a menopausa diminui os níveis séricos de IGF-1 (69,70). Neste estudo encontramos correlação inversa entre os níveis séricos de estradiol e a expressão tecidual dos IGF-1R. Esta relação foi demonstrada em estudo que avaliou mulheres após a menopausa submetidas à ooforectomia bilateral, que apresentaram aumento significativo de IGF, sugerindo que este aumento seja decorrente do hipoestrogenismo (71). Os hormônios esteróides exercem ação hepática, de forma que a remoção dos ovários ocasiona estado hipoestrogênico com liberação do efeito supressivo sobre o fígado levando a uma maior produção de IGF1 (71).

O IGF-1 se relaciona a alterações proliferativas celulares mediadas pela hiperinsulinemia (26) que podem ser responsáveis ou adjuvantes ao desenvolvimento de neoplasias (52). Após a menopausa a hiperinsulinemia crônica pode promover tumorigênese em tecidos estrogênicos sensíveis (12). Ainda não está claro se os níveis circulatórios de IGF-1 possam refletir a hiperinsulinemia (27), mas a hiperinsulinemia crônica diminui a concentração sérica da proteína 1 de ligação IGF (IGFBP-1) e proteína 2 de ligação IGF (IGFBP-2) ocasionando maior biodisponibilidade do IGF-1 livre (12). O IGF-1 pode ocasionar alterações celulares como mitogênese e anti-apoptose, o que pode favorecer a formação tumoral (12). De fato, a expressão tecidual dos IGF-1R é significativamente maior nas neoplasias dos indivíduos com RI (65).

Avaliamos as mitoses celulares no endométrio através do antígeno Ki-67 e a apoptose celular através da proteína Bcl-2 e observamos nas amostras estudadas a alta expressão do Ki-67 com positividade para 75,3%, principalmente nas células glandulares; no entanto estas células apresentaram pequeno número de mitoses. Observamos que tanto o Ki-67 como o Bcl-2 correlacionaram-se com RE e RP, mas não com os IGF-1R. A correlação entre RE, IGF-1R e IGF-1 foi demonstrada em outro estudo que observou que em tecido com expressão de RE existiam efeitos anti-apoptóticos do IGF-1 e o aumento da expressão do IGF-1R (67). Encontramos correlação na expressão entre os RE e IGF-1R; no entanto, não observamos nos tecidos com expressão IGF-1R o aumento dos Bcl-2.

As variações nas expressões do Ki-67 e Bcl-2 sofrem interferência hormonal e podem ser observadas durante o ciclo menstrual. O Ki-67 apresenta

expressão máxima no final da fase proliferativa, quando os níveis séricos de estrogênio apresentam-se elevados. Durante a fase lútea a expressão é maior nas células estromais (49). A intensidade na coloração do Bcl-2 também aumenta gradativamente, atingindo sua expressão máxima no final da fase folicular (49). Desaparece do epitélio glandular no momento em que aparecem características secretoras, persiste assim até o final do ciclo sugerindo que a expressão do Bcl-2 possa ser inibida pela progesterona. No estroma ocorre manutenção da coloração, porém fraca até as alterações de decidação endometrial (49).

Quando as glândulas ficam positivas para Bcl-2 todas as células estão coradas, sugerindo estrito controle da expressão do Bcl-2 nas células das glândulas. No estroma não se observou variação na expressão do Bcl-2 durante as diversas fases do ciclo menstrual (49). Portanto, as alterações cíclicas da apoptose no endométrio normal sugerem que os níveis hormonais de estrogênio e progesterona regulam os sinais que resultam na apoptose (72,73,74).

No endométrio atrófico o número de células apoptóticas é maior, com menor expressão do Bcl-2 do que no endométrio proliferativo (75). Encontramos no endométrio atrófico maior expressão do Bcl-2 nas glândulas com positividade e intensidade de coloração celular mais uniforme, sugerindo que o padrão da expressão do Bcl-2 na menacme deve-se às alterações cíclicas hormonais, diferentemente do que ocorre após a menopausa.

Na hiperplasia endometrial e no carcinoma endometrial a expressão do Bcl-2 é maior do que no endométrio proliferativo (73,76). No entanto, foi

observada maior expressão do Bcl-2 no endométrio hiperplásico do que no carcinoma endometrial, sugerindo que o estrogênio é o hormônio que atua primeiramente na modulação da expressão do Bcl-2 (73).

Encontramos correlação entre os RE, RP e Bcl-2. Isto também foi demonstrado em mulheres com Síndrome do Ovário Policístico que apresentaram expressão elevada de RE α associada à alta expressão Bcl-2 (Maliqueo et al., 2003). De fato, o estradiol liga-se ao seu receptor resultando em efeito proliferativo no tecido e inibição da apoptose pelo Bcl-2 (73). Portanto, os hormônios ovarianos possuem papel regulador sobre a proteína Bcl-2, correlacionando-se com receptores esteróides (73).

Após a menopausa é comum encontrarmos RE e RP positivos no endométrio atrófico. No entanto, apenas as amostras contendo alguma atividade proliferativa apresentam positividade para Ki-67 (42). Gompel et al. (49) observaram que nas glândulas todas as células apresentaram positividade para Bcl-2, mas apenas algumas para Ki-67, de forma que a expressão simultânea para as duas proteínas ocorria somente em algumas células. Encontramos neste estudo apenas 23,5% das amostras com expressão para as duas proteínas, demonstrando estrita relação entre os mecanismos de proliferação e morte celular.

O Bcl-2 é importante fator anti-apoptótico relacionado à susceptibilidade das células entrarem em apoptose, proporcionando renovação das células endometriais (74). Em tecidos responsivos a hormônios, a estimulação hormonal, principalmente

pelo estrogênio, aumenta a sobrevivência celular possibilitando, através da estimulação do Bcl-2, aumento do risco de transformação maligna das células (73).

A avaliação da obesidade através do IMC não se mostrou eficaz na identificação de alterações endometriais, sendo que a medida da circunferência abdominal e o índice HOMA-IR apresentaram melhor correlação com os receptores endometriais, sugerindo que a avaliação da RI é importante na determinação do risco para alterações proliferativas endometriais.

Através da avaliação dos RE, RP, IGF-1R e dos fatores Ki-67 e Bcl-2 observamos que o estímulo contínuo causado pelos estrogênios, mesmo em níveis baixos (42), associado à hiperinsulinemia decorrente da obesidade visceral, atuam conjuntamente no endométrio e exercem importante ação estimulatória principalmente nas células glandulares, podendo ocasionar sua estimulação.

Estas alterações metabólicas e hormonais sabidamente exacerbadas pela adiposidade visceral, consoante aos altos índices de sobrepeso e obesidade populacional, demonstram ser imperiosa a instituição de políticas públicas e mudanças de hábitos para alterar este panorama de altos índices de sobrepeso e obesidade.

5. Conclusões

- Houve expressão dos RE, RP, IGF-1R, Ki-67 e Bcl-2 no endométrio de mulheres após a menopausa, principalmente no compartimento glandular.
- Houve correlação da expressão dos RE, RP com os fatores Ki-67 e Bcl-2 nas células estromais e glandulares do endométrio de mulheres após a menopausa. Não houve correlação entre os IGF-1R e os fatores Ki-67 e Bcl-2 nas células endometriais.
- Não houve correlação entre o IMC e a expressão dos RE, RP, IGF-1R, Ki-67 e Bcl-2 nas células endometriais.
- Após a menopausa, houve correlação estatística entre os RE, RP endometriais com a RI avaliada através do índice HOMA-IR. A medida da CA correlacionou-se com os RP e IGF-1R. Não houve correlação estatística entre os fatores Ki-67 e Bcl-2 com os índices de resistência insulínica avaliados.

6. Referências Bibliográficas

1. Stein C, Colditz GA. The Epidemic of Obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004; 89(6): 2522-25.
2. Raskin DBF, Pinto-Neto AM, Paiva LHSC, Raskin A, Martinez EZ. Fatores Associados à Obesidade e ao Padrão Andróide de Distribuição da Gordura Corporal em Mulheres Climatéricas. *RBGO.* 2000; 22(7):435-41.
3. World Health Organization. Media centre—Obesity and overweight (on line) (2011). [Acesso em 02 maio 2011]. Disponível em: URL: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/
4. Deitel M. Overweight and Obesity Worldwide now Estimated to Involve 1.7 Billion People. *Obesity Surgery.* 2003; 13: 329-30.
5. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE (on line) (2011). [Acesso em 02 maio 2011]. Disponível em: URL: www.ibge.gov.br/none/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=1699&id_regina=1.
6. De Lorenzi KRS, Basso E, Fagundes PO, Saciloto B. Prevalência de sobrepeso e obesidade no climatério. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2005; 27 (80): 479-84.
7. Chen YL, Cheng WF, Lin MC, Huang CY, Hsieh CY, Chen CA. Current Endometrial Carcinoma in Patients with a Curettage Diagnosis of Endometrial Hyperplasia. *J Formos Med Assoc.* 2009; 108(6): 502-7.

8. Davies KM, Heaney RP, Recker RR, Barger-Lux MJ, Lappe JM. Hormones, weight change and menopause. *International Journal of Obesity*. 2001; 25: 874-79.
9. Guthrie JR, Dennerstein L, Taffe JR, Ebeling PR, Randolph JF, Burger HG et al. Central abdominal fat and endogenous hormones during the menopausal transition. *Fertil Steril*. 2003; 79(6): 1335-40.
10. Lafontan M, Girard J. Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism Part I: Heterogeneity of adipose tissue and functional properties of visceral adipose tissue. *Diabetes Metab*. 2008; 34: 317-27.
11. Linkov F, Edwards R, Balk J, Yurkovetsky Z, Sadterman B, Lokshin A et al. Endometrial hyperplasia, endometrial cancer and prevention: Gaps in existing research of modifiable risk factors. *Eur J Cancer*. 2008; 44: 1632-44.
12. Renehan A, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet*. 2008; 371: 569-78.
13. Schapira DV, Kumar NB, Lyman GH, Cavanagh D, Roberts WS, Lapolla J. Upper-body fat. Distribution and endometrial cancer. *J Am Med Assoc*. 1991; 266:1808-11.
14. Elliot EA, Matanoski GM, Rosenshein NB, Grumbine FC, Diamond EL. Body fat. Patterning in women with endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 1990; 39:253-58.
15. Austin H, Austin JM, Partridge EE, Hatch KD, Shingleton HM. Endometrial cancer, obesity, and body fat distribution. *Cancer Res*. 1991; 51:568-72.
16. Folsom AR, Kaye SA, Potter JD, Princas RJ. Association of incidence carcinoma of the endometrium with body with and fat. Distribution in older women: Early findings of The Iowa Women's Health Study. *Cancer Res*. 1989; 49:6828-31.

17. Gredmark T, Kvinst S, Havel G, Mattson, Lars-Ake. Adipose tissue distribution in postmenopausal women with adenomatous hyperplasia of endometrium. *Gynecol Oncology*. 1999; 72: 138-42.
18. Park SL, Goodman MC, Zhang ZF, Kolonel L, Henderson BE, Setiawan VW. Body Size, Adult BMI Gain and Endometrial Cancer Risk: The Multiethnic Cohort. *Int J Cancer*. 2010; 126(2): 490-99.
19. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures. (on-line) (2010). [Acesso em 13 jul 2010] Disponível em: URL: www.cancer.org/acs/groups/content/@nho/documens/acspc-024113.pdf.
20. Sivridis E, Fox H, Buckley CH. Endometrial carcinoma: two or three entities? *Int J Gynecol Cancer*. 1998; 8: 183-8.
21. Grodin JM, Stiiteri PK, Mac-Donald PC. Source of estrogen production in post-menopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1973; 36:207-18.
22. Lipsett MB. Hormônios Esteróides. In: Yen SSC, Jaffe RB (org). *Endocrinologia reprodutiva-fisiologia, fisiopatologia e tratamento clínico*. 2^a ed. São Paulo: Roca; 1999. p.135-47.
23. Parslov M, Lidegaard O, Klintorp S, Pedersen B, Jonsson L, Eriksen PS et al. Risk factors Amon Young women writ endometrial cancer: A Danish case-control study. *Am J Obstet Gynecol*. 2000; 182 :(1), 23-29.
24. MacDonald PC, Edman CD, Hemsell DL, Porter JC, Siiteri PK. Effect of. Obesity in convert of Plasma androstenedione to estrone in postmenopausal women with and without endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol*. 1978; 130:448.
25. Akin F, Bastemir M, Alkis E, Kaptanoglu B. SHBG levels correlate with insulin resistance in postmenopausal women. *Europ J Intern Med*. 2008; 1-6.

26. Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4: 579-91.
27. Pichard C, Bureau GP. Insulin resistance, obesity and breast cancer risk. *Maturitas*. 2008; 60: 19-30.
28. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines, inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *BR J Nutr*. 2004; 92:347-55.
29. Cowey S, Hardy W. The Metabolic Syndrome. A High-Risk State for Cancer? *The Am J Pathology*. 2006; 169 (5): 1505-21.
30. Kuller LH. Eating fat or being fat and risk of cardiovascular disease and cancer among women. *Ann Epidemiol*. 1994; 4:119-127.
31. Czyzyk A, Szczepanik Z. Diabetes mellitus and cancer. *Eur Journ of Intern Medic*. 2000; 11: 245-252.
32. Soufla G, Sifakis S, Spandidos DA. FGF2 transcript levels are positively correlated with EGF and IGF-1 in the malignant endometrium. *Cancer Letters*. 2008; 259: 146-55.
33. Moschos SJ, Mantzoros CS. The role of the IGF system in cancer: from basic to clinical studies and clinical applications. *Oncology*. 2002; 63: 317-32.
34. Ibrahim YH, Yee D. Insulin-like growth factor-I and cancer risk. *Growth Horm IGF Res*. 2004; 14:261-69.
35. Belobrajdic DP, Priebe IK, Forbes B, Flyvbjerg JWC, Cosgrove LJ, Frystyk J. Assessing the potential usefulness of IGF-related peptides and adiponectin for predicting disease risk. *Growth Horm IGF Res*. 2008; 18:198-204.

36. Pavelic J, RaDakovic B, Pavelic K. Insulin-like growth factor 2 and its receptors (IGF 1R and IGF 2R/mannose 6-phosphate) in endometrial adenocarcinoma *Gynecol Oncol*. 2007; 105; 727-35.
37. Brentani MM, Feldamn J. Receptores esteróidicos. In: Lima GR, Baracat EC. *Ginecologia endócrina*. São Paulo: Atheneu; 1995. p.40-9.
38. Critchley HOD, Kelly RW, Baird DT, Brenner RM. Regulation of human endometrial function: mechanisms relevant to uterine bleeding. *Reprod Biol Endocrin*. 2006; 4(Suppl 1):S5-6.
39. Meza-Muñoz DE, Fajardo ME, Perez-Luque EL, Malacara JM. Factors associated with estrogen receptors- α (ER- α) and - β (ER- β) and progesterone receptor abundance in obese and non obese pre- and post-menopausal women. *Steroids*. 2006; 71: 498-503.
40. Morito K, Hirose T, Kinjo J, Hirakawa T, Okawa M, Nohara T. Interaction of Phytoestrogens with Estrogen Receptors α and β . *Biol Pharm Bull*. 2001; 24:351-6.
41. Utsunomiya H, Suzuki T, Harada N, Kiyoshi I, Matsuzaki S, Konnor R, et al. Analysis of Estrogen Receptor α and β in Endometrial Carcinomas: Correlation with ER β and Clinicopathologic Findings in 45 Cases. *Int J Gynecol Pathol*. 2000; 19:335-41.
42. Sivridis E, Giatromanolaki A. Proliferative activity in postmenopausal endometrium: the lurking potential for giving rise to an endometrial adenocarcinoma. *J Clin Pathol*. 2004; 57:840-44.
43. Brys M, Szylo K, Romanowicz-Makowska H, Dobrowolski Z, Maslowska I, Krajewska W. Expression of estrogen and progesterone receptor genes in endometrium, myometrium and vagina of postmenopausal women treated with estriol. *Sao Paulo Med J*. 2009; 127 (3): 128-33.

44. Yen SSC. Ciclo Menstrual Humano. In: Yen SSC, Jaffe RB. Endocrinologia reprodutiva – fisiologia, fisiopatologia e tratamento clínico. 2^a ed. São Paulo: Ed. Roca. 1999; (8):p 193-227.
45. Taylor LJ, Jackson TL, Reid JG, Duffy SRG. The differential expression of oestrogen receptors, progesterone receptors, Bcl-2 and Ki67 in endometrial polyps. *Int J Obstet Gynaecol.* 2003; 110:794-8.
46. Pathirage N, Di Nezza LA, Salmonsens LA, Jobling T, Simpson ER, Clyne CD. Expression of aromatase, estrogen receptors, and their coactivators in patients with endometrial cancer. *Fertil Steril.* 2006; 86 (2): 469-72.
47. Narka M, Kholkute S, Chitlange S, Nandedkar T. Expression of steroid hormone receptors, proliferation and apoptotic markers in primate endometrium. *Mol and Cel Endocrinol* 2006, 246: 107-113.
48. Maia Jr. H, Maltez A, Studart E, Athayde C, Coutinho EM. Ki-67, Bcl-2 and p53 expression in endometrial polyps and in the normal endometrium during the menstrual cycle. *BJOG.* 2004; 111: 1242-1247.
49. Gompel A, Sabourin JC, Martin A, Yaneva H, Audouin J, Decroix Y, et al. Bcl-2 Expression in Normal Endometrium during the Menstrual Cycle. *Am J Pathol.* 1994; 144-6.
50. Wenten M, Gilliland FD, Baumgartner K, Samet JM. Associations of weight, weight change, and body mass with breast cancer risk in Hispanic and non-Hispanic white women. *AEP.* 2002; 12 (6): 435-44.
51. Svendsen OL, Hassager C, Christiansen. Age- and Menopause-Associated Variations in Body Composition and Fat Distribution in Healthy Women as Measured by Dual-Energy X-Ray Absorptiometry. *Metabolism.* 1995; 44(3): 369-373.

52. Chu M, Cospier P, Orio F, Carmina E, Lobo R. Insulin resistance in postmenopausal women with metabolic syndrome and the measurements of adiponectin, leptin, resistin, and ghrelin. *Am J Obst Gynecol.* 2006; 194: 100-104.
53. Ness-Abramof R, Apovian CM. Waist Circumference Measurement in Clinical Practice. *Nutr Clin Pract.* 2008; 23 (4): 397-404.
54. Bonora E, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC, Saggiani F, Zenere MB, et al. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes Care.* 2000; 23(1): 57-63.
55. Kang ES, Yun YS, Park SW, Kim HJ, Ahn CW, Song YD, et al. Limitation of the validity of the homeostasis model assessment as an index of insulin resistance in Korea. *Metabolism.* 2005; 54: 206-11.
56. Wallace TM, Levy JC, Mathews DR. An increase in insulin sensitivity and basal beta-cell function in diabetic subjects treated with pioglitazone in placebo-controlled randomized study. *Diabetic Med.* 2004; 21: 568-76.
57. Oliveira EP, Lima MDA, Souza MLA. Síndrome Metabólica, Seus Fenótipos e Resistência à Insulina pelo HOMA-IR. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2007; 51(9): 1506-15.
58. Lobo R. Metabolic syndrome after menopause and the role of hormones. *Maturitas.* 2008; 60: 10-18.
59. Punyadeera C, Verbost P, Groothuis P. Oestrogen and progestin responses in human endometrium. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003; 84:393-410.
60. Lopes RG, Baracat EC, Albuquerque Neto LC, Ramos JFD, Yatabe S, Depes DB, Lippi UG. Analysis of estrogen- and progesterone-receptor expression in endometrial polyps. *J Min Inv Gyn.* 2007; 14: 300-03.

61. Belisiário MSN, Vassalo J, Andrade LALA, Alvarenga M, Pinto GA, Monteiro IMU. The expression of the hormone receptors in the endometrium and endometrial polyps in postmenopausal women and its relationship to body mass index. *Maturitas*. 2006; 53 (1): 114-18.
62. Gouveia DAC, Bahamondes L, Aldrighi JM, Tamanaha S, Ribeiro AL, Aoki T. Prevalência de Lesões Endometriais em Mulheres Obesas Assintomáticas. *Rev Assoc Med Bras*. 2007; 53(4): 344-8.
63. Loverro G, Perlino E, Maiorano E, Cormio G, Ricco R, Marra E et al. TGF-beta 1 and IGF-1 expression in atrophic post-menopausal endometrium. *Maturitas*. 1999; 179-84.
64. Corleta H, Capp E, Strowitzki T. Cycle modulation of insulin-like growth factor-binding protein 1 in human endometrium. *Braz J Med Res*. 2000; 33 (11): 1387-91.
65. Papaxoinis K, Patsouris E, Kittas C, Nicolopoulou-Stamati P. Insulinlike growth factor I receptor and estrogen receptor β expressions are inversely correlated in colorectal neoplasms and affected by the insulin resistance syndrome. *Hum Pathol*. 2007;38:1037-46.
66. McCampbell AS, Broaddus RR, Loose DS, Davies PJA. Overexpression of the Insulin-Like Growth Factor I Receptor and Activation of the AKT Pathway in Hyperplastic Endometrium. *Clin Cancer Res*. 2006; 12 (21): 6373-78.
67. Bartucci M, Morelli C, Mauro L, Ando S, Surmacz E. Differential Insulin-like Growth Factor I Receptor Signaling and Function in Estrogen Receptor (ER)-positive MCF-7 and ER-negative MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Cancer Res*. 2001; 61: 6747-54.
68. Peyrat JP, Bonnetterre J, Beuscart R, Djiane J, Demaille A. Insulin-like Growth Factor 1 Receptors in Human Breast Cancer and Their Relation to Estradiol and Progesterone Receptors. *Cancer Res*. 1988; 48: 6429-33.

69. Campagnoli C, Ambroggio S, Biglia N, Sismondi P. Conjugated estrogens and breast cancer risk. *Gynecol Endocrinol*. 1999; 6:13-9.
70. Druckmann R, Rohr UD. IGF-1 in gynecology and obstetrics: update 2002. *Maturitas*. 2002; 41(1): S65-S83.
71. Fogle RH. Increased insulin-like growth factor-1 after oophorectomy in postmenopausal women. *Fertil Steril*. 2008; 90(4): 1236-39.
72. Zubor P, Hatok J, Galo S, Dokus K, Klobusiakova D, Danko J et al. Anti-apoptotic and pro-apoptotic gene expression evaluated from eutopic endometrium in the proliferative phase of the menstrual cycle among women with endometriosis and healthy controls. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2009; 145: 172-76.
73. Bozdogan O, Atasoy P, Erekul S, Bozdogan N, Bayran M. Apoptosis-Related Proteins and Steroid Hormone Receptors in Normal, hyperplastic and Neoplastic Endometrium. *Int J Gynecol Pathol*. 2002; 21 (4): 375-82.
74. Castro A, Johnson MC, Anido M, Cortinez A, Glaber F, Vega M. Role of nitric oxide and bcl-2 family genes in the regulation of human endometrial apoptosis. *Fertil Steril*. 2002; 78 (3): 587-95.
75. Vaskivuo TE, Stenbäck F, Tapanainen JS. Apoptosis and Apoptosis-Related Factors Bcl-2, Bax, Tumor Necrosis Factor- α , and NF- $\kappa\beta$ in Human Endometrial Hyperplasia and Carcinoma. *Cancer*. 2002; 95: 1463-71.
76. Kokawa K, Shikone T, Otani T, Nishiyama R, Ishii Y, Yagi S et al. Apoptosis and the expression of Bax and Bcl-2 in hyperplasia and adenocarcinoma of the uterine endometrium. *Hum Reprod*. 2001; 16 (10): 2211-18.

7. Anexos

7.1. Anexo 1 – Sujeitos e Métodos

7.1.1. Desenho do estudo

Foi realizado um estudo de corte transversal (Fletcher et al. 1996).

7.1.2. Tamanho amostral

Para o cálculo do tamanho da amostra, estudou-se a intensidade e positividade dos RE no endométrio de mulheres obesas e não obesas, pois estes receptores se caracterizam por apresentarem grande expressão tecidual (Belisiário et al., 2006). Foram observadas as seguintes proporções:

Tabela 1. Distribuição da Intensidade segundo obesidade

	Endométrio			
	Obesa		Não Obesa	
	n	%	n	%
Intensidade RE				
1	9	56.3	6	26.1
2	5	31.3	10	43.5
3	2	12.5	7	30.4
Total	16		23	
Positividade RE				
0	1	6.3	2	8.7
1	3	18.8	10	43.5
2	10	62.5	7	30.4
3	2	12.5	4	17.4
Total	16		23	

Considerando-se um nível de significância de 5%, um poder do teste de 76,6%, e a fórmula para comparações de proporções, proposta por Pocok (1987), com base nos dados da tabela 8, estimou-se um tamanho amostral de 85 mulheres.

7.1.3. Variáveis

7.1.3.1 Variáveis dependentes

- Receptor estrogênico e de progesterona – Proteínas nucleares específicas, que fazem parte da superfamília dos receptores esteroídicos (Speroff, 1999; Utsunomiya et al., 2000), localizados no interior das células-alvo, têm capacidade de modular as repostas hormonais estrogênicas e de progesterona (Brentani e Feldamn, 1995). Positividade 0 a 4, intensidade 0 a 3.
- Receptor IGF-1 – Polipeptídeo, receptor de membrana, encontrados em vários tecidos, capaz de agir via endócrina, parácrina e autócrina na estimulação de crescimento de tumores (Lawrence et al., 2007). Positividade 0 a 4, intensidade 0 a 3.
- Antígeno Ki-67 – Proteína indicadora de atividade proliferativa celular expressa em tecidos com atividade mitogênica (Taylor et al., 2003). Porcentagem.
- Bcl-2 – (*B-cell lymphoma/leukemia-2*) – Proto-oncogene relacionado à regulação da apoptose celular, expressa a diminuição da morte celular (Gompel et al., 1994). Positividade 0 a 4, intensidade 0 a 3.

7.1.3.2 Variáveis independentes

- Índice de massa corporal – relação entre o peso em quilogramas e o quadrado da altura em metros (kg/m^2), medida através de uma balança e de régua antropométrica (Olefsky et al., 1992). <18,5 baixo peso, 18,5 – 24,9 peso normal, 25,0 – 29,9 sobrepeso, 30,0 – 34,9, obesidade GI, 35 – 39,9 obesidade GII, $\geq 40,0$ obesidade GIII.

- Resistência tecidual insulínica – Determinada através da medida do nível sanguíneo de insulina, estimado pelo índice HOMA-IR (*Homeostasis Model Assessment*), definido como produto da insulina sérica em jejum (mU/L) pela glicemia em jejum (mmol/L) dividido por 22,5 (Brochu et al., 2000). Positivo (>2,7) e negativo (<2,7).

7.1.3.3 Variáveis de Controle

- Circunferência abdominal – Medida realizada através de fita métrica, escala milimétrica, na porção média localizada entre a borda inferior da última costela e a borda superior da crista ilíaca (Ross et al., 2002). Centímetros.
- Idade da mulher – número de anos completos, entre a data de nascimento apresentado no registro geral (RG) da mulher e a data da entrevista: 40 a 75.
- Tempo de menopausa – tempo em meses transcorrido entre a data da última menstruação e a data da entrevista (Bossemeyer, 1999): Meses.

7.1.4. Seleção dos Sujeitos

Foram selecionadas mulheres após a menopausa internadas no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (Caism) da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e do Hospital Municipal de São José dos Campos, Dr. José de Carvalho Florence, que tinham indicação de realização de cirurgia ginecológica por doença benigna. Esta seleção foi realizada conforme a demanda cirúrgica de cada serviço. As mulheres foram convidadas ainda na enfermaria, previamente ao procedimento cirúrgico, a participar do estudo. A todas elas foi aplicado um *chek-list* (Anexo III) para verificar se as possíveis participantes cumpriam os critérios de inclusão. As que cumpriam estes critérios foram convidadas a participar do estudo.

7.1.5. Critérios de inclusão

- Tempo de menopausa inferior a 15 anos
- Ausência de tratamento anterior com hormônios há pelo menos seis meses
- Presença de útero

7.1.6. Critérios de exclusão

- Alterações hiperplásicas ou câncer endometrial
- Material insuficiente em todas as amostras endometriais
- Uso anterior de Tamoxifeno

7.1.7. Técnicas, testes e exames

As mulheres selecionadas para participar do estudo encontravam-se em estado de menopausa diagnosticada clinicamente, pelo tempo de amenorréia, e confirmado laboratorialmente através da dosagem sérica do hormônio folículo-estimulante (FSH) e estradiol, em sangue venoso periférico através de ensaio imunofluorométrico. O sangue coletado foi imediatamente centrifugado por 15 minutos e extraído 0,5ml de soro para cada exame, que ficou armazenado à temperatura de 2°C a 8°C até sua realização. Quando a previsão para realização dos exames foi em período superior a 24hs, a amostra do soro foi congelada à temperatura de -20°C, para que não perdesse as características físicas e químicas. Foi considerado parâmetro laboratorial para menopausa a dosagem sérica do FSH superior a 40 UI/L e estradiol inferior a 25 pg/ml.

O índice antropométrico utilizado para expressar a proporcionalidade corporal foi o índice de massa corporal (IMC). O IMC é atualmente o método utilizado pela Organização Mundial da Saúde (World Health Organization, 2011) para classificar a obesidade, devido à sua correlação com a morbimortalidade. A medida da altura das mulheres foi realizada através de régua antropométrica de 2,00m com escala de 0,5cm. O peso foi adquirido previamente ao procedimento

cirúrgico em balança mecânica Welmy®, com capacidade para 150Kg e divisões de 100g. Foi solicitado que as mulheres utilizassem apenas avental de uso hospitalar, subissem na balança sem sapatos, com pés paralelos, peso distribuído em ambos os pés e braços relaxados ao lado do corpo. O procedimento foi realizado duas vezes e quando ocorreram divergências nas medidas, superior à escala de precisão da balança, foi realizada a terceira medida.

A resistência tecidual à insulina foi determinada através da dosagem sérica de glicemia e insulina em jejum, na mesma amostra sanguínea utilizada para dosagem hormonal. O índice HOMA-IR foi utilizado para cálculo da resistência tecidual à insulina (Chu et al., 2006). Foi considerado alterado o índice HOMA-IR superior a 2,7 (Geloneze et al., 2009).

A circunferência abdominal foi obtida utilizando-se fita métrica inelástica, em escala milimétrica. A medida foi realizada com a mulher em posição ereta, com os braços relaxados e os pés juntos, abdome relaxado e sem tensão. A medida foi feita passando-se a fita métrica horizontalmente ao plano do chão, pelo ponto médio entre a última costela e a crista ilíaca antero-superior (Ross et al., 2002), diretamente sobre a pele, com tensão suficiente para que a fita ficasse ajustada firmemente em torno da parte do corpo a ser medida, sem enrugar a pele e nem comprimir os tecidos subcutâneos. A medida foi realizada duas vezes e repetida nos casos em que houve diferença superior a um centímetro. Foram considerados normais os valores inferiores a 88cm (Ross et al., 2002).

A cirurgia proposta para a mulher foi realizada conforme o protocolo de cada serviço. Durante a cirurgia foi obtido da peça cirúrgica um fragmento endometrial são, de aproximadamente 0,2cm a 0,5cm.

O material obtido foi identificado imediatamente e introduzido em recipiente contendo solução tamponada de formol a 10%. Após período de 12 a 24hs, o material foi retirado da solução de formol e colocado em recipiente contendo álcool a 80%. O material foi encaminhado ao Laboratório de Investigação em Patologia Molecular do Centro de Investigação em Pediatria (Ciped) da Unicamp. O material foi preparado conforme as técnicas habituais, com desidratação da peça

em álcool etílico em gradientes crescentes de 50%, 80% e 100%. Posteriormente, a diafanização feita em três banhos de Xilol, e após, foi realizada impregnação em parafina. Após os blocos de parafina devidamente preparados, foram realizados cortes através de um micrótomo na espessura de 4µm. Estes cortes foram fixados em lâminas previamente lavadas e desengorduradas, tratadas em solução organoselano a 4% em acetona (3-aminopropil-trietoxi-silano- Sigma. Cod 3648). As lâminas com os cortes foram colocadas em estufa a 110°C e, após, deixadas em temperatura ambiente por 30 minutos. A seguir foi realizada a coloração pela hematoxilina e eosina para realização da histologia.

Para realização da imuno-histoquímica foram utilizados anticorpos monoclonais primários para RE (Dako® cód. M7047, clone 1 D5, diluição 1:250), RP (Dako® cód. M3569, clone PgR 636, diluição 1:500), Receptor IGF-1 (Genetex® - USA GTX24065, diluição 1:15), Bcl-2 (Biogen® cód. M887, diluição 1:200) e Ki-67(Dako® cód M7240, clone MIB 1, diluição 1:1000). As diluições foram realizadas com BSA (soro albumina bovino).

As secções já preparadas foram desparafinadas colocando-se as lâminas na estufa a 110°C por 60 minutos. Posteriormente foi colocado Xilol I na estufa a 110°C por 30 minutos e realizadas várias lavagens. Em seguida foram realizadas várias lavagens utilizando xilol II e III à temperatura ambiente. A seguir, as mesmas foram hidratadas em álcool etílico gradiente decrescente de 80% e 50% e lavadas em água corrente e destiladas por 5 minutos. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com três banhos de H₂O₂ a 10%, com duração de três minutos cada, seguidos de lavagem em água corrente por 5 minutos e passado em H₂O₂ destilado. Para recuperação antigênica foi utilizada panela a vapor *T-fall*® por 30 minutos a 95°C, com o objetivo de evidenciar antígenos. As lâminas foram imersas em tampão citrato de sódio, pH 6,0, durante 30 minutos a 95°C, e, em seguida, lavadas em água corrente e destilada e colocados em PBS. Após esta etapa os cortes foram incubados em câmara úmida com anticorpo primário específico *overnight* a 4°C. Após a incubação com anticorpo primário, as lâminas passaram por três lavagens em PBS sob agitação, com 5 minutos de duração cada lavagem, e secadas em papel filtro. Após foram incubadas em câmara úmida com sistema *Advanced*.

Terminada a incubação, foram realizadas três lavagens com PBS sob agitação. Para a revelação da reação foi utilizado substrato cromogênico, a solução DAB líquido (3-3'- Diaminobenzidina, Dako®, cód. K3467) durante cinco minutos a 37°C. Após, as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada e contracorado com hematoxilina de Mayer durante 30 segundos, passado em água amoniacal 1%, lavado em água corrente por 5 minutos. A seguir as lâminas foram desidratadas em banhos de álcool etílico em concentrações crescentes e diafanizadas em três banhos de xilol. Após, foram montadas com lamínulas e resina Entellan® (Merck).

Após as lâminas preparadas, a leitura foi realizada pelo mesmo patologista avaliando todos os fragmentos em microscópio com aumento maior de 400X. As expressões dos RE, RP, IGF-1R e Bcl-2 foram avaliadas no estroma e nas glândulas endometriais de forma semi-objetiva. Após, foram categorizadas da seguinte forma. Para o número de células endometriais coradas classificou-se:

Tabela 2. Categorização da porcentagem de células positivas

0	Ausência
1	Positividade até 25%
2	Positividade de 26 a 50%
3	Positividade de 51 a 75%
4	Positividade acima de 76%

Para intensidade da coloração celular classificou-se:

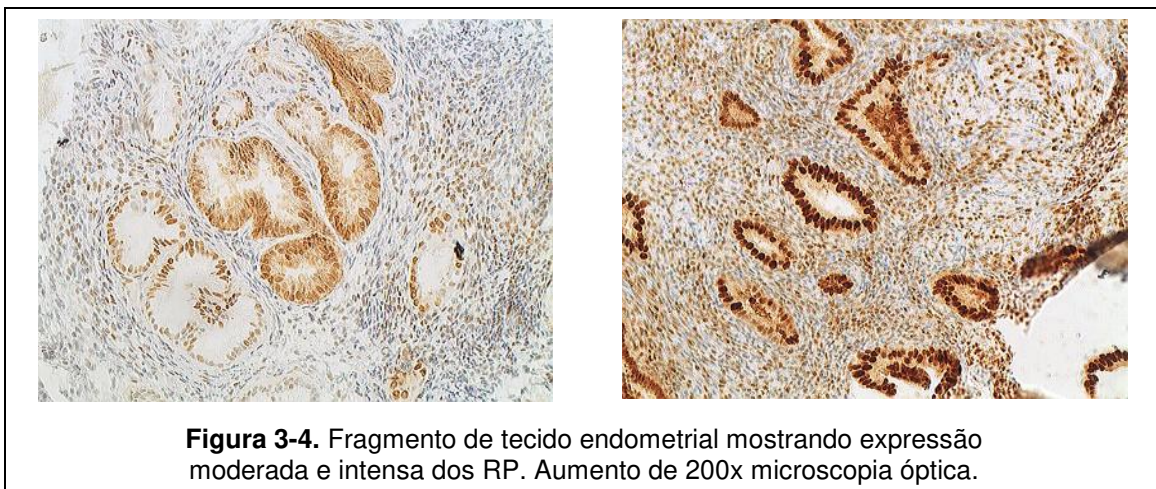
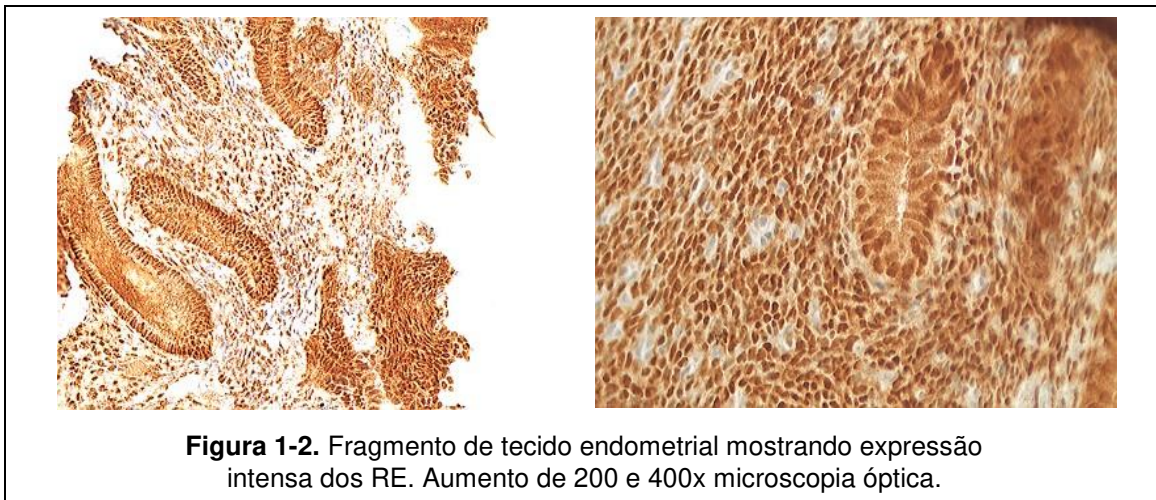
Tabela 3. Categorização da intensidade da coloração dos receptores

0	Ausência
1	Coloração fracamente positiva
2	Coloração de moderada intensidade
3	Coloração fortemente positiva

A expressão dos receptores nos tecidos depende do número de células positivas e da intensidade com que estas células se coram. Classificamos em

positividade e intensidade, e realizamos o somatório dos pontos de forma que para cada segmento tecidual, estroma e glândula, a expressão dos receptores foi de 0 (negativo), 2 e 3 (fraco), 4 e 5 (moderado), 6 e 7 (intenso). Consideramos então três avaliações da expressão tecidual do receptor. Primeira, a relação entre positividade e intensidade da coloração do receptor. Segunda, a expressão do receptor em relação ao compartimento estromal e glandular e terceiro a porcentagem de células com receptor expresso no estroma e nas glândulas.

Para a leitura do Ki-67 foi realizada avaliação semi-objetiva, conforme a porcentagem de células endometriais estromais e glandulares que se coraram após avaliação de todos os campos de todos os fragmentos, em microscópio com aumento de 400X.



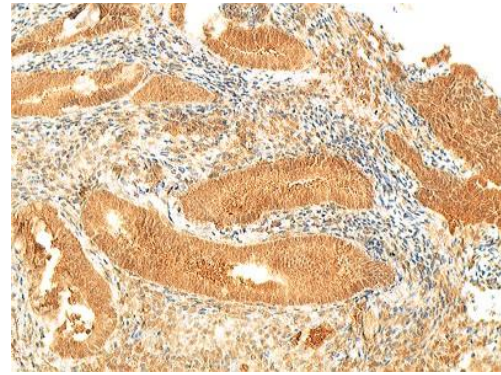
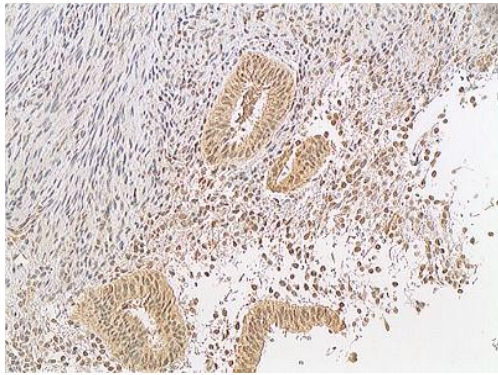


Figura 5-6. Fragmento de tecido endometrial mostrando expressão fraca e intensa dos IGF-1R. Aumento de 200 e 400x microscopia óptica.

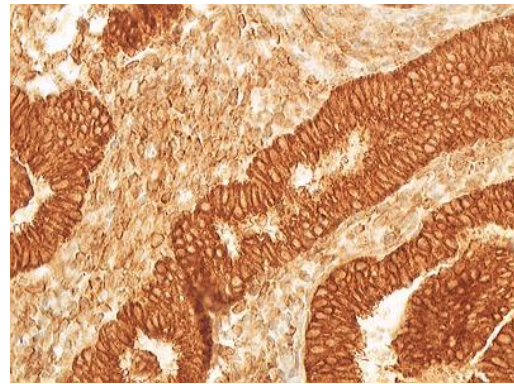
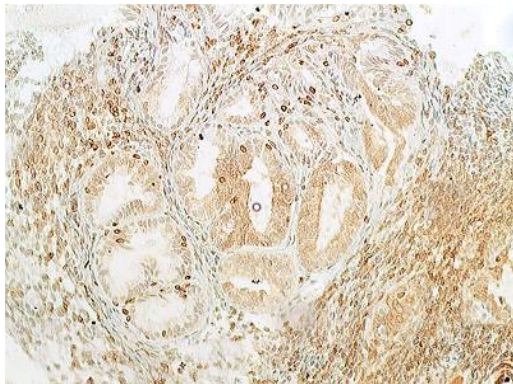


Figura 7-8. Fragmento de tecido endometrial mostrando expressão moderada e intensa dos Bcl-2. Aumento de 200 e 400x microscopia óptica.

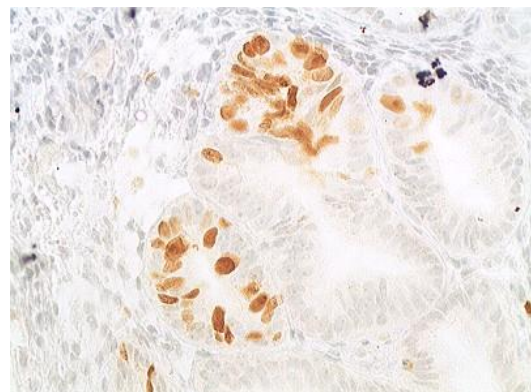


Figura 9-10. Fragmento de tecido endometrial mostrando expressão intensa do Ki-67. Aumento de 200 e 400x microscopia óptica.

7.1.8. Instrumentos para coleta de dados

Foi utilizado um formulário desenhado especificamente para este estudo (Anexo IV), previamente testado no Ambulatório de especialidades Caism, através de entrevista realizada pelo pesquisador responsável.

7.1.9. Coleta de dados

Os dados gerais, bem como os específicos, foram obtidos através de entrevista individual, realizada pelo pesquisador responsável no serviço ambulatorial do Caism e do Hospital Municipal Dr. José de Carvalho Florence, e registrado no formulário específico (Anexo IV). Outras informações como peso, altura e medidas corporais também foram obtidas pelo pesquisador responsável. Após a entrevista inicial, as mulheres que aceitaram participar da pesquisa foram submetidas à coleta de amostra sanguínea para obtenção das dosagens séricas de FSH, estradiol, glicemia e insulina. Esta coleta foi feita em jejum no momento da venóclise necessária para realização da cirurgia. A cirurgia proposta foi realizada conforme protocolo do serviço. A amostra endometrial foi obtida no momento da cirurgia, tomando-se o cuidado da aquisição de um fragmento tecidual normal, contralateral à lesão endometrial. Os resultados das análises imuno-histoquímicas dos fragmentos endometriais foram informados no formulário (Anexo IV).

7.1.10. Processamento e análise dos dados

Os dados coletados nas fichas, após cuidadosa revisão, foram registrados em um programa de banco de dados através de dupla digitação utilizando-se o *software* do Microsoft® Excel, versão 7.0.

As características descritivas da amostra foram comparadas utilizando-se teste qui-quadrado. Os estudos das medidas segundo as variáveis dependentes e suas correlações foram feitos utilizando-se o índice de correlação de Pearson, avaliando-se a força da relação linear e entre duas variáveis através do índice de correlação de Spearman. Foi utilizado nível de significância de 5%. Foi realizada regressão logística multivariada com critério de seleção de variáveis

Stepwise, onde as variáveis dependentes foram IMC, CA e HOMA-IR e as independentes a expressão dos RE, RP, IGF-1R e Bcl-2.

7.1.11. Aspectos éticos

As mulheres aceitas para participar do estudo foram selecionadas considerando-se que as mesmas deveriam ser submetidas ao procedimento cirúrgico por patologia benigna ginecológica, como histerectomia abdominal, histerectomia vaginal, polipectomia ou curetagem uterina. A retirada de um fragmento do endométrio destas mulheres não ocasionou qualquer tipo de prejuízo ou risco adicional, pois foi obtido no mesmo tempo cirúrgico à qual foi submetida, procedimento este de rotina nos serviços do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia em que foram realizados. As amostras sanguíneas foram adquiridas no momento da venóclise necessária para realização do procedimento cirúrgico, desta forma também não houve desconforto adicional para a paciente.

Foi preservado o anonimato das mulheres, tendo acesso aos resultados obtidos apenas o pesquisador principal. Não houve remuneração financeira para as mulheres que participaram do estudo.

O Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo V) foi obtido pelo pesquisador principal no momento da entrevista na enfermaria, antes da realização da cirurgia, em duas vias, sendo ambas assinadas pelo pesquisador principal e pela mulher que participou do estudo, de forma que uma via ficou com a mesma.

Este estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM da Unicamp, sob parecer nº 905/2009, e foi registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, sob nº 0700.0.146.000-09. Foram obedecidos os preceitos da resolução 196/96 do Ministério da Saúde (Brasil, 1996). Foram cumpridos os princípios enunciados na Declaração de Helsinki, emenda de Edimburgo, Escócia, em outubro de 2000 para pesquisas biomédicas envolvendo seres humanos (World Medical Association, 2000).

7.2. Anexo 2 – Resultados

Noventa mulheres foram selecionadas para entrar no estudo, 5 foram excluídas por falta de material histológico adequado, sendo que 85 participaram do estudo. A idade média das mulheres foi de 56,8 anos, com tempo médio de menopausa de 81,5 meses (EP=6,39). O peso médio das mulheres foi 71kg (DP=12), com IMC médio de 29,3 (DP=5,2). Setenta e quatro (87%) mulheres apresentaram medidas de circunferência abdominal acima do ideal, com valores médios de 100,6 cm (DP=11,0). As características desta amostra estão dispostas na Tabela 4.

TABELA 4. Distribuição das mulheres segundo idade, tempo de menopausa, peso, IMC* e CA**

	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Mediana
Idade	56,8	6,5	41,0	72	56
Tempo menopausa	81,5	58	12,0	288	72
Peso	71	12	45,2	104	69
IMC	29,3	5,2	20,6	44	28,6
CA	100,6	11,0	78	124	99,5

* IMC (Kg/cm^2)= índice de massa corporal

** CA (cm) = circunferência abdominal

A análise hormonal confirmou o estado menopausal. Os valores médios de FSH foram de 65,0UI/L (DP=29,0) e os níveis séricos de estradiol apresentaram média de 14,8 pg/ml (DP=12,96). Quatorze mulheres (16,4%) apresentaram níveis séricos de estradiol aumentados, com valores superiores a 25pg/ml, contudo todas estas mulheres apresentavam níveis de FSH sérico e tempo de menopausa, que confirmaram o estado menopausal.

O índice de massa corporal (IMC) caracterizou-se por apresentar uma prevalência maior de sobrepeso e obesidade. Quarenta por cento das mulheres apresentaram algum grau de obesidade (Tabela 5).

TABELA 5. Distribuição das mulheres após a menopausa de acordo com o IMC

IMC	n	%
Peso normal (IMC 18,5 – 24,9)	20	23,5
Sobrepeso (IMC 25 – 29,9)	31	36,5
Obesidade GI (IMC 30 – 34,9)	23	27
Obesidade GII (IMC 35 – 39,9)	8	9,4
Obesidade GIII (IMC >40)	3	3,6
Total	85	100

* IMC (Kg/cm²)= = índice de massa corporal

Obtivemos apenas 11 (13%) mulheres com CA menor que 88cm, sendo que nenhuma destas apresentava obesidade. No entanto, todas as mulheres com algum grau de obesidade apresentaram alteração na CA.

Nas mulheres com IMC superior a 25, encontramos 93,5% com medida da circunferência abdominal superior a 88cm. Mesmo entre as mulheres com peso normal, 55% apresentaram alteração na CA, o que pode refletir neste grupo os elevados índices de obesidade visceral. Não houve correlação entre a CA e HOMA-IR com a idade ou com o tempo de menopausa.

Avaliando-se a glicemia foi observado que 28 mulheres (33%) apresentaram glicemia aumentada, sendo que a média foi de 109mg/dl (DP=38,4). A insulina sérica média foi de 11,7μU/mL (DP=12,0). O HOMA-IR calculado obteve média de 3,6 (DP=6,0) e mediana 2,0, apresentando-se alterado em 31 (36,5%) mulheres. A Tabela 6 mostra a correlação entre IMC, CA e HOMA-IR.

TABELA 6. Distribuição das mulheres segundo o IMC, CA e HOMA-IR

IMC	CA		HOMA-IR	
	n (%)		n (%)	
	<88	>88	< 2,7	> 2,7
Peso normal (IMC 18,5 – 24,9)	9 (45)	11 (55)	16 (80)	4 (20)
Sobrepeso (IMC 25 – 29,9)	2 (6,5)	29 (93,5)	21 (67,7)	10 (32,3)
Obesidade GI (IMC 30 – 34,9)	0	23 (100)	10 (43,5)	13 (56,5)
Obesidade GII (IMC 35 – 39,9)	0	8 (100)	6 (75)	2 (25)
Obesidade GIII (IMC >40)	0	3 (100)	1 (33,3)	2 (66,6)
Total	11 (13)	74 (87)	54(63,5)	31 (36,5)

Trinta mulheres (40,5%) com CA acima do normal apresentaram HOMA-IR acima de 2,7. No grupo com CA normal apenas uma mulher (9,1%) apresentou índice de HOMA-IR acima de 2,7.

A histologia endometrial apresentou quatro amostras com características proliferativas (Tabela 7). Oitenta e uma (95,3%) amostras apresentaram atrofia endometrial. Na análise dos receptores endometriais observamos grande expressão dos RE, RP e IGF-IR tanto no estroma como nas glândulas, como também nas amostras com proliferação como nas atróficas.

TABELA 7. Expressão dos receptores estrogênicos, progestogênicos, Bcl-2 e Ki-67 nas amostras endometriais proliferativas

	Idade	TM	E2	FSH	RE		RP		Bcl-2		Ki-67
					E	G	E	G	E	G	%
1	52	12	41,9	61,5	4	5	5	7	3	7	15
2	52	48	10,5	81,3	7	7	7	7	0	7	70
3	61	120	8,5	63,2	7	7	6	7	0	6	30
4	50	48	54	49	7	7	7	7	5	6	50

RE: receptores estrogênicos, RP: receptores progestogênicos, G: glandular, E: estromal
 TM: tempo menopausa, E2: estradiol, FSH: hormônio foliculo estimulante

Analisando a expressão dos RE e RP em relação ao número de células positivas e a intensidade com que estas células coram no estroma e nas glândulas endometriais, observamos que quanto maior a positividade de células maior a intensidade da sua coloração, mostrando que a intensidade está diretamente relacionada ao número de células positivas (Tabela 8).

Tabela 8. Expressão dos RE e RP segundo positividade e intensidade no estroma e glândula

Receptores	Intensidade n (%)				Positividade n (%)				
	0	1	2	3	0	1	2	3	4
RE estroma	9 (10,6)	11 (13)	23 (27)	41 (48)	9 (10,6)	4 (4,7)	11 (13)	18 (21,1)	42 (49,4)
RE glândula	1 (1,8)	8 (9,4)	28 (33)	47 (55,3)	1 (1,8)	2 (2,3)	3 (3,5)	14 (16,4)	64 (75,3)
Total	10 (2,9)	19 (5,6)	51 (15)	88 (25,9)	10 (2,9)	6 (1,7)	14 (4,1)	32(9,4)	106(31,1)
RP estroma	21 (24,7)	18(21,1)	28 (33)	17 (20)	21 (24,7)	6 (1,7)	11 (13)	22 (25,9)	24 (28,2)
RP glândula	11 (13)	11 (13)	29 (34,1)	33 (38,8)	11 (13)	1 (1,8)	7 (8,2)	11 (13)	54 (63,5)
Total	32 (9,4)	29 (8,5)	57 (16,7)	50 (14,7)	32 (9,4)	7 (2,0)	18 (5,3)	33 (9,7)	78 (23)

Quando avaliamos a expressão tecidual dos RE e dos RP, observamos que nos RE as células coram de forma moderada e intensa em 78,8% no estroma e em 94,1% nas glândulas endometriais. Foram negativas ou coraram-se fracamente 21,2% das amostras no estroma e 5,9% nas glândulas.

Portanto, quando a expressão dos RE foi intensa, as células glandulares apresentaram maior porcentagem de receptores expressos do que no estroma. Por outro lado, quando a expressão dos RE foi negativa, fraca ou moderada as células estromais apresentaram maior porcentagem de receptores expressos do que as glandulares (Figura 11).

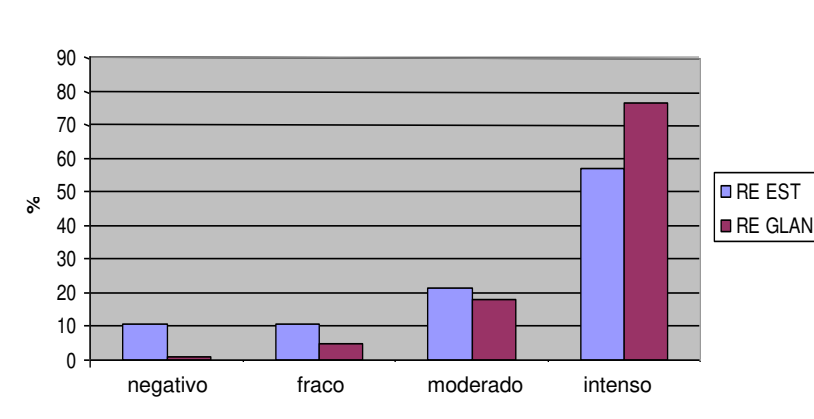


FIGURA 11. Porcentagem de células expressas com RE no estroma e glândula de acordo com sua expressão.

Os RP apresentaram expressão moderada e intensa em 61,2% das amostras no estroma e 80% nas glândulas. A expressão dos RP foi negativa ou fraca em 38,8% no estroma e 20% nas glândulas.

Da mesma forma que os RE, quando a expressão dos RP foi intensa as células glândulares apresentaram maior porcentagem de receptores que as células estromais. Quando a expressão dos RP foi negativa, fraca ou moderada, prevaleceram as células estromais (Figura 12).

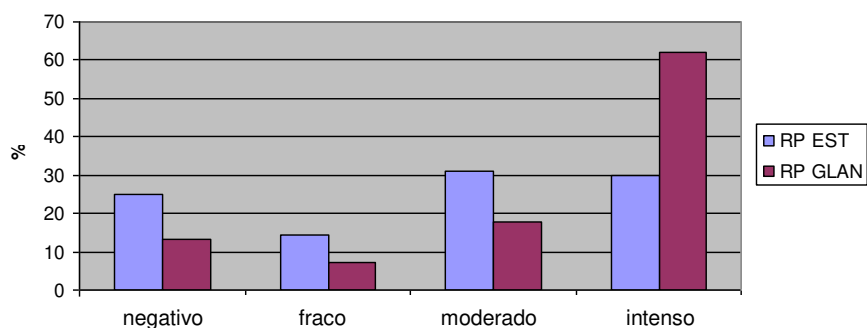


FIGURA 12. Porcentagem de células expressas com RP no estroma e glândula de acordo com sua expressão.

Observamos, portanto, que a expressão dos RE e RP variam segundo padrão semelhante que sugere um mesmo estímulo para os dois receptores.

Não houve correlação entre a idade, tempo de menopausa, peso e IMC com os RE e RP. Os RE estromais apresentaram correlação com estradiol ($p=0.0213$), insulina ($p=0.0494$) e HOMA-IR ($p=0,0378$), porém não foi observada correlação com a CA ($p=0,0719$). A Tabela 9 mostra a correlação entre RE, CA e HOMA-IR.

TABELA 9. Correlação entre expressão dos receptores estrogênicos, circunferência abdominal e HOMA-IR no estroma e na glândula

	RE Estroma*				RE Glândula**			
	***n	f	m	i n	f	m	i	
CA ^a < 88	0	3 (27,2)	1 (9,0)	7 (63,6)	0	1 (9)	2 (18)	8 (73)
CA > 88	8 (10,8)	7 (9,5)	17 (23)	42 (56,7)	1 (13,5)	3 (4)	13 (17,6)	57 (77)
HOMA-IR ^b <2,7	7 (13,2)	6 (11,3)	11 (20,7)	29 (54,7)	1 (1,8)	3 (5,5)	9 (16,4)	42 (76,3)
HOMA-IR >2,7	1 (3,1)	4 (12,5)	7 (21,9)	20 (62,5)	0	1 (3,3)	6 (20)	23 (76,7)

*a(p=0,0719), **a(p=0,7309), **b(p=0,0378) **b(p=0,1932)

***n – negativo, f – fraco, m – moderado, i - intenso

Quando categorizamos a CA, observamos que conforme ocorre o seu aumento também aumenta a expressão dos receptores, tanto no estroma como nas glândulas. Porém, observamos que a porcentagem de células com expressão tecidual aumenta de maneira independente da CA (Figura 13).

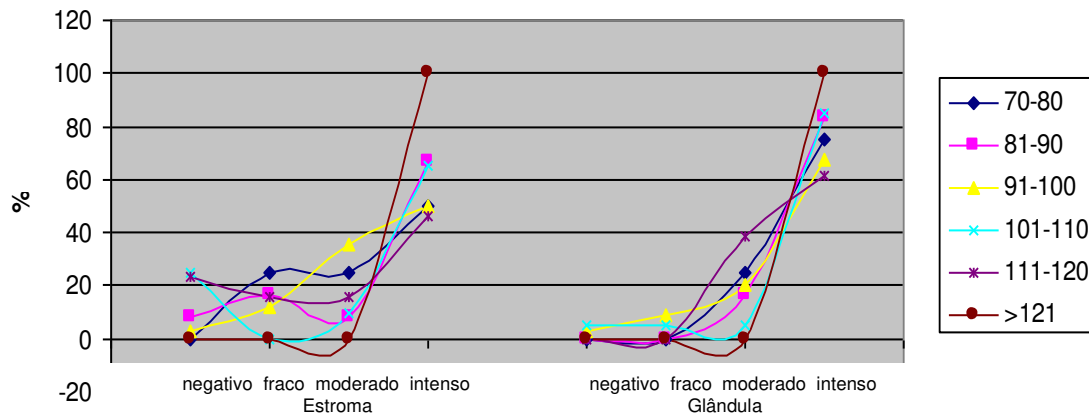


FIGURA 13. Porcentagem de células expressas com RE no estroma e glândula de acordo com a circunferência abdominal.

Analisando o IMC não observamos correlação estatística com os RE. A Tabela 10 mostra a distribuição dos RE conforme o IMC.

TABELA 10. Correlação entre expressão dos receptores estrogênicos e IMC no estroma e na glândula

IMC ^a	RE* Estroma				RE** Glândula			
	*n	f	m	i	n	F	m	i
Peso normal	1 (5)	2 (10)	3 (15)	14 (70)	0	0	3 (15)	17 (85)
Sobrepeso	2 (6,4)	4 (12,9)	8 (25,9)	17 (54,8)	1 (3,2)	3 (9,7)	4 (12,9)	23 (74,2)
Obesidade GI	4 (17,4)	3 (13)	5 (21,7)	11 (47,8)	1 (4,3)	1 (4,3)	5 (21,7)	16 (69,6)
Obesidade GII	2 (25)	0	1 (12,5)	5 (62,5)	0	0	1 (12,5)	7 (87,5)
Obesidade GIII	1(33,3)	0	1 (33,3)	1 (33,3)	0	0	2 (66,6)	1 (33,3)

*a (p= 0,2849), **a (p=0,6418)

*n – negativo, f – fraco, m – moderado, i - intenso

Também observamos uma porcentagem de células com expressão maior dos RE no estroma e nas glândulas, tanto nas mulheres com peso normal quanto nas com sobrepeso e obesidade. Com exceção a obesidade GIII nas glândulas. A figura 14 mostra esta distribuição no estroma e nas glândulas.

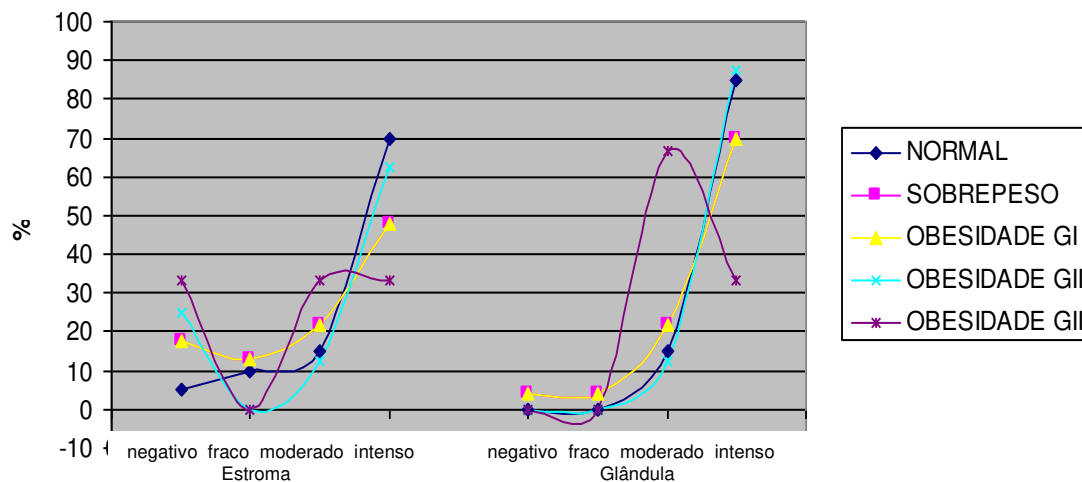


FIGURA 14. Porcentagem de células expressas com RE no estroma e glândula de acordo com IMC.

Os RP também apresentaram, tanto no estroma como nas glândulas, correlação com a insulina ($p=0,0039$ e $0,0126$) e HOMA-IR ($p=0,0083$ e $0,0034$) respectivamente. No entanto, também apresentaram correlação significativa para a CA ($p=0,017$) (Tabela 11).

TABELA 11. Correlação entre expressão dos receptores progesterogênicos, circunferência abdominal e HOMA-IR no estroma e na glândula

	RP* Estroma				RP** Glândula			
	*n	f	m	i	n	F	m	i
CA ^a < 88	5 (45,5)	0	3(27,3)	3 (27,3)	0	0	2 (18,1)	9 (81,9)
CA > 88	16 (21,6)	12 (16,2)	24 (32,4)	22 (29,7)	11 (14,8)	6 (8,1)	14 (19)	43 (58,1)
HOMA-IR ^b <2,7	17(31,5)	8 (14,8)	15 (27,7)	14 (26)	10 (18,5)	5 (9,2)	10 (18,5)	29 (53,7)
HOMA-IR >2,7	4 (13)	4 (13)	12(38,6)	11 (35,4)	1 (3,2)	1 (3,2)	6 (19,4)	23 (74,2)

*a ($p=0,038$) **a ($p=0,017$) *b ($p=0,0083$) **b ($p=0,0034$)

*n – negativo, f – fraco, m – moderado, i - intenso

Analisando o IMC, não observamos correlação com os RP. A distribuição dos receptores em relação a sua expressão, conforme o IMC pode ser observada na Tabela 12.

TABELA 12. Correlação entre expressão dos receptores progesterogênicos e IMC no estroma e na glândula

IMC ^a	RP* Estroma				RP** Glândula			
	*n	f	m	i	n	F	m	i
Peso normal	5 (26,4)	2 (10,5)	5 (26,3)	7 (36,8)	3 (15)	0	5 (25)	12 (60)
Sobrepeso	6 (19,4)	8 (25,8)	9 (29)	8 (25,8)	6 (18,7)	4 (12,5)	5 (15,6)	17 (53,1)
Obesidade GI	7 (29,2)	1 (4,2)	11 (45,8)	5 (20,8)	4 (16)	2 (8)	4 (16)	15 (60)
Obesidade GII	2 (25)	1 (12,5)	2 (25)	3 (37,5)	0	0	1 (14,3)	6 (85,7)
Obesidade GIII	1 (25)	0	0	2 (75)	0	0	1 (33,3)	2 (66,6)

*a ($p=0,3518$) **a ($p=0,7448$)

*n – negativo, f – fraco, m – moderado, i - intenso

Também encontramos porcentagem de células com expressão maior dos RP, tanto no estroma como nas glândulas para todas as categorizações do IMC, com exceção à obesidade GI no estroma (Figura 15).

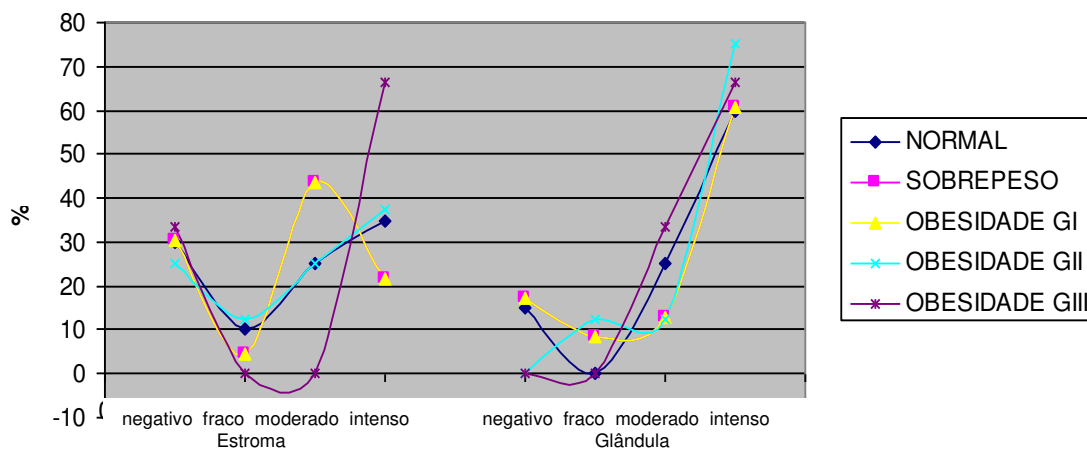


FIGURA 15. Porcentagem de células expressas com RP no estroma e glândula de acordo com IMC.

Na análise dos receptores de IGF-1 observamos expressão moderada e intensa em 57,6% no estroma e em 78,8% nas glândulas endometriais. No estroma 42,4% e nas glândulas 21,2% das amostras foram negativas ou apresentaram expressão fraca.

Ao analisar a proporção de células positivas e sua intensidade na coloração dos IGF-1R, tanto no estroma como nas células glandulares endometriais, observamos da mesma forma que para os RE e RP, que quanto maior a positividade maior a intensidade da coloração. Quando a expressão do IGF-1R é negativa, fraca ou moderada, o estroma apresenta maior porcentagem de receptores, no entanto quando a expressão dos IGF-1R é intensa, as células glandulares apresentam maior porcentagem de receptores (Figura 16).

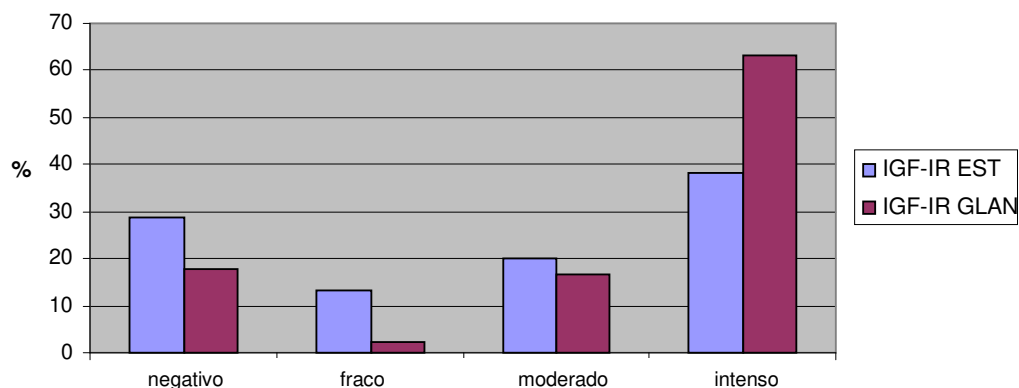


FIGURA 16. Porcentagem de células expressas com IGF-1R no estroma e glândula de acordo com sua expressão.

Encontramos correlação entre os níveis de expressão dos IGF-1R e RE ($p=0,0258$) e RP ($p=0,002$).

Observamos correlação inversa entre IGF-1R na glândula e os níveis de estrogênio sérico ($p=0,0410$) ($r=-0,224$) e relação direta com a CA. Não foi encontrada correlação estatística entre IGF-1R e HOMA-IR (Tabela 13).

TABELA 13. Correlação entre expressão dos receptores IGF-I, circunferência abdominal e HOMA-IR no estroma e na glândula

	IGF-1R* Estroma				IGF-1R** Glândula			
	*n	f	m	i	n	F	m	i
CA ^a < 88	4 (36,3)	1 (9,1)	2 (18,2)	4 (36,4)	0	2 (18,2)	5 (45,4)	4 (36,4)
CA > 88	21 (28,4)	10 (13,5)	17 (23)	26 (35,1)	16 (21,6)	0	10 (13,5)	48 (64,9)
HOMA-IR ^b <2,7	15 (27,8)	9 (16,6)	9 (16,6)	21 (38,9)	9 (16,6)	2 (3,7)	11 (20,4)	32 (59,2)
HOMA-IR >2,7	9 (29)	3 (9,6)	8 (25,9)	11 (35,5)	7 (22,6)	0	3 (9,6)	21 (67,8)

*a ($p=0,0080$) **a ($p=0,0189$)*b ($p=0,7932$) **b ($p=0,9656$)

*n – negativo, f – fraco, m – moderado, i - intenso

Analisando a correlação entre IGF-1R e HOMA-IR observamos padrão na distribuição dos receptores onde o aumento da porcentagem de células expressas no tecido independe do índice HOMA-IR (Figura 17).

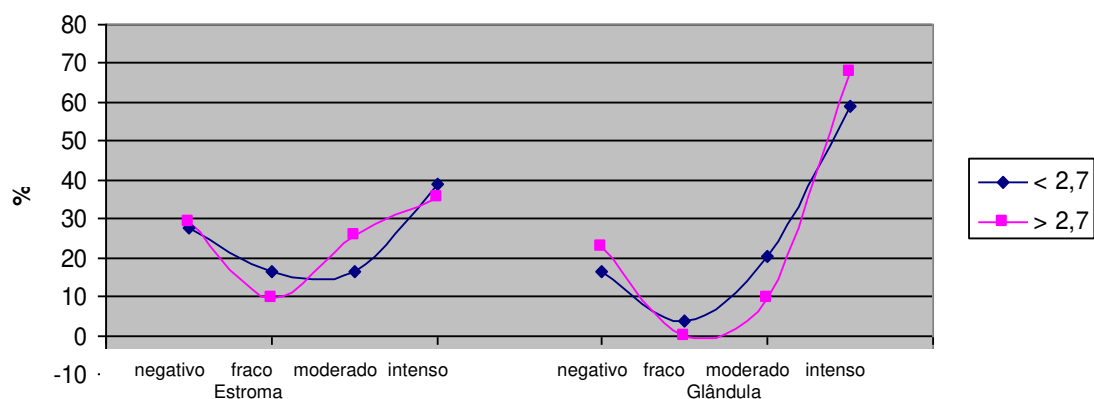


FIGURA 17. Porcentagem de células expressas com IGF-1R no estroma e glândula de acordo com HOMA-IR.

A expressão dos IGF-1R também não mostrou qualquer relação com o IMC, resultados semelhantes aos apresentados no RE e RP, conforme Tabela 14.

Tabela 14. Correlação entre expressão dos receptores IGF-1 e IMC no estroma e na glândula

IMC ^a	IGF-1R* Estroma				IGF-1R** Glândula			
	*n	f	m	i	n	f	m	i
Peso normal	6 (31,6)	2 (10,5)	4 (21,0)	7 (36,8)	4 (20)	1 (5)	5 (25)	10 (50)
Sobrepeso	8 (25)	5 (15,6)	10 (31,2)	9 (28,1)	5 (15,6)	1 (3,1)	7 (21,9)	19 (59,4)
Obesidade GI	7 (31,8)	3 (13,6)	3 (13,6)	9 (41)	5 (17,4)	0	3 (13)	15 (70)
Obesidade GII	3 (37,5)	1 (12,5)	0	4 (50)	1 (12,5)	0	0	7 (87,5)
Obesidade GIII	1 (33,3)	0	1 (33,3)	1 (33,3)	1 (50)	0	0	1 (50)

*a (p=0,9445) **a (p=0,1294)

*n – negativo, f – fraco, m – moderado, i - intenso

Da mesma forma que para os RE e RP, também observamos uma porcentagem maior de células expressando IGR-1R tanto no estroma como nas glândulas, independente do IMC. A Figura 18 mostra esta distribuição no estroma e nas glândulas.

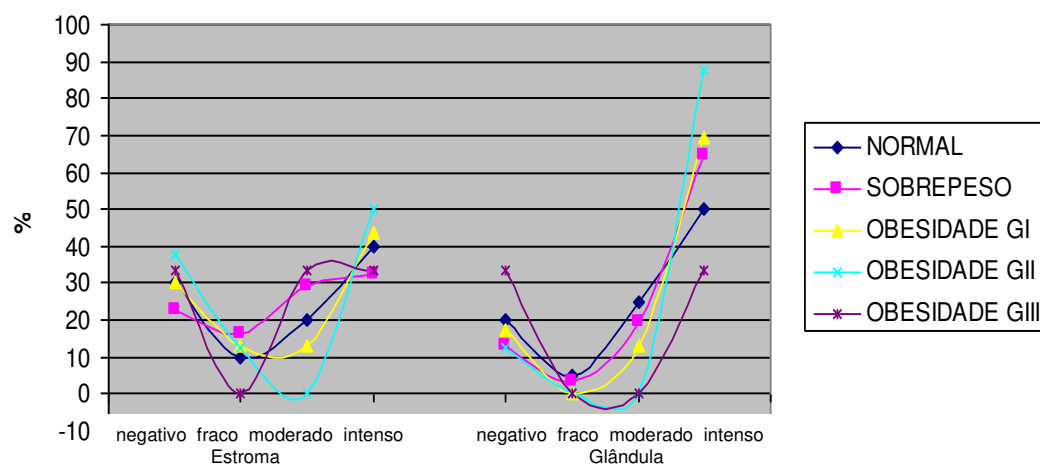


FIGURA 18. Porcentagem de células expressas com IGF-1R no estroma e glândula de acordo com IMC.

Sessenta e quatro (75,3%) amostras apresentaram expressão para Ki-67, sendo maior nas glândulas do que no estroma. Apenas vinte e uma (24,7%) amostras não apresentaram expressão. Apesar da alta expressão do Ki-67 no tecido endometrial, o número de células com mitose raramente foi superior a 10% (Figura 19).

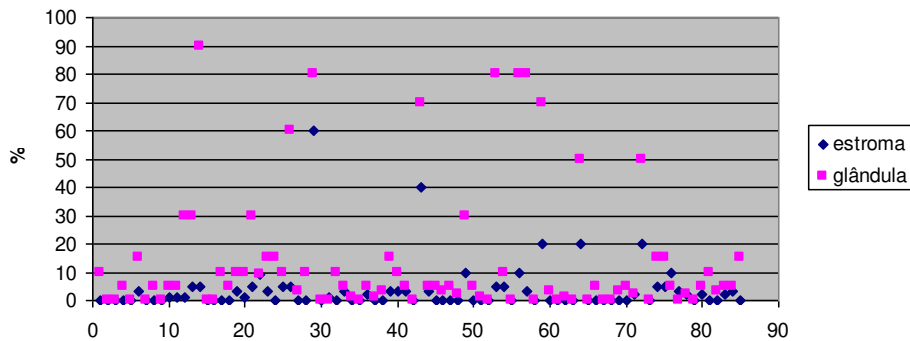


FIGURA 19. Porcentagem de células expressas com Ki-67 no estroma e glândula.

Observamos correlação estatística entre Ki-67, RE, RP e Bcl-2, apesar de fracamente positiva com ($r < 0,5$). Não encontramos correlação entre Ki-67 com nenhuma outra variável estudada (Tabela 15).

TABELA 15. Correlação entre Ki-67 e RE, RP e Bcl-2 no estroma e glândula

	Ki-67 estroma		Ki-67 glândula	
	p-valor	r	p-valor	r
RE estroma	0,0291	0,240	0,0244	0,247
RE glândula	0,0017	0,338	0,0253	0,244
RP estroma	0,0040	0,311	0,0039	0,312
RP glândula	0,0003	0,388	<.0001	0,436
Bcl-2 estroma	0,0004	0,375	0,0004	0,377
Bcl-2 glândula	0,0003	0,384	<.0001	0,419

Analisando os receptores estromais e glandulares do Bcl-2 encontramos 44,7% de expressão moderada e intensa no estroma e 65,9% de expressão moderada nas células glandulares. Observamos que a porcentagem de receptores no estroma é maior quando a expressão é negativa ou fraca. Quando a intensidade da expressão é moderada ou intensa, ocorre uma porcentagem maior de receptores localizados nas glândulas endometriais (Figura 20).

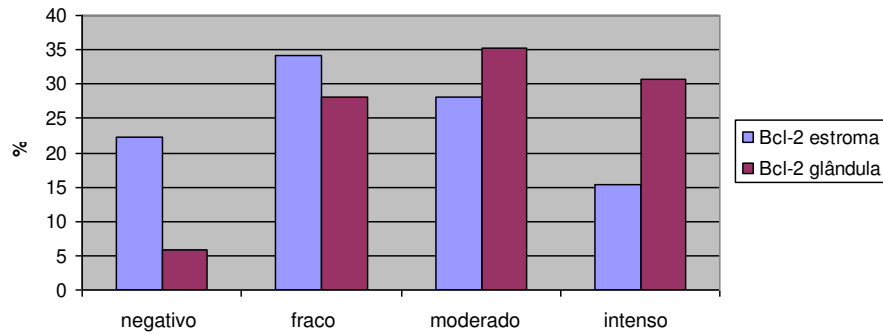


FIGURA 20. Percentagem de células expressas com Bcl-2 no estroma e glândula.

Os receptores Bcl-2 correlacionaram-se com RE ($p=0,0354$), RP ($p=0,0427$) e Ki-67 ($p=0,0409$). Não encontramos correlação significativa dos receptores Bcl-2 com IMC ($p=0,6184$, índice HOMA-IR ($p=0,4581$) ou CA ($p=0,8871$).

A figura abaixo exemplifica a expressão dos diversos receptores endometriais (Figura 21).

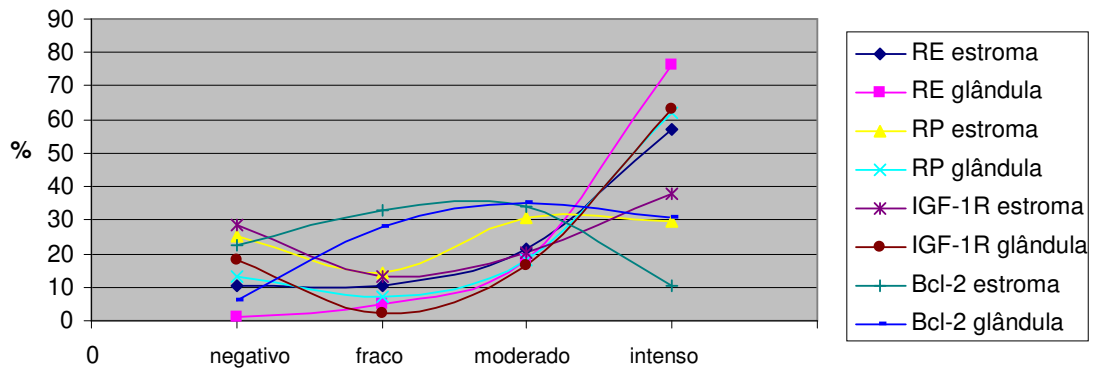


FIGURA 21. Correlação das expressões dos receptores endometriais

7.3. Anexo 3 – Check List

AVALIAÇÃO DE RECEPTORES ESTERÓIDES ENDOMETRIAIS, KI-67 E BCL-2 E SUAS CORRELAÇÕES COM IMC E RESISTÊNCIA INSULÍNICA EM MULHERES APÓS A MENOPAUSA

Estou realizando um estudo onde após a sua cirurgia, deverá ser retirado um pouco de tecido do endométrio, onde será feito algumas análises. Caso a senhora esteja interessada em participar deste estudo é necessário responder a algumas perguntas:

- | | | |
|----|---|--------------------|
| 1) | Qual a sua idade? | 40 a 70 anos |
| 2) | Há quanto tempo não menstrua | > 1 ano e < 15anos |
| 3) | Quanto tempo não toma hormonio | > seis meses |
| 4) | A senhora já retirou o útero | Não |
| 5) | A senhora já teve alteração no endométrio | Não |
| 6) | A senhora já teve que usar Tamoxifeno | Não |

7.4. Anexo 4 – Ficha de Coleta de Dados

AVALIAÇÃO DE RECEPTORES ESTERÓIDES ENDOMETRIAIS, KI-67 E BCL-2 E SUAS CORRELAÇÕES COM IMC E RESISTÊNCIA INSULÍNICA EM MULHERES APÓS A MENOPAUSA

Registro

DADOS GERAIS

Data	<input type="text"/>
Idade (anos)	<input type="text"/>
Altura (cm)	<input type="text"/>
Peso (Kg)	<input type="text"/>
Índice de massa corporal (cm ² /Kg)	(0) < 24,9 (I) 25-29,9 (II) 30-39,9 (III) >40
Circunferência abdominal	<input type="text"/> cm
Tempo de menopausa	<input type="text"/> meses

RESULTADO DOS EXAMES LABORATORIAIS

Estrogênio	<input type="text"/>
FSH	<input type="text"/>
Glicemia	<input type="text"/>
Insulinemia	<input type="text"/>
HOMA-IR	<input type="text"/>

RESULTADOS DA IMUNOHISTOQUÍMICA

Proporção de células positivas nos núcleos das células glandulares e das células estromais

RECEPTORES	CÉLULAS ESTROMAIS	CÉLULAS GLANDULARES
ESTROGÊNIO	(0) ausência (1) até 25% células (2) <25 e >50% (3) >50 e <75% (4) >75%	(0) ausência (1) até 25% células (2) <25 e >50% (3) >50 e <75% (4) >75%
PROGESTERONA	(0) ausência (1) até 25% células (2) <25 e >50% (3) >50 e <75% (4) >75%	(0) ausência (1) até 25% células (2) <25 e >50% (3) >50 e <75% (4) >75%
IGF-1	(0) ausência (1) até 25% células (2) <25 e >50% (3) >50 e <75% (4) >75%	(0) ausência (1) até 25% células (2) <25 e >50% (3) >50 e <75% (4) >75%

Ki-67	(.....) %	(.....) %
Bcl-2	(0) ausência (1) até 25% células (2) <25 e >50% (3) >50 e <75% (4) >75%	(0) ausência (1) até 25% células (2) <25 e >50% (3) >50 e <75% (4) >75%

Intensidade da coloração nuclear

RECEPTORES	CÉLULAS ESTROMAIS	CÉLULAS GLANDULARES
ESTROGÊNIO	(0) ausência de coloração (1) fracamente positiva (2) moderada intensidade (3) forte intensidade	(0) ausência de coloração (1) fracamente positiva (2) moderada intensidade (3) forte intensidade
PROGESTERONA	(0) ausência de coloração (1) fracamente positiva (2) moderada intensidade (3) forte intensidade	(0) ausência de coloração (1) fracamente positiva (2) moderada intensidade (3) forte intensidade
IGF-1	(0) ausência de coloração (1) fracamente positiva (2) moderada intensidade (3) forte intensidade	(0) ausência de coloração (1) fracamente positiva (2) moderada intensidade (3) forte intensidade
Ki-67	(.....)%	(.....)%
Bcl-2	(0) ausência de coloração (1) fracamente positiva (2) moderada intensidade (3) forte intensidade	(0) ausência de coloração (1) fracamente positiva (2) moderada intensidade (3) forte intensidade

IDENTIFICAÇÃO

Prontuário

Nome _____

Endereço _____

Cidade _____

CEP

Telefone

7.5. Anexo 5 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

AVALIAÇÃO DE RECEPTORES ESTERÓIDES ENDOMETRIAIS, KI-67 E BCL-2 E SUAS CORRELAÇÕES COM IMC E RESISTÊNCIA INSULÍNICA EM MULHERES APÓS A MENOPAUSA

Pesquisador: Luis Paulo Galvão Wolff

Eu _____, _____ anos, RG nº _____, telefone _____, aceito participar como voluntária no estudo que tem como objetivo avaliar as alterações da camada interna do meu útero em decorrência do meu peso corporal e da minha menopausa.

O procedimento para retirada do fragmento desta camada do meu útero chamada de endométrio será realizada no mesmo momento da cirurgia a qual serei submetida e que independe deste estudo, desta forma não haverá nenhum desconforto ou risco adicional neste procedimento. Os resultados deste estudo vão auxiliar no entendimento dos riscos que a alteração do peso corporal e a obesidade podem promover no desenvolvimento do câncer de endométrio.

Fui informada que será realizada dosagem sanguínea de FSH, estradiol, glicemia e insulina, no momento da cirurgia. Como o exame será realizado no momento do procedimento cirúrgico, não terei que coletar uma amostra de sangue adicional.

As informações adquiridas e os resultados dos exames serão utilizados exclusivamente para a pesquisa, e não haverá identificação da minha pessoa. Caso eu tenha qualquer dúvida a respeito deste estudo, terei toda orientação do médico responsável, bem como poderei desistir de participar em qualquer momento, sem que isto possa causar qualquer prejuízo em relação ao meu atendimento atual ou futuro neste serviço.

Qualquer informação adicional entrar em contato com Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp pelo telefone (019) 3521-8936.

Nome: _____ RG _____

Pesquisador: _____
Luis Paulo Galvão Wolff
RG 20.787.272
Tel. (012) 3645-5353