



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DA VIA DE SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR DO
FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA TIPO 1 NO CÂNCER DE
ENDOMÉTRIO**

Vânia Marisia Santos Fortes dos Reis

Orientador: Prof. Dr. Edison Capp

Porto Alegre, março de 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

**ANÁLISE DA VIA DE SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR DO FATOR DE
CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA TIPO 1 NO CÂNCER DE
ENDOMÉTRIO**

Vânia Marisia Santos Fortes dos Reis

Orientador: Prof. Dr. Edison Capp

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, março de 2018

*“Ja'me tem luz dum estrela
E na nha caminhada
Dinha lua ta vigiá
Pa tud di bom
Ser v'rado prata
Pa um manto leitoso
Acolhê nhas posse...”*
Cesárea Évora

***Aos meus sonhos _ que eles sejam livres.
Que nunca me falte perseverança. Que nunca me falte o amor dos meus amores,
nem a esperança que me move a cada despedida. Assim, sei que sou forte.***

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edison Capp, por sempre me oferecer oportunidades de crescimento e pelo voto de confiança. Obrigada por me impulsionar a alcançar a minha melhor versão. Consigo, aprendi que só nós temos o poder de nos limitar.

À Profa. Dra. Ilma Simoni Brum, por me conduzir pelos caminhos da pesquisa e me ensinar a ser resiliente. Por ser um exemplo de mulher forte e líder, com a qual tenho o prazer de conviver e aprender desde que me acolheu no laboratório.

À Profa. Dra. Helena von Eye Corleta, por ter estado sempre disponível para ensinar, aconselhar e, sobretudo, por ter-me ajudado a respirar e manter a calma nas horas de desespero. Vejo, em si, tranquilidade, sabedoria e sorrisos.

À Dra. Rosilene Jara Reis, por ter-me recebido de braços abertos. Confiou no meu trabalho e me proporcionou esperança. Sou profundamente agradecida por toda a ajuda e pelo carinho que demonstrou.

À Dra. Amanda de Barros Machado, por me apoiar e me dar norte quando precisei. Por me encorajar e mostrar que, talvez, o melhor aprendizado venha dos erros. Obrigada pela amizade, confio em ti e sei que me vê.

Aos meus colegas de laboratório, por terem proporcionado um ambiente de descontração e muitas risadas. Em especial, à Dra. Lolita Schneider Pizzolato pelo trabalho incessante e por me ajudar durante todo esse tempo. Agradeço muito pelo conhecimento compartilhado.

Aos meus pais, Dilma Fortes e José Reis, a quem me doo de corpo e alma. O vosso amor é incondicional, é a certeza que preciso para seguir em frente. Sou grata por toda a dedicação, pelas oportunidades, pela confiança que depositam em mim. Mas minha gratidão vai além - a essência de vocês, me fez ser.

Aos meus pequenos amores, Lua e Luan, por me inspirarem a ser uma pessoa melhor. A toda a minha família, por serem compreensivos com a minha ausência e me encherem de carinho além do Atlântico. Sinto a falta de vocês todos os dias.

À minha melhor amiga, Vanda Medina, por estar do meu lado, acompanhando e torcendo a cada etapa, por estar comigo pelas calçadas da vida e por me segurar sempre que caio. Saiba que estamos de mãos dadas e prometo ser sempre melhor para ti. Amo ser nós. Amo você.

À Karen Puma, por todo o amor em forma de cuidado. Caminhou comigo esta jornada, foi parceira incondicional e, com certeza, deixou tudo mais leve. Obrigada por me mostrar as flores e os espinhos, obrigada pelas vezes que me fez sorrir quando queria chorar e obrigada por me fazer acreditar em mim.

RESUMO

O câncer de endométrio tem incidência crescente, principalmente nos países desenvolvidos, devido ao estilo de vida moderno, aumento de casos de obesidade e diabetes, e diversos outros fatores que, em conjunto, estão tornando esta neoplasia na mais comum no trato reprodutor feminino. Ele é bastante influenciado pelo estado hormonal e por fatores reprodutivos das pacientes. Assim, é mais frequente no período pós-menopausa, quando pode ocorrer um desequilíbrio na sinalização do estrogênio. A diabetes e a obesidade são causadas, principalmente, pelo excesso de triglicerídeos e glicose circulantes, e pela resistência à insulina. A hiperglicemia leva à produção excessiva de insulina e do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1), sendo que estes hormônios são considerados antiapoptóticos e promotores da proliferação celular. Sabe-se que eles agem por vias semelhantes e que, provavelmente, o mecanismo responsável pela proliferação provocada por eles está associado à via PI3K/Akt/mTOR. Desta forma, avaliamos a expressão gênica de 92 genes na rota de sinalização do IGF1R em câncer de endométrio (n=3) e endométrio normal (n=2), através da técnica de qRT-PCR (ensaio *TaqMan® Array Human IGF1R Signaling*). Dentro destes genes, alguns estão envolvidos diretamente com a via PI3K/Akt/MAPK, outros estão implicados em processos como proliferação, diferenciação, tumorigênese, apoptose, resposta imune, síntese proteica, entre outros. Avaliamos, também, os níveis proteicos do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF1R), IGF1 e receptor da insulina (IR) pela técnica de imunohistoquímica, além da funcionalidade geral dos 4 genes mais diferencialmente expressos no câncer de endométrio. Observamos que, dos 92 genes, 26 foram expressos somente no grupo câncer - *CACNA1H, CRK, EIF2B5, ELK1, FRAP1 (MTOR), GYS1, HRAS, IGF2, IKBKB, IKBKE, ITPR3, KRAS, NFAT5, NFATC1, NFKB1, NFKBIB, NFKBIE, PIK3CA, PIK3CB, PLCB1, PLCB2, PLCG2, PRK CZ, RELB, SHC1 e YWHAZ*; 46 tiveram expressão aumentada no grupo câncer de endométrio - *AKT1, AKT2, ARAF, ATF4, BAD, BRAF, CACNA1C, CALM1, CALM2, CALM3, CREB1, EIF4E, FOXO3, GSK3B, IGF1, IGF1R, IKBKG, IRS1, MAP2K1, MAP2K2, MAPK3, MEF2C, MEF2D, NFATC2, NFATC3, NFKB2, NFKBIA, NRAS, PDPK1, PIK3CD, PIK3R1, PIK3R2, PLCG1, PPP3CA, PPP3R1, PRKCI, RAF1, RAPGEF1, RELA, RPS6,*

RPS6KB1, SOS1, YWHAB, YWHAE, YWHAH e YWHAQ, um não apresentou expressão em nenhum dos grupos (SLC2A4) e não foi possível analisar os restantes 20 genes, pois não foram expressos em todas as amostras. Quanto à expressão das proteínas IGF1R, IGF1 e IR, todas se mostraram mais expressas no câncer de endométrio e que se encontram localizadas principalmente no citoplasma das células. Assim, este trabalho mostra que a sinalização do IGF1R pode ter participação importante na aquisição do fenótipo maligno das células endometriais, e que o aumento das moléculas efetoras desta via no câncer de endométrio provavelmente está relacionado ao seu papel mitogênico.

PALAVRAS-CHAVE: câncer de endométrio; IGF1, vias de sinalização

ABSTRACT

Endometrial cancer has a growing incidence, especially in developed countries, because of the modern lifestyle, increased cases of obesity and diabetes, and several other factors that together make this disease the most common in the female reproductive tract. Endometrial cancer is strongly influenced by the hormonal state and by the reproductive factors of the patients. Thus, it is attributed to the postmenopausal period, when estrogen signaling can be unbalanced, and consequently lead to malignant proliferative patterns. Diabetes and obesity are caused mainly by the excess of circulating triglycerides and glucose, and by insulin resistance. Hyperglycemia leads to excessive production of insulin and IGF1. These hormones are considered to have antiapoptotic effects and to promote cell proliferation. It is known that they are very similar pathways, and the mechanism responsible for this proliferation is associated with the PI3K/Akt/mTOR pathway. Thus, we evaluated the expression of 92 genes in IGF1R signaling pathway in endometrial cancer (n = 3) and normal endometrium (n = 2), using qRT-PCR (TaqMan® Array Human IGF1R Signaling test). Within these genes, some are in the PI3K/Akt/MAPK pathways, others are involved in proliferation, differentiation, tumorigenesis, apoptosis, immune response, protein synthesis, among others. We also evaluated the protein levels of IGF1R, IGF1 and IR by immunohistochemistry, as well as the general functionality of the 4 most differentially expressed genes in endometrial cancer. We found that 26 genes were expressed only in endometrial cancer - CACNA1H, CRK, EIF2B5, ELK1, FRAP1 (mTOR), GYS1, HRAS, IGF2, IKBKB, IKBKE, ITPR3, KRAS, NFAT5, NFATc1, NFKB1, NFKBIB, NFKBIE, PIK3CA, PIK3CB, PLCB1, PLCB2, PLCG2, PRKCZ, RELB, SHC1 and YWHAZ; 46 had increased expression in endometrial cancer, when compared to control group - AKT1, AKT2, ARAF, ATF4, BAD, BRAF, CACNA1C, CALM1, CALM2, CALM3, CREB1, eIF4E, FOXO3, GSK3B, IGF1, IGF1R IKBKG, IRS1, MAP2K1, MAP2K2, MAPK3, MEF2C, MEF2D, NFATC2, NFATC3, NFKB2, NFKBIA, PIK3R1, PIK3R2, PLCG1, PPP3CA, PPP3R1, PRKCI, RAF1, RAPGEF1, RELA, RPS6, RPS6KB1, SOS1, YWHAB, YWHAE, YWHAH and YWHAQ, one showed no expression in neither groups (SLC2A4) and the other 20 were not expressed in all samples, so we decided not to analyze them. As for the expression of IGF1R, IGF1 and IR proteins, all them showed increased expression in endometrial

cancer and were localized in the cytoplasm. Thus, this work shows that IGF1R signaling may play an important role in the acquisition of a malignant phenotype by endometrial cells, and that the increase of these effectors in endometrial cancer is related to its mitogenic effects.

PAVRAS-CHAVE: endometrial cancer; IGF1; signalling pathways

SUMÁRIO

RESUMO	0
ABSTRACT	0
LISTA DE ABREVIATURAS	4
LISTA DE FIGURAS	17
LISTA DE TABELAS	18
INTRODUÇÃO	19
1. Endométrio	19
2. Caracterização do Câncer de Endométrio	21
2.1. O papel da Diabetes e da Hiperinsulinemia	31
2.2. Obesidade como fator de risco	33
2.3. Sinalização do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1R)	34
2.4. Alterações moleculares no carcinoma endometrial	38
JUSTIFICATIVA	41
HIPÓTESES	42
OBJETIVOS	43
MATERIAIS E MÉTODOS	44
Delineamento do estudo	44
Pacientes e coleta de amostras	44
Exame Anatomopatológico e classificação dos tumores	44
Aspectos éticos:	45
Extração e quantificação de RNA total	45
Síntese do cDNA	46
Análise da expressão proteica	63
Análise da rede de interações na via de sinalização do IGF1R	63
Estudos funcionais do produto gênico	64
População e amostra	64
Análise estatística	65

Locais de realização do projeto -----	65
Fontes de financiamento-----	66
Descarte de resíduos -----	66
RESULTADOS-----	67
DISCUSSÃO -----	88
CONCLUSÃO -----	105
REFERÊNCIAS-----	106
ANEXO 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes com Câncer de Endométrio-----	131
ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes controle ---	133

LISTA DE ABREVIATURAS

18S - RNA ribossomal

AJCC - *American Joint Committee on Cancer*

AKT - *AKT Serine/Threonine Kinase*

ARAF - *A-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase*

ATF4 - *Activating Transcription Factor 4*

ATP - Trifosfato de adenosina

BAD - *Bcl-2 associated agonist of cell death*

BAX - *Bcl-2-like protein 4*

BCL-2 - *B-cell lymphoma 2*

BCL-XL - *B-cell lymphoma-extra large*

BRAF - *B-Raf Proto-Oncogene*

CALM - Calmodulina

CAMK2 - *Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase II*

CAPEP - Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CASP9 - Caspase 9

cDNA - DNA complementar

CK1/2 - *Casein Kinase 1/2*

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CREB1 - *CAMP Responsive Element Binding Protein 1*

CRK - *CRK Proto-Oncogene*

CT - *Threshold cycle*

CXCL8 - Interleucina 8

DAG - Diacilglicerol

DEPC - Dietilpirocarbonato

DMT2 - Diabetes mellitus tipo II

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DSCR1 - *Down syndrome critical region gene 1*

DYRK1 - *Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A*

E2 - Estrogênio

EGF - Fator de crescimento epidermal

EIF4E - *Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E*

ELK1 - *ETS transcription factor*

ER - Receptor de estrogênio

ERK - *Extracellular signal-regulated kinase*

FAPERGS - Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do RS

FGFR2 - *Fibroblast growth factor receptor 2*

FIGO - Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

FIPE - Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do HCPA

FOXO - *Forkhead box O*

FOXO3 - *Forkhead Box O3*

FSH - Hormônio folículo estimulante

GAPDH - *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*

GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofinas

GSK3 - *Glycogen synthase kinase 3*

GUSB - *Glucuronidase Beta*

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HE - Hematoxilina-Eosina

HER2/neu - *Human Epidermal growth factor Receptor 2*

HPRT1 - *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1*

HRas - *Harvey rat sarcoma viral oncogene*

ID - Identificação

IGF - Fator de crescimento semelhante à insulina

IGF1 - Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IGF1R - Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina

IGF2 - Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2

IGF2R - *Insulin-like growth factor 2 receptor*

IGFBP - Proteínas ligadoras de IGF

IL-11 - Interleucina 11

IL-6 - Interleucina 6

IMC - Índice de massa corporal

INCA - Instituto Nacional de Câncer

IP3 - Inositol trifosfato

IPO8 - Importina 8

IR - Receptor da insulina

IRS - Substrato do receptor da insulina

JNKs - Quinases c-Jun-N-terminal

Ki-67 - *Antigen Ki67*

KRas - *Kirsten rat sarcoma viral oncogene*

LH - Hormônio luteinizante

MAPK - *Mitogen activated kinase-like protein*

MGB - *Minor groove binder*

MHL - *MutL* homolog 1

mRNA - RNA mensageiro

MRPL19 - *Mitochondrial ribosomal protein*

mTOR - *Mechanistic target of rapamycin*

NFAT5 - *Nuclear Factor of Activated T-Cells 5*

NFKB1 - *Nuclear Factor Kappa B Subunit 1*

NFKB2 - *Nuclear Factor Kappa B Subunit 2*

NFQ - *Nonfluorescent quencher*

NFκB - *Nuclear factor kappa B*

NRas - *Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene*

OMS - *Organização Mundial da Saúde*

P16 - *Tumor suppressor protein 16*

p53 - *Phosphoprotein p53*

PCR - *Reação em cadeia da polimerase*

PDK1 - *Phosphoinositide-dependent kinase-1*

PGK1 - *Phosphoglycerate kinase 1*

PI3K - *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*

PIK3CA - *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*

PIK3R1 - *Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha*

PIP₃ - *Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*

PPIA - *Peptidylprolyl isomerase A*

PPP3CA - *Protein Phosphatase 3 Catalytic Subunit Alpha*

PPP3R1 - *Protein Phosphatase 3 Regulatory Subunit B, Alpha*

PR - *Receptor da progesterona*

PRKCI - *Protein Kinase C Iota*

PRKCZ - *Protein Kinase C Zeta*

PRL - *Prolactina*

PTEN - *Phosphatase and tensin homolog*

PUM1 - *Pumilio RNA binding family member 1*

RAF1 - *Raf-1 Proto-Oncogene*

Ras - *Rat sarcoma virus oncogene*

RNA - Ácido ribonucleico

RPS6 - *Ribosomal Protein S6*

RPS6KB1 - *Ribosomal Protein S6 Kinase B1*

RTKs - Receptores tirosina quinase

RT-qPCR - RCR quantitativa a partir da transcrição reversa

SBEM - Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia

Ser/Thr - Serina/treonina

SHBG - Globulina ligadora de hormônios sexuais

SHC - *Shc-transforming protein*

SLC2A4 - *Solute Carrier Family 2 Member 4*

SOP - Síndrome de Ovários Policísticos

SPSS - *Statistical Package for the Social Sciences*

TCGA - *The Cancer Genome Atlas*

TCR - Receptores de células T

TGF- β R2 - *Transforming Growth Factor Beta Receptor 2*

TNF- α - fator de necrose tumoral

TNM - (T) tumor, (N) localização - do inglês *lynph nodes* e (M) metástases

TP53 - *Tumor protein p53*

TRH - Terapia de Reposição Hormonal

tRNA - RNA transportador

UBC - Ubiquitina C

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo menstrual e morfologia do endométrio durante cada fase.....	20
Figura 2. Estimativa da incidência dos cânceres mais frequentes na população brasileira no ano 2016.....	22
Figura 3. Histologia do adenocarcinoma endometriode e do carcinoma seroso	24
Figura 4. Representação do estadiamento FIGO (2009) do carcinoma endometrial ..	26
Figura 5. Importantes rotas hormonais relacionadas ao desenvolvimento do câncer. .	35
Figura 6. Rota de sinalização do IGF1R.....	37
Figura 7. Layout da placa <i>TaqMan® Array Human IGF1R Signaling 96-well</i> utilizada na análise dos genes envolvidos na via de sinalização do IGF1R.....	48
Figura 8. Lâminas de HE em aumento 400x de duas das amostras estudadas.....	68
Figura 9. Distribuição dos genes de acordo com a função.....	69
Figura 10. Resultado da expressão gênica apresentados em RQlog2.....	77
Figura 11: Imagens de imunohistoquímica para IGF1, p-IGF1R β e IR	80
Figura 12. Rede de interações proteína-proteína construída na plataforma <i>String</i>	82
Figura 13. Rede de interações proteína-proteína construída na plataforma <i>String</i> com destaque das proteínas envolvidas na via de sinalização do receptor da insulina e receptor do IGF1.	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sistema de estadiamento FIGO (2009) para o carcinoma endometrial	25
Tabela 2. Alterações moleculares no câncer de endométrio..	39
Tabela 3. Descrição dos genes avaliados no ensaio.	49
Tabela 4. Característica das amostras estudadas.	67
Tabela 5. Valores de estabilidade de genes candidatos a normalizadores obtidos pelo <i>software</i> NormFinder.	70
Tabela 6. Genes com expressão somente no grupo câncer de endométrio.	71
Tabela 7. Genes diferencialmente expressos no câncer endometrial em relação ao controle.	73
Tabela 8. Genes que não apresentaram expressão em nenhum dos grupos	76
Tabela 9. Genes em que não foi possível realizar a análise estatística.	76
Tabela 10. Relação da intensidade da marcação nos grupos controle e caso, e porcentagem de células epiteliais positivas para cada anticorpo.	79

INTRODUÇÃO

1. Endométrio

O endométrio é a camada mucosa que se situa mais internamente no útero, considerado um tecido dinâmico por responder a diferentes ambientes endócrinos. Este tecido segue mais de 400 ciclos de regeneração, diferenciação e descamação enquanto a mulher se encontra em período reprodutivo, em que a sua espessura varia conforme a idade e fase do ciclo menstrual (Mclennan e Rydell, 1965; Jabbour *et al.*, 2006; Gargett *et al.*, 2008) (Figura 1).

O endométrio humano cresce, em média, cerca de 7 mm em cada ciclo menstrual. O tecido é dividido em duas zonas principais: camada funcional - localizada na porção luminal, é transitória, constituída por glândulas desde o epitélio até o estroma; e camada basal: localizada perto do miométrio, envolve a base das glândulas e vasos no estroma. A camada superior funcional é perdida durante a menstruação e é regenerada posteriormente, a partir da camada basal (Padykula, 1991; Okulicz *et al.*, 1997; Sabine *et al.*, 2008; Verdi *et al.*, 2014).

O endométrio é responsável pelo evento complexo e essencial para a gestação, denominado de implantação. Para ocorrer a implantação, é necessária a proliferação e diferenciação das células estromais, viabilizada pela exposição ao estrogênio e à progesterona (Jabbour *et al.*, 2006). O período de preparação para recepção do blastocisto é denominado de janela de implantação e dura em torno de dois dias, possivelmente entre os dias 19 e 21 do ciclo menstrual. Foi constatado o desenvolvimento de protusões na superfície do epitélio endometrial, mudanças no padrão secretor e expressão de biomarcadores modificada na superfície celular durante a janela de implantação (Nikas, 1999; Sarani *et al.*, 1999; Lessey, 2000; Cavagna e Mantese, 2003; Bartosch *et al.*, 2011; Salker *et al.*, 2017).

A regulação do ciclo menstrual inicia-se com a liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), responsável pela secreção do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) na glândula pituitária anterior, parte da família de hormônios glicoproteicos. O FSH e LH estimulam a produção dos hormônios esteroides

sexuais, estrogênio e progesterona, nos ovários. O eixo de secreção dos hormônios esteroides é regulado por fatores autócrinos, parácrinos e endócrinos, principalmente na glândula pituitária anterior (Ezcurra e Humaidan, 2014).

O endométrio apresenta duas fases distintas: a proliferativa entre a menstruação e a ovulação, caracterizada pelo aumento nos níveis de estrogênio; e a secretora, na qual, inicialmente, há predominância do estímulo da progesterona. Na fase secretora tardia há queda dos níveis hormonais, tanto de estrogênio como de progesterona, culminando na descamação do endométrio se não for estabelecida a gestação (Figura 1) (Hawkins e Matzuk, 2008). A secreção cíclica de hormônios provoca mudanças histológicas, principalmente sobre a morfologia e secreção glandular. Assim, este tecido sofre, periodicamente, uma processo fisiológico de “lesão” seguida de reparo tecidual (Jabbour *et al.*, 2006).

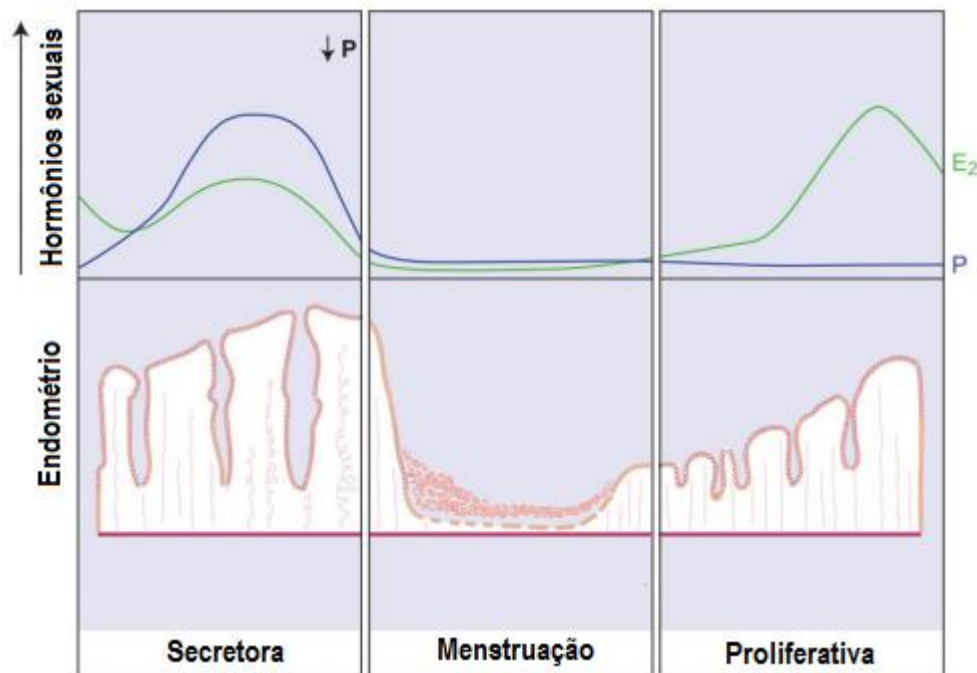


Figura 1: Ciclo menstrual e morfologia do endométrio durante cada fase. (E₂) estradiol e (P) progesterona. Adaptado de Maybin e Critchley, 2015 (Maybin e Critchley, 2015).

A comunicação entre células epiteliais e estromais do endométrio através de hormônios e fatores de crescimento é necessária para o funcionamento adequado do endométrio. Essa comunicação permite a coordenação, rearranjo e produção de matriz extracelular a cada ciclo, mostrando um padrão de expressão de moléculas e receptores hormonais específicos em cada fase (Hopfer *et al.*, 1994; Kamelle *et al.*, 2002; Valdez *et al.*, 2017). Após a proliferação estimulada por estrogênios, as células estromais endometriais semelhantes a fibroblastos são induzidas a diferenciar-se em células decíduais por estímulo da progesterona. As principais proteínas secretadas pelas células estromais endometriais decidualizadas são a prolactina (PRL) e o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1) (Maruyama e Yoshimura, 2008).

Alterações na estrutura e funções endometriais podem se desenvolver no endométrio quando ele é submetido a ambientes endócrinos com padrões diferentes. Reações das células endometriais podem culminar em padrões de proliferação patológicos, como a endometriose, adenomiose, formação de pólipos, hiperplasia e neoplasias (Deligdisch, 2000; Campagnoli *et al.*, 2013). As neoplasias endometriais, ou carcinomas endometriais, estão dentro da classificação de tumores do corpo do útero, juntamente com o sarcoma uterino (origem no miométrio) e correspondem a 90% dos cânceres originados nesta porção do órgão (American Cancer Society).

2. Caracterização do Câncer de Endométrio

O carcinoma endometrial é uma neoplasia maligna proveniente da porção epitelial do endométrio (Vitale *et al.*, 2016). Ele apresenta uma vasta heterogeneidade, não só referente à sua morfologia, mas também às suas alterações moleculares, perfil de resposta a hormônios e desfecho clínico (Hanley *et al.*, 2017).

Neoplasias do corpo uterino têm aumentado a sua incidência na população mundial, tratando-se da 4ª neoplasia feminina mais comum nos países desenvolvidos (Arima *et al.*, 2017). Nos Estados Unidos, foi estimado o aparecimento de cerca de 61.380 novos casos de câncer do corpo uterino em 2017, com mortalidade de 17,8%. De 2004 a 2013, a incidência do carcinoma endometrial aumentou 1% ao ano em

mulheres caucasianas e 3% ao ano em mulheres negras (*American Cancer Society*, 2017).

No que se refere ao Brasil, estima-se que o câncer de endométrio ocupe a sexta posição nos tipos de câncer mais frequentes em mulheres no quadro geral, e segunda posição quando se aponta neoplasias ginecológicas (Figura 2). Para o ano de 2016, foram estimados 6.950 novos casos da doença e, quando discriminado por regiões, a região sudeste apresentou maior incidência de câncer de endométrio (9,58 casos a cada 100 mil mulheres), enquanto a região sul apresentou a menor incidência do país (5,21 casos a cada 100 mil mulheres) (Inca, 2016).

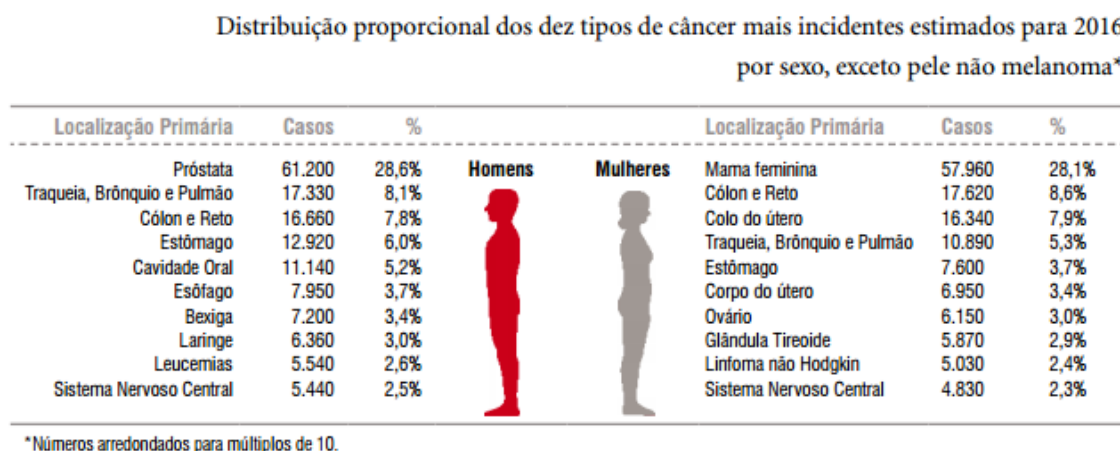


Figura 2. Estimativa da incidência dos cânceres mais frequentes na população brasileira no ano 2016 (Inca, 2016).

A lesão predominantemente precursora do câncer de endométrio é a hiperplasia endometrial atípica, que representa uma das formas de proliferação anormal (Moore e Brewer, 2017). A hiperplasia endometrial pode se apresentar como sendo simples, com núcleos normais, ou atípica, com anomalias citológicas e na arquitetura celular. Ainda, geralmente tem extensão difusa, mas pode ser focal ou multicêntrica (Pontes *et al.*, 2000). Essas lesões constituem potenciais carcinomas, com aproximadamente 50% de

risco de evoluir a este estágio, e são caracterizadas pelo aumento da relação glândula/estroma (Moore e Brewer, 2017).

Classicamente, o câncer de endométrio é dividido em dois tipos, referidos como tipo I e tipo II. Esse sistema de classificação, utilizado desde 1980 até recentemente, atendia tanto às características clínicas, como demográficas e endócrinas dos tumores. De outro modo, a classificação inserida pela Organização Mundial da Saúde (OMS), divide os tumores em endometrioides, com subclassificações baseadas nas diferenciações celulares predominantemente encontradas no tumor, e não-endometrioides, da qual fazem parte o carcinoma seroso e de células claras. O termo 'endometriode' remete às características das glândulas endometriais na fase proliferativa normal, e este tumor pode incluir padrão morfológico acinar, papilar ou parcialmente sólido (Kurman *et al.*, 2014; Hanley *et al.*, 2017) (Figura 3). Esta nova classificação leva em consideração apenas as características morfológicas do tumor. Todavia, o tipo I corresponde ao câncer endometriode e o tipo II corresponde a carcinomas não-endometrioides.

Em relação às características dos dois grupos principais, o câncer de endométrio tipo I (principalmente o adenocarcinoma) corresponde a cerca de 80% dos casos de câncer de endométrio, é estrogênio-dependente e está relacionado ao aumento das taxas de obesidade na população, assim como com a diabetes mellitus e hipertensão. É diagnosticados em estágios iniciais, e como consequência, geralmente apresenta melhor prognóstico. O câncer de endométrio do tipo II é independente de hormônios, mais agressivo e dá origem a metástases em estágios iniciais, acarretando um prognóstico menos favorável (Colombo *et al.*, 2011; Murali *et al.*, 2014; Oplawski *et al.*, 2017). Existem tipos de tumores endometriais mais raros, como o carcinoma endometriode com diferenciação escamosa, o carcinoma viloglandular, o adenocarcinoma mucinoso, adenocarcinoma neuroendócrino, sarcoma, entre outros (Wiseman, 2008; Vitale *et al.*, 2016).

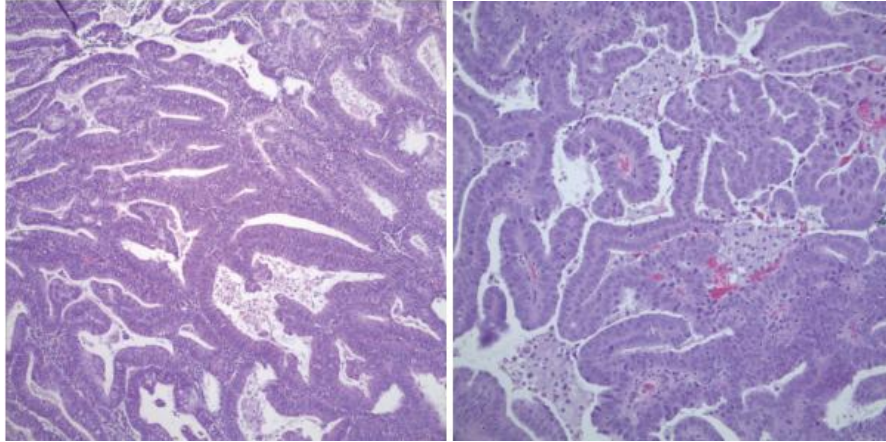


Figura 3. Histologia do adenocarcinoma endometriode (direita) e do carcinoma seroso (esquerda). Coloração com Hematoxilina-Eosina em aumento de 400x. Adaptado de Sorosky, 2012 (Sorosky, 2012).

O sistema amplamente utilizado para estadiamento é o FIGO, da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia, elaborado em 2009, e o TNM, da *American Joint Committee on Cancer (Ajcc, 2016)*. Para subdividir o carcinoma endometrial de acordo com a diferenciação nuclear, o FIGO leva em consideração o estadiamento cirúrgico e patológico (Tabela 1 e Figura 4) (Valejo e Tiezzi, 2009). Neste mesmo sentido, o TNM se baseia no tamanho do tumor primário, na disseminação para linfonodos regionais e na ausência/presença de metástases (Society, 2017). A classificação do grau de diferenciação histológica (G) do tumor segue as normas da OMS, que divide-as em bem diferenciados (G1), moderadamente diferenciados (G2) e indiferenciados (G3), mas esta subclassificação não é tão importante quanto o FIGO e o TNM para avaliação da sobrevida das pacientes (Opławski *et al.*, 2017).

Entre os fatores de risco para o câncer de endométrio, encontram-se envolvidos fatores genéticos, nuliparidade, menopausa tardia, e o uso de terapias de reposição hormonal (TRH) após a menopausa (Arima *et al.*, 2017; Kotowicz *et al.*, 2017). Têm sido implicados, também, o ganho de gordura corporal e a ingestão de ácido graxos, causando o aumento dos níveis de estrogênio circulante, no desenvolvimento do câncer endometrial (Parazzini *et al.*, 1991; Kuribayashi *et al.*, 2017). Além disso, a ausência da prática de exercícios físicos e o estilo de vida contemporâneo resultam no

aumento dos casos de obesidade, diabetes, hiperinsulinemia e demais desordens metabólicas que, em associação com outros fatores de risco, contribuem para a crescente incidência deste carcinoma, principalmente em países desenvolvidos e áreas de grande população urbana (Lustosa *et al.*, 2014; Webb, 2015; Kerr *et al.*, 2017).

Tabela 1. Sistema de estadiamento FIGO (2009) para o carcinoma endometrial (Freeman *et al.*, 2012).

Estágio	Definição
I	IA Tumor limitado ao endométrio
	IB Invasão maior que 50% do miométrio
	IC Invasão menor que 50% do miométrio
II	IIA Invasão da endocérvix
	IIB Invasão estromal cervical
III	IIIA Invasão da serosa ou anexos; citologia peritoneal positiva
	IIIB Invasão da vagina
	IIIC Linfadenectomia pélvica e/ou paraórtica
IV	IVA Invasão da bexiga ou mucosa retal
	IVB Metástases à distância

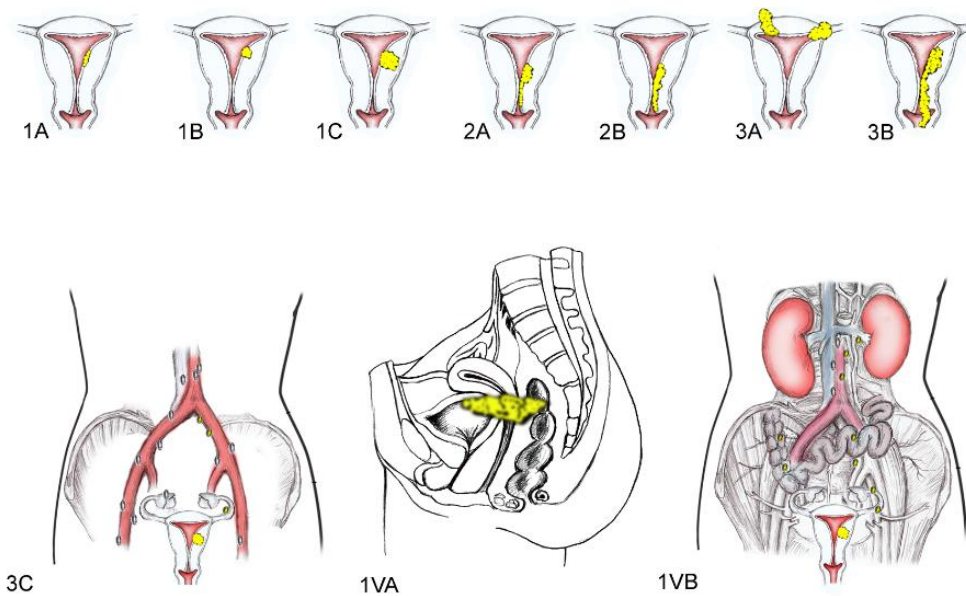


Figura 4. Representação do estadiamento FIGO (2009) do carcinoma endometrial (Outlines, 2011).

Convencionalmente, o câncer endometrial é atribuído ao período pós-menopausa, visto que aproximadamente 80-90% dos casos ocorrem em mulheres acima dos 50 anos e 2-14% em mulheres consideradas jovens, com idade menor que 40 anos (Sorosky, 2008; 2012). A fim de prevenir a osteoporose, doenças cardiovasculares, demência e diversos outros sintomas da pós-menopausa, várias mulheres recorrem à terapia de reposição hormonal (TRH) (Marjoribanks *et al.*, 2017). Porém, ainda que os mecanismos envolvidos na evolução do carcinoma endometrial não estejam totalmente esclarecidos, é sugerido que o tratamento crônico com estrogênio exógeno, sem oposição por progestágenos, aumenta consideravelmente o risco de incidência do câncer de endométrio (Grady *et al.*, 1995; Wan *et al.*, 2017).

A incidência do câncer de endométrio em mulheres na idade pré-menopausa tem aumentando nos últimos anos, devido ao aumento, também, dos casos de obesidade na população, que é um dos fatores de risco consolidados no desenvolvimento do câncer (Moore e Brewer, 2017). Carcinomas não-diferenciados ou pouco diferenciados são mais frequentes em mulheres mais jovens, geralmente

relacionados à Síndrome de Lynch e com baixa expressão de marcadores epiteliais e estromais. Tumores com porções indiferenciadas, mesmo que pequenas, apresentam comportamento mais agressivo (Tafe *et al.*, 2010; Hanley *et al.*, 2017). Os fatores genéticos são responsáveis por 10% dos casos de câncer de endométrio e incluem o histórico familiar e a Síndrome de Lynch, que contribuem igualmente para esta estatística (Sorosky, 2012; Hussein e Soslow, 2018). A Síndrome de Lynch se refere à condição em que há herança de predisposição genética para o desenvolvimento do câncer, muitas vezes de forma precoce e múltipla. Mulheres com esta síndrome apresentam 60% de risco de desenvolver o câncer de endométrio. Ela é causada pela deficiência nos genes de reparo do DNA, que confere predisposição ao câncer colorretal, de estômago, pâncreas, ovários, entre outros (Aarnio *et al.*, 1999; Hampel *et al.*, 2005; Lancaster *et al.*, 2015; Cosgrove *et al.*, 2017). Já foi demonstrada associação positiva entre a infertilidade e o carcinoma endometrial. Há aumento do risco de mulheres inférteis com menos de 40 anos desenvolverem a neoplasia quando sofrem quadros de anovulação crônica, ciclos irregulares e oligomenorreia (Kuribayashi *et al.*, 2017). Pacientes que desejam preservar a fertilidade recorrem aos tratamentos alternativos, como radioterapia primária.

O diagnóstico do câncer de endométrio decorre da observação dos sintomas mais comuns: o sangramento uterino anormal pode estar presente em aproximadamente 90% das pacientes (Huang *et al.*, 2017). O principal indicador de prognóstico é a observação de metástases em linfonodos regionais, cérvix e outras partes do útero, e metástases à distância. Outros fatores, como a invasão miometrial, o grau de diferenciação nuclear e o tipo histológico, também são importantes para o prognóstico (Rose, 1996; Valejo e Tiezzi, 2009; Mccluggage, 2018). O carcinoma endometrial é diagnosticado em estágios iniciais em 75% dos casos, correspondentes aos estágios I e II do sistema FIGO, com prognóstico indicado como favorável. Em geral, a sobrevida global por 5 anos ou mais de pacientes diagnosticadas em estágios iniciais da doença mantém-se em torno de 80-90% após a cirurgia. Em contrapartida, pacientes em estágio III e IV têm sobrevida global por 5 anos ou mais em, respectivamente, 60% e 25%, com piora do prognóstico se existirem metástases à distância. Também a idade e a presença das comorbidades que geralmente

acompanham o desenvolvimento do câncer de endométrio têm papéis importantes no prognóstico (Morice *et al.*, 2016).

O tratamento cirúrgico no estágio I se baseia na histerectomia abdominal total e remoção das tubas uterinas e ovários, com dissecação bilateral de linfonodos pélvicos e para-aórticos por laparoscopia ou cirurgia assistida por robô (Fagotti *et al.*, 2013; Chiantera *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2017). A cirurgia pode ser acompanhada, ou não, de quimioterapia ou radioterapia nos estágios iniciais. No entanto, quando o tumor é mais agressivo e metastático, é recomendada quimioterapia citotóxica e terapia hormonal se o tumor for positivo para receptor de estrogênio (ER) ou receptor de progesterona (PR) (Colombo *et al.*, 2011; Amadio *et al.*, 2014; Battista e Schmidt, 2016). A linfadenectomia é utilizada para estadiamento cirúrgico e abrange a avaliação de presença de nódulos, avaliação de linfonodos pélvicos e para-aórticos, de vasos renais e mapeamento do linfonodo sentinela para diminuir o risco de ocorrer doença metastática ou recorrente (Morice *et al.*, 2016). As drogas consideradas de primeira linha para tratamento do câncer de endométrio recorrente ou metastático são o paclitaxel e a carboplatina, por serem menos citotóxicas quando comparadas com outros quimioterápicos. Apesar de não haver um consenso sobre quais drogas devem ser utilizadas primeiramente em casos de tumor agressivo, são sugeridos a ciclofosfamida, o 5-fluorouracil, o topotecano e progestinas. Porém, estas abordagens não conferem controle da doença à longo prazo (Fleming, 2007; Pectasides *et al.*, 2007; Miller *et al.*, 2012; Amadio *et al.*, 2014).

Estrogênio e Progesterona

Tanto o estrogênio quanto a progesterona, agem em receptores nucleares específicos de alta afinidade e baixa capacidade. Dentre as suas ações, esses hormônios têm a capacidade de modificar a cromatina celular e ativar a transcrição gênica como fatores de transcrição, regulando a expressão de um grande número de genes na sua via clássica. Os produtos desta regulação podem, ainda, agir de forma autócrina, parácrina, endócrina ou *downstream* em outras vias, de forma a regular a

expressão de outros genes. Existem múltiplos receptores de estrogênio e progesterona (isoformas). Cada isoforma tem funções diferentes no genoma ao relacionarmos a expressão diferencial em cada tipo celular e o estado fisiológico (Young, 2013; Kreizman-Shefer *et al.*, 2014; Singhal *et al.*, 2018).

De maneira cíclica, o estrogênio e a progesterona (derivado do corpo lúteo após a ovulação) promovem o crescimento do epitélio glandular no endométrio. O estrogênio é mitogênico durante a fase proliferativa do ciclo menstrual e a progesterona, na fase secretora, suprime a função do estrogênio e promove a diferenciação celular. *In vivo*, se encontram três estrógenos principais: a estrona, o estradiol e o estriol (subproduto da estrona) (Wright *et al.*, 1999; Baker, 2013; Lundström *et al.*, 2015).

O ER parece estar significativamente mais expresso no endométrio humano e ele está geralmente superexpresso, por exemplo, na endometriose e na hiperplasia endometrial. Um estudo feito por J. Mark Elwood, em 1981, questionou o papel do estímulo estrogênico no desenvolvimento de tumores uterinos, assim como o papel dos medicamentos contendo estrogênio no prognóstico de pacientes com câncer de endométrio. A revisão analisou estudos que, na época, relacionavam o metabolismo do estrogênio endógeno, quando modificado, ao desenvolvimento da neoplasia (Siiteri, 1978), que relacionavam o uso de estrogênio exógeno ao risco de desenvolver o tumor (Smith *et al.*, 1975; Ziel e Finkle, 1975)(Elwood, 1981). Nessa época estudos levantaram a hipótese do estrogênio agir como promotor do crescimento tumoral, e não como iniciador. Surgiram questões quanto à possibilidade do hormônio provocar o sangramento uterino na pós-menopausa, o que levaria à investigação e diagnóstico da lesão (Hulka *et al.*, 1980; Shapiro *et al.*, 1980). Outros abordaram a premissa de que a lesão encontrada em pacientes com sangramento uterino, após o uso de drogas estrogênicas, fosse apenas uma atipia benigna ou uma desordem proliferativa, e não necessariamente câncer (Mack, 1976; Ziel e Finkle, 1976).

Após os resultados iniciais e o sucesso de programas de terapia hormonal para o câncer de próstata e câncer de mama, e reconhecimento da relação causal entre hormônios e o câncer de endométrio, pesquisadores tentaram abordar a oposição por progestágenos no tratamento do carcinoma endometrial (Nathanson e Kelley, 1952;

Baker e Govan, 1953; Oberhelman, 1959; Baker *et al.*, 1960). Em 1963, B. J. Kennedy publicou um estudo em que, sabendo dos efeitos fisiológicos da progesterona no endométrio humano e da sensibilidade deste tecido a estímulos hormonais, testou a administração de caproato de hidroxiprogesterona em pacientes com diagnóstico de carcinoma endometrial em estado avançado por três meses ou até ao óbito. Os resultados mostraram regressão do tumor em 29,6% das pacientes, enquanto as pacientes restantes tiveram tumor progressivo, mas sem aceleração (Kennedy, 1963). Kistner, em 1965, sugeriu que uma das etiologias do câncer de endométrio seria a exposição prolongada ao estrogênio endógeno sem a oposição cíclica da progesterona. Ele dissertou sobre a possibilidade deste quadro em mulheres jovens, em idade reprodutiva, mas sofrendo anovulação prolongada ou sangramento uterino disfuncional (Kistner *et al.*, 1965). Atualmente, ainda é indicado o uso de terapia hormonal para o tratamento do câncer endometrial avançado em pacientes com tumor positivo para ER ou receptor de progesterona (PR). Alguns agentes utilizados são progestinas, inibidores da aromatase e moduladores específicos do ER (Kokka *et al.*, 2010; Ethier *et al.*, 2017).

A TRH é utilizada para controlar os sintomas da menopausa, assim como para prevenir ou aliviar doenças crônicas relacionadas ao avanço da idade, como a osteoporose e a demência (Stuenkel e Barrett-Connor, 1999). Este é o tratamento mais efetivo para os sintomas da menopausa e, embora foram feitas análises e estudos quanto à sua segurança alguns anos antes da aprovação para uso clínico, foram demonstradas variações relacionadas à idade das mulheres, o tempo de iniciação do tratamento, a formulação e a via de administração (Pickar *et al.*, 2017). Uma das questões relacionadas à TRH é o aumento do risco de desenvolvimento do câncer de endométrio pela exposição ao estrogênio. Assim, um dos cuidados a ter ao administrar a TRH (em mulheres que ainda possuem útero) é indicar o uso de progesterona concomitantemente para prevenir o estímulo excessivo do endométrio (Ethier *et al.*, 2017).

2.1. O papel da Diabetes e da Hiperinsulinemia

A diabetes mellitus é uma doença metabólica, caracterizada por níveis altos de glicose no sangue. Considerada uma epidemia crescente, ela tem se tornado um problema de saúde pública que, em 2016, atingia 387 milhões de pessoas no mundo, principalmente em países em desenvolvimento, em que a diabetes está entre a quarta e oitava posição entre as causas de mortes (Federation, 2015). No Brasil, em 2014, estimou-se cerca de 11,9 milhões de pessoas diabéticas entre 20 e 79 anos, sendo que a prevalência é maior em mulheres. Segundo a OMS, cerca de 72 mil pessoas morrem no país anualmente devido a esta doença. A alta incidência de diabetes está atribuída ao aumento da expectativa média de vida, mudanças no estilo de vida (principalmente no padrão de ingestão alimentar) e também ao avanço da medicina moderna no diagnóstico da doença (Lei *et al.*, 2011; Liao *et al.*, 2014). Já é estabelecida a relação causal entre a diabetes e doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, como infarto do miocárdio, retinopatia, doença renal, acidente vascular cerebral e neuropatia, complicações crônicas que geralmente são a causa de morte dos pacientes (Sociedade Brasileira de Diabetes).

Vários estudos indicaram associação entre o aumento da incidência de diversos cânceres, nomeadamente câncer de cólon, pâncreas, fígado, reto e mama, com a diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) (Ben *et al.*, 2011; Liao *et al.*, 2014; Schrijnders *et al.*, 2018). Existem evidências consistentes que demonstram que mulheres diabéticas apresentam o dobro do risco de desenvolverem o câncer de endométrio, assim como a mortalidade aumenta diante desta comorbidade (Friberg *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2012; Wallbillich *et al.*, 2017). Esta relação é explicada pela resistência à insulina, hiperinsulinemia, hiperglicemia, aumento da disponibilidade de hormônios esteroides, inflamação e pelos altos níveis de IGF1, que, direta e indiretamente, são responsáveis pelo aumento da proliferação celular, promovendo a carcinogênese (Bowker *et al.*, 2010; Perez-Lopez *et al.*, 2017).

A hiperinsulinemia, desencadeada pela resistência à insulina, refere-se ao aumento dos níveis de insulina circulantes e à baixa eficiência do hormônio em regular a glicemia (Marín-Juez *et al.*, 2014). Esta condição está associada à Síndrome

Metabólica, juntamente com a obesidade central, dislipidemia e hipertensão sistêmica. Síndrome metabólica entende-se pelo conjunto de fatores de risco para doenças cardiovasculares e DM2. A resistência à insulina, principalmente quando acompanhada de sobrepeso e aumento de estrogênio sérico, está relacionada ao aumento do risco de desenvolver o câncer endometrial (Arcidiacono *et al.*, 2012; Mu *et al.*, 2012; Hernandez *et al.*, 2015; Kitson *et al.*, 2017).

O receptor da insulina (IR) consiste de duas subunidades α (extracelulares) idênticas, de 130 kDa, contendo os domínios de ligação da insulina; e duas subunidades β (transmembranares) de 95 kDa, que contém os domínios com atividade tirosina quinase (Mckern *et al.*, 2006). Quando a insulina se liga ao seu receptor, ele o ativa através da autofosforilação, que desencadeia a ativação de várias moléculas intracelulares, como por exemplo o substrato do receptor da insulina (IRS) e o *SHC-transforming protein* (Shc), que por sua vez vão gerar uma resposta biológica (Ullrich *et al.*, 1985; White e Kahn, 1994; Samani *et al.*, 2007; Arcidiacono *et al.*, 2012). O IR possui duas isoformas (IR-A e IR-B) que partilham propriedades biológicas e funcionais. O IR-A, que apresenta maior afinidade pelo fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2 (IGF2), com efeitos apoptóticos e mitogênicos. O IR-A está geralmente superexpresso em múltiplos cânceres; e o IR-B regula a entrada de glicose na célula e o metabolismo celular (Eritja *et al.*, 2017).

A insulina é considerada como um mitogênico e antiapoptótico, além de agir aumentando a secreção de IGF e diminuindo os níveis das proteínas ligadoras de IGF (IGFBP) (Nieman *et al.*, 2013). É descrito que as ações proliferativas da insulina sejam através da via do PI3K (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*), Akt (*AKT Serine/Threonine Kinase*) e mTOR (*mechanistic target of rapamycin*), que medeiam efeitos metabólicos e de sobrevivência celular (Shao *et al.*, 2014). Ainda, em 1991, Nestler e colaboradores demonstraram que a hiperinsulinemia reduz diretamente os níveis séricos da globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG), que modula a atividade biológica de estrógenos, aumentando a sua biodisponibilidade (Nestler *et al.*, 1991; Nestler, 2008). Devido à complexidade das respostas da sinalização do IR,

anormalidades na sua expressão ou função favorecem o aparecimento de desordens metabólicas graves ou transformações neoplásicas (Singh *et al.*, 2014).

2.2. Obesidade como fator de risco

A obesidade é um distúrbio que envolve alterações metabólicas e excesso de gordura corporal resultante da ingestão calórica superior à quantidade energética necessária, sendo caracterizada de acordo com o índice de massa corporal (IMC) igual ou maior que 30 kg/m² (Eknoyan, 2008). No Brasil, existem cerca de 18 milhões de pessoas consideradas obesas e um total de 70 milhões de pessoas acima do peso (aproximadamente 34% da população) (Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia).

Um dos principais fatores de risco para o surgimento do câncer de endométrio é a hiperestimulação do tecido decorrente da exposição crônica a altos níveis circulantes de estrogênio sem a oposição pela progesterona (que exibe efeitos antiproliferativos). A obesidade e uma dieta hiperlipídica são os principais promotores deste quadro pela conversão periférica de androgênios a estrogênio no tecido adiposo (Júnior e Athanazio, 2007; Lépine *et al.*, 2010; Nieman *et al.*, 2013).

A obesidade é uma comorbidade em até 46% das pacientes com câncer de endométrio (Daley-Brown *et al.*, 2017). Lu e colaboradores demonstraram que mulheres com sobrepeso podem ter até o dobro de risco de desenvolver câncer de endométrio, enquanto mulheres obesas têm 4 vezes mais chances, quando comparadas com mulheres dentro do peso considerado normal (Lu *et al.*, 2011). Entre as mulheres, a obesidade é mais relacionada ao câncer de endométrio do que a qualquer outro tipo de câncer (Onstad *et al.*, 2016). O adenocarcinoma endometriode (tipo I) é o mais correlacionado à obesidade e, comparadas às pacientes com IMC normal, pacientes obesas tendem a ter pior prognóstico e maiores taxas de mortalidade (Von Gruenigen *et al.*, 2006; Onstad *et al.*, 2016).

O tecido adiposo é considerado um órgão endócrino ativo à medida que é capaz de aumentar o nível de hormônios esteroides e adipocitocinas, como a leptina, a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e diminuir os níveis de adiponectina (Figura 5). A evolução para doenças crônicas, em particular múltiplos cânceres, advém da resistência à insulina e inflamação em baixo grau. Esses efeitos metabólicos adversos ocorrem principalmente a nível da gordura visceral e já foram associados às vias de sinalização da insulina e do IGF1, aos esteroides sexuais e à inflamação em baixo grau (Nimptsch e Pischon, 2016).

2.3. Sinalização do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1R)

O receptor do IGF1 (IGF1R) é uma tirosina quinase transmembranar, ativado por ligantes, principalmente o IGF1, mas também pelo hormônio relacionado IGF2, com alta afinidade. Este receptor é constituído por duas subunidades α e duas subunidades β , sintetizados pelo mesmo mRNA precursor e ligados por pontes bissulfito. Ele é cerca de 84% similar ao IR (Ullrich *et al.*, 1986; Sciacca *et al.*, 2002; Zha e Lackner, 2010).

O IGF é produzido por diversos tipos celulares, mas principalmente por hepatócitos. Ele tem características tanto de hormônio quanto de fatores de crescimento, capaz de produzir respostas locais e sistêmicas (Blundell *et al.*, 1978; Sajid *et al.*, 2011; Djogue *et al.*, 2013).

A insulina e o IGF são homólogos em 40 a 80% e o sistema de sinalização insulina/IGF envolve principalmente 3 ligantes - IGF1, IGF2 e a insulina. Esses ligantes podem interagir com até 6 receptores - o IGF1R, o IR-A, o IR-B, receptores híbridos do IGF1R e IR-A, híbridos do IGF1R e IR-B e híbridos entre IR-A e IR-B. Ainda, existem 6 proteínas ligadoras ao IGF (IGFBP1-6) que modulam a biodisponibilidade do IGF. Esse sistema controla a mitogênese, diferenciação e sobrevivência em células normais e cancerígenas (Baxter, 1994; Hwa *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2014).

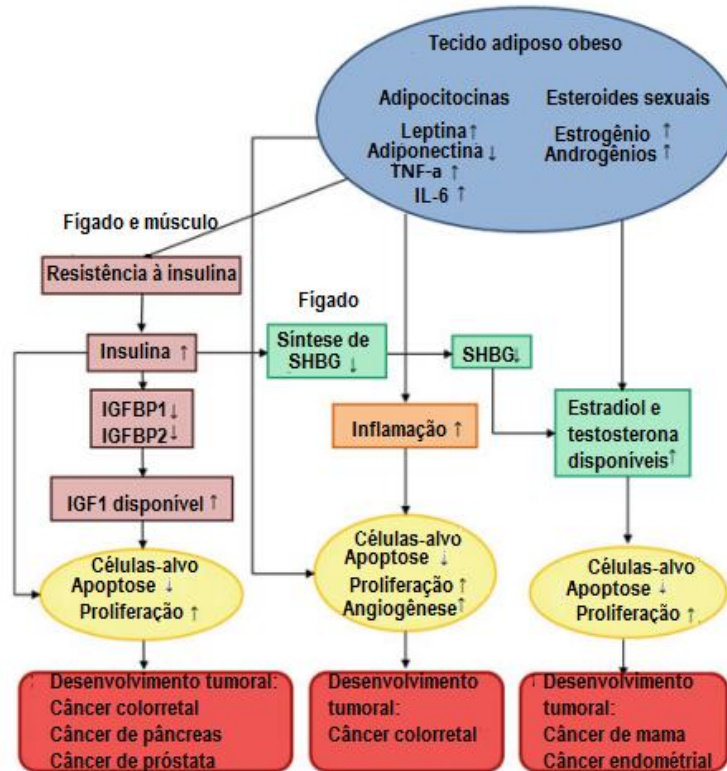


Figura 5. Importantes rotas hormonais relacionadas ao desenvolvimento do câncer. Adaptado de Nimptsch e Pischon, 2016 (Nimptsch e Pischon, 2016).

De maneira semelhante ao IR, o IGF1R é ativado por interação com os seus ligantes, quando se autofosforila e recruta moléculas adaptadoras como a IRS-1, IRS-2 e Shc. O IR-S1 se liga à subunidade regulatória da PI3K, estimulando sua atividade e aumentando os níveis de PIP₃ (*phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*). Isso leva ao recrutamento da Akt para a membrana, onde é fosforilada e ativada pela PDK1 (*Phosphoinositide-dependent kinase-1*) e pelo mTOR (Guertin e Sabatini, 2005; Zha e Lackner, 2010).

A ativação da Akt leva à fosforilação inibitória de fatores pró-apoptóticos como a BAD (*BCL2 associated agonist of cell death*) e a família de fatores de transcrição FOXO (*Forkhead box O*). A Akt também aumenta a expressão de proteínas anti-apoptóticas como a BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*), BCL-XL (*B-cell lymphoma-extra large*)

e NF κ B (*nuclear factor kappa B*). Esta via também regula a entrada de glicose na célula e o metabolismo da glicose através da GSK3 (*Glycogen synthase kinase 3*) e é importante para a síntese proteica e crescimento celular. Já a ativação da Shc estimula a via da Ras/MAPK e transdução de sinais mitogênicos através da ativação nuclear da ELK1 (*ETS transcription factor*) (Alvino *et al.*, 2011; Tzivion *et al.*, 2011; Djiogue *et al.*, 2013). A figura 6 representa algumas das vias *downstream* na rota de sinalização do IGF1R.

O IGF1R é amplamente expresso no endométrio normal e no câncer endometrial, no epitélio glandular e estroma. Tanto o receptor quanto o IGF1 têm regulação transcricional dada pelo estrogênio e estimulam a proliferação celular (Kleinman *et al.*, 1995). Embora sejam raras as alterações no DNA, tem-se observado que ocorre aumento dos níveis de IGF1R no câncer, inclusive o de endométrio. No adenocarcinoma foi constatada a superexpressão do IGF1R, aumento dos níveis de IGF1R fosforilado e da via da Akt quando comparado ao endométrio normal proliferativo (Mccampbell *et al.*, 2006; Pollak, 2012; Merritt *et al.*, 2016). Sendo proposto que esta via contribui para o risco de hiperplasia endometrial e desenvolvimento do câncer de endométrio (Dai *et al.*, 2016).

Contudo, considerando o importante papel de ambos os receptores - de insulina e de IGF1 - em diversos tipos de neoplasias malignas, essa via se tornou um dos alvos para estudos direcionados a desenvolver novas estratégias para tratamento do carcinoma endometrial (Weroha e Haluska, 2012; Aizen *et al.*, 2015).

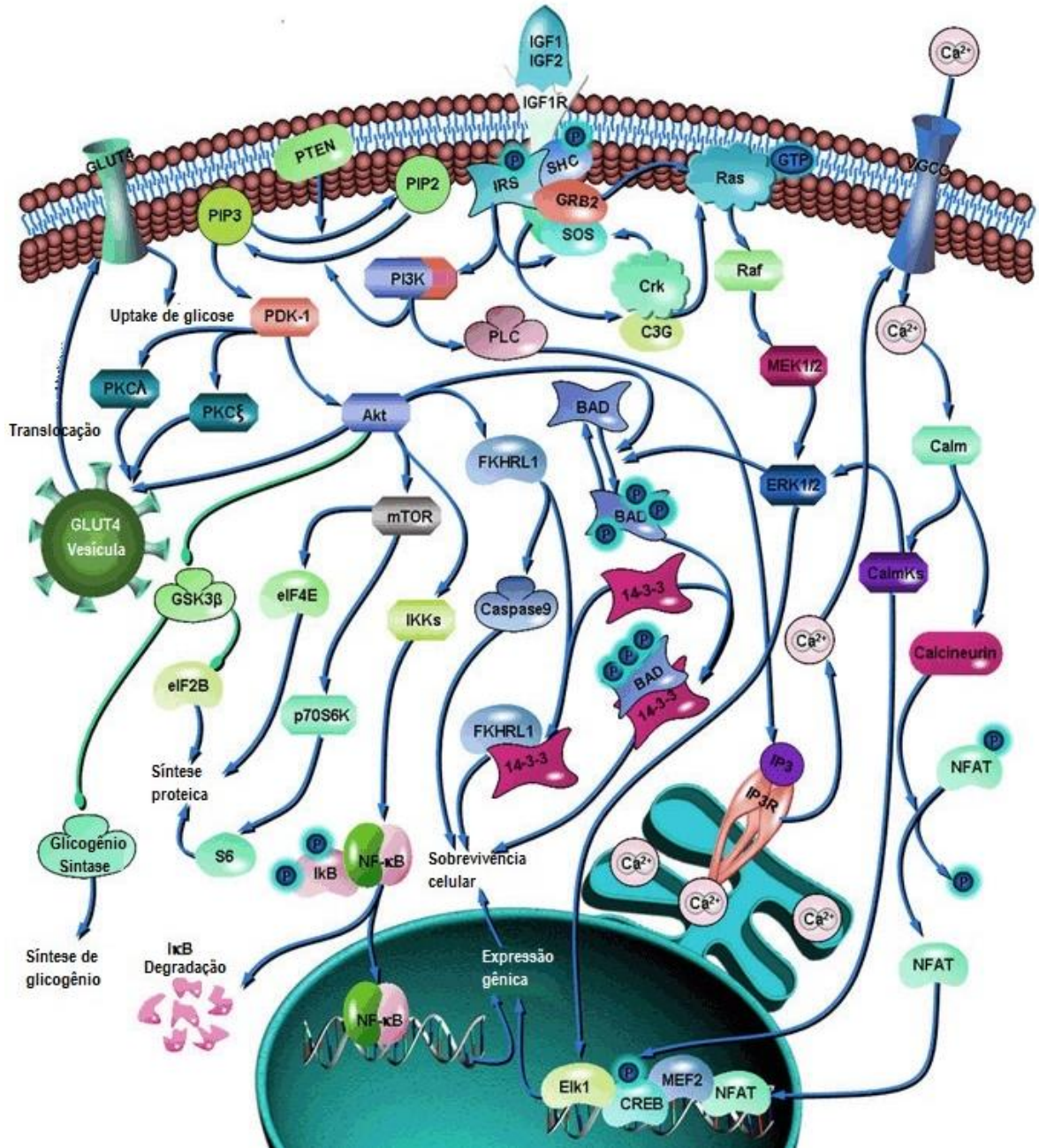


Figura 6. Rota de sinalização do IGF1R (Qiagen).

2.4. Alterações moleculares no carcinoma endometrial

O endométrio é controlado predominantemente por hormônios ovarianos, citocinas e quimiocinas ao longo do ciclo menstrual (Young, 2013). Por ser um tecido dinâmico e com diferentes perfis de expressão gênica em resposta aos mais diversos estímulos, torna-se desafiador estabelecer padrões de indicadores fisiológicos, patológicos ou de resposta a intervenções terapêuticas. Por sua vez, o câncer de endométrio é uma doença complexa e com etiologia variada que requer abordagens sistêmicas. Se tratando de câncer, cada tipo e subtipo tem suas particularidades que alternam de acordo com raça, etnia, idade e genética (histórico familiar)(Cho *et al.*, 2009).

Entretanto, sinalização estrogênica, erros no sistema de reparo dos danos ao DNA, anormalidades genéticas e padrões de metilação aberrantes são alguns dos fatores ambientais propostos como mecanismos carcinogênicos no câncer endometrial (Tao e Freudenheim, 2010; Banno *et al.*, 2014; Bharati *et al.*, 2014; Webb, 2015). Há evidências que sugerem padrões moleculares distintos no câncer de endométrio tipo I e tipo II, com tumores apresentando vias de sinalizações disfuncionais e aberrações genéticas diferentes (tabela 2) (Dedes *et al.*, 2011).

Uma das mutações mais apontadas no carcinoma endometrial do tipo I é a perda de função do *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*), um supressor tumoral frequentemente mutado em muitos cânceres. Por sua vez, no carcinoma do tipo II há prevalência de perda da E-caderina (responsável pela adesão célula-célula) e mutação da *p53* (*phosphoprotein p53*), importante na regulação do ciclo celular (Dedes *et al.*, 2011). Hecht e colaboradores demonstraram, em 2006, que existem polimorfismos (repetições em tandem) nos genes que codificam o *PTEN* no cromossomo 10, no *TGF-βR2* (*Transforming Growth Factor Beta Receptor 2*) e no *IGF2R* (*Insulin-like growth factor 2 receptor*), no gene *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) e no *BAX* (*bcl-2-like protein 4*) no carcinoma endometrial (Hecht e Mutter, 2006). Outro estudo, feito em 2001 por Halperin e colaboradores, utilizando a técnica de imunohistoquímica para fazer a comparação da expressão do ER, PR, BCL-2, *p53*, HER2/neu (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*) e Ki-67 (*antigen Ki67*) em

amostras de câncer de endométrio (tipo I moderadamente e bem diferenciados; tipo I com baixo grau de diferenciação; e tipo II seroso e papilar) demonstrou diferente padrão de expressão nesses marcadores de acordo com o grau das amostras. No primeiro grupo (tipo I moderadamente e bem diferenciados) foi observado aumento da expressão do ER (85,7 %), PR (78,6 %) e BCL-2 (42,8 %) Entretanto, foi observado baixa expressão do *p53* e do HER2/neu (14,3 % em ambos). No grupo 3 (seroso e papilar), a expressão do ER, PR e BCL-2 foi baixa, enquanto foi observado alta imunorreatividade do *p53* (81,8 %) e HER2/neu (45,4 %). O grupo constituído por casos do tipo I pouco diferenciados, apresentou um perfil intermediário de imunorreatividade das proteínas estudadas, além disso, nenhum dos grupos apresentou expressão significativa do Ki-67 (Halperin *et al.*, 2001).

Grande parte dos carcinomas endometrioides é considerada estável a nível cromossômico, com genomas diploides. Entretanto, a nível molecular, são encontradas modificações genéticas de alta frequência na *PIK3CA* (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*) e na *PIK3R1* (*Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha*), que agem na rota de sinalização da PI3K (O'hara e Bell, 2012; Le Gallo e Bell, 2014). Ainda, existem evidências epidemiológicas de que ocorrem mutações nos genes *BRCA1/BRCA2* no carcinoma endometrial, mas elas foram atribuídas ao uso do tamoxifeno (antagonista do ER recomendado para tratamento do câncer de mama) e não à susceptibilidade genética (Segev *et al.*, 2013).

Tabela 2. Alterações moleculares no câncer de endométrio. Adaptado de Dedes *et al.*, 2011 (Dedes *et al.*, 2011).

Alterações	Tipo I (%)	Tipo II (%)
PIK3CA _ mutação	30	20
PIK3CA _ amplificação	2-14	46
KRas _ mutação	11-26	2
Akt _ mutação	3	0

PTEN _ perda de função	83	5
Instabilidade de microssatélites	20-45	0-5
Acumulação nuclear de β -Catenina	18-47	0
Perda de E-caderina	5-50	62-87
TP53 _ mutação	20	90
p16 _ perda de função	8	45
HER2 _ superexpressão	3-10	32
HER2 _ amplificação	1	17
FGFR2 _ mutação	12-16	1

Vários parâmetros clínicos e fisiopatológicos têm sido alvo de avaliação como possíveis fatores prognósticos e como indicadores de tratamento para o câncer endometrial. Estes incluem o tipo histológico, grau de diferenciação, estadiamento cirúrgico, invasão miometrial, cervical e em linfonodos e vasculatura, e citologia peritoneal. Outros parâmetros também são avaliados, como a expressão de *p53*, perda de p16 nuclear, PR e perda de função do *PTEN*. Todavia, esses parâmetros parecem ser influenciáveis subjetivamente e não apresentam resultados reproduzíveis (Cho *et al.*, 2009).

JUSTIFICATIVA

O câncer de endométrio tem se tornado cada vez mais incidente a nível mundial, se posicionando como o sexto câncer mais prevalente em mulheres. Nas últimas décadas, o número de casos de câncer de endométrio dobrou nos países desenvolvidos, devido ao aumento crescente da incidência da obesidade e também ao aumento da expectativa de vida. Ainda que haja mais casos em países desenvolvidos, existe um aumento das taxas de mortalidade nos países ainda em desenvolvimento devido a esta doença. O câncer de endométrio ocorre principalmente em mulheres no período peri e pós-menopausa e um dos sintomas mais observados durante o diagnóstico é o sangramento uterino anormal.

O IGF1 tem um papel importante na tumorigênese no endométrio, por ter aumento relacionado às condições consideradas fatores de risco no carcinoma endometrial. A interação com o seu receptor promove a transcrição gênica e controla a proliferação celular no endométrio em condições fisiológicas. No entanto, os resultados apresentados por estudos que têm como alvo o IGF1 e o IGF1R são controversos, e os mecanismos pela qual ele exerce este efeito no câncer de endométrio não estão completamente esclarecidos. O estudo do perfil de expressão das vias que fazem parte da sinalização do IGF1R no câncer de endométrio irá permitir a elucidação dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia desta doença.

HIPÓTESES

H0: O câncer de endométrio e o tecido não-neoplásico apresentam expressão similar dos genes envolvidos na cascata de sinalização do IGF1R que induzem a diferenciação, proliferação e apoptose.

H1: O câncer de endométrio e o tecido não-neoplásico apresentam expressão diferencial dos genes envolvidos na cascata de sinalização do IGF1R que induzem a diferenciação, proliferação e apoptose.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Analisar a expressão gênica dos genes que participam da via de sinalização do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1, relacionados ao desenvolvimento do fenótipo tumoral (diferenciação e proliferação celular) em tecido de câncer endometrial e tecido endometrial não-neoplásico, assim como analisar a expressão proteica do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1, do seu receptor e do receptor da insulina.

Objetivos específicos

1. Analisar a expressão gênica dos genes envolvidos na cascata de sinalização do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 em tecido de câncer de endométrio e endométrio não-neoplásico;
2. Avaliar as diferenças de expressão gênica no tecido de câncer endometrial e tecido não-neoplásico e verificar a expressão proteica do IGF1R, IGF1 e do IR;
3. Investigar, através de bases de dados, a funcionalidade dos genes mais superexpressos no câncer de endométrio e a possível relação do seu produto com os mecanismos fisiopatológicos da doença.

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo caso-controle, em que os casos foram constituídos por pacientes com câncer de endométrio e os controles por pacientes com endométrio não-neoplásico.

Pacientes e coleta de amostras

Os tecidos de câncer endometrial (n=3) e endométrio não-neoplásico (n=3) foram provenientes de pacientes submetidas à histerectomia no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), com indicação independente deste estudo. Seguiu-se os critérios de inclusão para o grupo controle: pacientes na idade pós-menopausa, que não possuíam diagnóstico de neoplasias, ausência de diabetes e outras desordens hormonais. Para o grupo câncer foram incluídas pacientes na idade pós-menopausa e sem uso de TRH nos 3 meses anteriores à cirurgia, com diagnóstico confirmado de câncer de endométrio, sem quimioterapia e sem outras neoplasias concomitantes.

Durante a coleta, o tecido foi identificado e fragmentos do mesmo foram coletados em tubos de coleta contendo uma solução de RNAlater™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), sendo o restante do material encaminhado ao exame anatomopatológico. As pacientes foram apresentadas a um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1 e 2) para que elas fossem informadas que normalmente esse tecido é descartado e para que permitissem a utilização na pesquisa, perante assinatura.

Os dados referentes à idade, idade na transição menopáusica, IMC e grau de diferenciação foram obtidos dos registros mantidos no HCPA.

Exame Anatomopatológico e classificação dos tumores

Após retirada da peça cirúrgica, a confirmação da presença ou ausência de tecido neoplásico nas amostras foi realizada por microscopia ótica através da técnica de hematoxilina-eosina (HE) pelo Serviço de Patologia do HCPA.

A classificação histológica foi avaliada segundo o grau de diferenciação histológica (G) de tumores endometrioides que segue as normas da OMS: tumores bem diferenciados (G1), moderadamente diferenciados (G2) e indiferenciados (G3).

Aspectos éticos:

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA e foi aprovado em todos os seus aspectos, sob o número 16-0406. O trabalho também foi cadastrado na Plataforma Brasil, com CAEE registrado sob o número 56519216.2.0000.5327.

As amostras utilizadas no estudo foram obtidas de úteros descartados após histerectomia por outras indicações não relacionadas a este estudo. As pacientes receberam a garantia de sigilo em relação às informações obtidas e o uso do material coletado foi absolutamente restrito para fins de pesquisa científica. Aquelas que aceitaram participar do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Extração e quantificação de RNA total

A extração de RNA total foi feita através de 0,2 g de tecido de cada amostra, utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen, CA, EUA) segundo o protocolo do fabricante. As amostras foram homogeneizadas com 1 mL de TRIzol por cerca de 1 minuto e deixadas em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio (Sigma-Aldrich, MO, EUA) e as amostras foram agitadas por 15 segundos, incubadas em temperatura ambiente por mais 3 minutos e centrifugadas. Após obtenção da fase aquosa, o RNA foi precipitado com 1 mL de propanol *overnight*

e foram centrifugadas novamente. Para lavagem do material, foi utilizado 1 mL de etanol 75% e o RNA foi então dissolvido em H₂O com DEPC (dietilpirocarbonato) em banho-maria (60 °C).

A quantificação da concentração de RNA de cada amostra foi realizada através de 1 µL da solução de RNA diluída em água, e lidas em duplicata no equipamento NanoDrop Spectrophotometer 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. O parâmetro considerado como indicador de pureza do RNA foi a razão das absorvâncias a 260 e 280 nm superior a 1,6 e próximo de 2, indicativo de ausência de contaminação. A quantidade de RNA foi obtida a partir da absorvância a 260 nm ($[RNA] = A_{260} \times \text{diluição} \times 40 \mu\text{g/mL}$) e foi fornecida em µg/µL.

Síntese do cDNA

A síntese do cDNA foi realizada a partir de 2 µg de RNA total, utilizando-se dos reagentes específico GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA). Para tal, utilizou-se um *random primer* que foi adicionado ao RNA e a solução foi submetida a uma temperatura de 70 °C por 5 minutos para desnaturação. Em seguida, foi preparada uma solução contendo um tampão da reação, nucleotídios, um inibidor de ribonucleases (RNasin® Ribonuclease Inhibitors) e a enzima transcriptase. Esta solução foi adicionada ao tubos contendo o RNA e foram incubadas a 25 °C por 5 minutos para fase de anelamento e a 45 °C por 55 minutos para a extensão. Por fim, as amostras foram aquecidas a 70 °C por 15 minutos para que a enzima transcriptase fosse inativada. A reação de síntese do cDNA totalizou um volume de 20µL que foi armazenado a -20°C até a amplificação por PCR.

Análise da expressão gênica

O método escolhido para avaliação molecular da expressão de mRNA foi a técnica da reação quantitativa em cadeia da polimerase em tempo real, a partir da transcrição reversa (RT-qPCR). A reação em cadeia da polimerase (PCR) trata-se de

uma técnica bastante sensível que utiliza um sistema de detecção contínua da cinética da reação de RT-qPCR por fluorescência.

Optamos pela utilização do ensaio *TaqMan® Array Human IGF1R Signaling 96-well plate* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), que consiste em uma placa contendo 96 poços, dos quais 92 contendo genes envolvidos na sinalização da insulina e 4 controles endógenos. Na figura 7 se encontram dispostos todos os genes e a organização espacial na placa de RT-qPCR e na tabela 3 se encontram dispostos os código de todos os genes presentes no ensaio, a identificação da sonda do ensaio (ID do ensaio), o nome do gene, a identificação do gene (ID NCBI) e um resumo das funções desses genes. Os ensaios de expressão gênica TaqMan® (*Gene Expression Assays*) consistem em um par de *primers* não marcados e uma sonda TaqMan® com marcação FAM™ na extremidade 5' e MGB (*minor groove binder*) e NFQ (*nonfluorescent quencher*) na extremidade 3'.

Para tal, foram utilizadas 6 placas contendo os ensaios referentes à sinalização do IGF1R, sendo cada placa para uma paciente. As amostras contendo o cDNA de cada paciente foram diluídas 1:10 e em cada poço foi adicionado 2 µL de cDNA diluído. Além disso, adicionou-se 5 µL de TaqMan® Gene Expression Master Mix (2X) e 3 µL de água livre de nucleases, totalizando 10 µL na reação. O equipamento utilizado foi o 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

As condições da reação foram: 50°C por 2 minutos para ativação da enzima AmpErase® UNG, 95 °C por 10 minutos para ativação da enzima AmpliTaq Gold® e início da desnaturação, e 45 ciclos continuando a desnaturação em 95 °C por 15 segundos e anelamento/extensão a 60 °C por 1 minuto. Os valores quantitativos foram obtidos através do ciclo limiar (*threshold cycle (CT)*), em que o aumento do sinal fluorescente foi associado com o aumento exponencial do produto do qPCR durante a detecção.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	18S	GAPDH	HPRT1	GUSB	AKT1	AKT2	AKT3	ARAF	ATF4	BAD	BRAF	CACNA1C
B	CACNA1F	CACNA1G	CACNA1H	CACNA1S	CALM1	CALM2	CALM3	CAMK2A	CAMK2B	CAMK2G	CAMK4	CASP9
C	CHUK	CREB1	CRK	EIF2B1	EIF2B5	EIF4E	ELK1	FOXO3	FRAP1	GRB2	GSK3B	GYS1
D	HRAS	IGF1	IGF1R	IGF2	IKBKB	IKBKE	IKBKG	IRS1	ITPR1	ITPR3	KRAS	MAP2K1
E	MAP2K2	MAPK1	MAPK3	MEF2A	MEF2C	MEF2D	NFAT5	NFATC1	NFATC2	NFATC3	NFATC4	NFKB1
F	NFKB2	NFKBIA	NFKBIB	NFKBIE	NRAS	PDPK1	PIK3CA	PIK3CB	PIK3CD	PIK3R1	PIK3R2	PLCB1
G	PLCB2	PLCE1	PLCG1	PLCG2	PPP3CA	PPP3R1	PRKCI	PRKCZ	PTEN	RAF1	RAPGEF1	REL
H	RELA	RELB	RPS6	RPS6KB1	SHC1	SLC2A4	SOS1	YWHAB	YWHAE	YWHAH	YWHAQ	YWHAZ

Figura 7. Layout da placa *TaqMan® Array Human IGF1R Signaling 96-well* utilizada na análise dos genes envolvidos na via de sinalização do IGF1R, em que cada poço contém uma sonda específica diferente.

Tabela 3. Descrição dos genes avaliados no ensaio, sendo que os 4 primeiros foram considerados normalizadores.

Símbolo	ID DO ENSAIO	NOME DO GENE	ID NCBI	FUNÇÃO
1 18S	Hs99999901_s1	<i>18S ribosomal RNA</i>		r-RNA, é normalizador.
2 GAPDH	Hs99999905_m1	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>	2597	Fosforilação oxidativa do gliceraldeído-3-fosfato na presença de fosfato inorgânico e NAD.
3 HPRT1	Hs99999909_m1	<i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1</i>	3251	Conversão de hipoxantina em monofosfato de inosina e guanina em monofosfato de guanosina.
4 GUSB	Hs99999908_m1	<i>Glucuronidase Beta</i>	2990	Hidrolase que degrada glicosaminoglicanos.
5 AKT1	Hs00178289_m1	<i>AKT Serine/Threonine Kinase 1</i>	207	Proteína quinase de serina/treonina cuja ativação ocorre através da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K).
6 AKT2	Hs01086102_m1	<i>AKT Serine/Threonine Kinase 2</i>	208	Oncogene que codifica proteína pertencente à subfamília de quinases serina/treonina.
7 AKT3	Hs00178533_m1	<i>AKT Serine/Threonine Kinase 3</i>	10000	Também chamado de PKB, pertence à família de proteínas quinases serina/treonina

Símbolo	ID DO ENSAIO	NOME DO GENE	ID NCBI	FUNÇÃO
8 ARAF	Hs00176427_m1	<i>A-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase</i>	369	Proto-oncogene pertence à subfamília RAF (família das quinases Ser/Thr), envolvido no crescimento e desenvolvimento celular.
9 ATF4	Hs00909568_g1	<i>Activating Transcription Factor 4</i>	468	Proteínas de ligação ao DNA que incluem fatores de transcrição e proteínas de ligação a elementos de resposta ao cAMP (CREBs).
10 BAD	Hs00188930_m1	<i>BCL2 Associated Agonist Of Cell Death</i>	572	Regula positivamente a apoptose celular, formando heterodímeros com BCL-xL e BCL-2.
11 BRAF	Hs00269944_m1	<i>B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase</i>	673	Regulação da via de sinalização MAPK/ERK, que afeta a divisão e diferenciação celular
12 CACNA1C	Hs00167681_m1	<i>Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 C</i>	775	Subunidade alfa-1 de um canal de cálcio dependente de voltagem.
13 CACNA1F	Hs00913730_m1	<i>Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 F</i>	778	Idem ao anterior.
14 CACNA1G	Hs00367969_m1	<i>Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 G</i>	8913	Idem ao anterior.
15 CACNA1H	Hs01103523_m1	<i>Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 h</i>	8912	Idem ao anterior.

Símbolo	ID DO ENSAIO	NOME DO GENE	ID NCBI	FUNÇÃO	
16	CACNA1S	Hs00163885_m1	<i>Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 S</i>	779	Idem ao anterior.
17	CALM1	Hs00237233_m1	<i>Calmodulin 1</i>	801	Um dos três genes que codifica uma proteína de ligação ao cálcio que é uma das quatro subunidades da fosforilase quinase.
18	CALM2	Hs00830212_s1	<i>Calmodulin 2</i>	805	Proteína de ligação ao cálcio que desempenha um papel nas vias de sinalização, na progressão do ciclo celular e na proliferação.
19	CALM3	Hs00270914_m1	<i>Calmodulin 3</i>	808	Membro de uma família de proteínas que se ligam ao cálcio e funciona como um co-fator enzimático.
20	CAMK2A	Hs00211096_m1	<i>Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase II Alpha</i>	815	Família das proteínas quinases Ser/Thr e à subfamília de proteína quinases dependente de Ca (2+) / calmodulina.
21	CAMK2B	Hs00365799_m1	<i>Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase II Beta</i>	816	Idem ao anterior.
22	CAMK2G	Hs00538454_m1	<i>Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase II Gamma</i>	818	Idem ao anterior
23	CAMK4	Hs00174318_m1	<i>Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase IV</i>	814	Proteína quinase Ser/Thr multifuncional com distribuição de tecido limitada.

Símbolo	ID DO ENSAIO	NOME DO GENE	ID NCBI	FUNÇÃO
24 CASP9	Hs00154260_m1	<i>Caspase 9</i>	842	Membro da família de proteases de ácido cisteína-aspártica (caspase), com papel importante na apoptose e supressão tumoral.
25 CHUK	Hs00175141_m1	<i>Conserved Helix-Loop-Helix Ubiquitous Kinase</i>	1147	Membro da família de proteínas quinases Ser/Thr.
26 CREB1	Hs00231713_m1	<i>CAMP Responsive Element Binding Protein 1</i>	1385	Fator de transcrição membro da família de leucinas com domínio <i>zipper</i> , se liga como um homodímero ao elemento responsivo ao AMPc.
27 CRK	Hs00180418_m1	<i>CRK Proto-Oncogene</i>	1398	Ligante de proteínas fosforiladas pela tirosina quinase, envolvido em várias vias de sinalização, recrutando proteínas citoplasmáticas que atuam na interação célula-célula.
28 EIF2B1	Hs00426752_m1	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 2B Subunit Alpha</i>	1967	Uma das cinco subunidades do fator de iniciação da tradução eucariótica 2B (EIF2B), um fator de troca de GTP e regulador essencial para a síntese proteica
29 EIF2B5	Hs00384949_m1	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 2B Subunit Epsilon</i>	8893	Idem ao anterior.

Símbolo	ID DO ENSAIO	NOME DO GENE	ID NCBI	FUNÇÃO
30 EIF4E	Hs00913390_m1	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E</i>	1977	Componente do complexo fator 4F de iniciação da tradução eucariótica, atua como um proto-oncogene e sua expressão está associada à tumorigênese.
31 ELK1	Hs00428286_g1	<i>ELK1, ETS Transcription Factor</i>	2002	A proteína codificada por este gene é um alvo nuclear para a cascata de sinalização ras-raf-MAPK.
32 FOXO3	Hs00818121_m1	<i>Forkhead Box O3</i>	2309	Fator de transcrição da família <i>forkhead</i> , provavelmente funciona iniciando a apoptose através da expressão de genes necessários para a morte celular.
33 FRAP1 (MTOR)	Hs00234522_m1	<i>Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase</i>	2475	Atua na parada do ciclo celular e nos efeitos imunossupressores do complexo FKBP12-rapamicina.
34 GRB2	Hs00157817_m1	<i>Growth Factor Receptor Bound Protein 2</i>	2885	Ligante do receptor do fator de crescimento epidérmico, pode ter função de oncogene.
35 GSK3B	Hs00275656_m1	<i>Glycogen Synthase Kinase 3 Beta</i>	2932	É uma quinase Ser/Thr, age como regulador negativo da homeostase da glicose e está envolvida no metabolismo energético, inflamação, disfunção mitocondrial e apoptose.

Símbolo	ID DO ENSAIO	NOME DO GENE	ID NCBI	FUNÇÃO
36 GYS1	Hs00157863_m1	<i>Glycogen Synthase 1</i>	2997	Envolvido no metabolismo da glicose, adicionando moléculas no glicogênio.
37 HRAS	Hs00610483_m1	<i>HRas Proto-Oncogene, GTPase</i>	3265	Pertence à família de oncogenes Ras
38 IGF1	Hs01547656_m1	<i>Insulin Like Growth Factor 1</i>	3479	Proteína semelhante à insulina em função e estrutura e é membro de uma família de proteínas envolvidas na mediação de crescimento e desenvolvimento
39 IGF1R	Hs00609566_m1	<i>Insulin Like Growth Factor 1 Receptor</i>	3480	Receptor de alta afinidade do IGF1, tem atividade de tirosina quinase e funciona como um agente anti-apoptótico, aumentando a sobrevivência celular.
40 IGF2	Hs00171254_m1	<i>Insulin Like Growth Factor 2</i>	3481	Membro da família dos fatores de crescimento semelhantes à insulina, que estão envolvidos no desenvolvimento e no crescimento.
41 IKBKB	Hs00233287_m1	<i>Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Beta</i>	3551	Age como inibidor do NF-kappa-β.
42 IKBKE	Hs01063858_m1	<i>Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Epsilon</i>	9641	Age como inibidor do NF-kappa-β e foi identificado como oncogene no câncer de mama.

Símbolo	ID DO ENSAIO	NOME DO GENE	ID NCBI	FUNÇÃO
43 IKBKG	Hs00415849_m1	<i>Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Gamma</i>	8517	Age como inibidor do NF-kappa-β, resultando na ativação de genes envolvidos na inflamação, imunidade e sobrevivência celular.
44 IRS1	Hs00178563_m1	<i>Insulin Receptor Substrate 1</i>	3667	Proteína que fosforilada pela tirosina quinase do receptor de insulina, sendo que mutações neste gene estão associadas com diabetes tipo II e susceptibilidade à resistência à insulina
45 ITPR1	Hs00181881_m1	<i>Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 1</i>	3708	Receptor intracelular para inositol 1,4,5-trisfosfato, envolvido com a transdução de sinais intracelulares e proliferação celular.
46 ITPR3	Hs00609908_m1	<i>Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 3</i>	3710	Este gene codifica um receptor para inositol 1,4,5-trisfosfato, um segundo mensageiro que medeia a liberação de cálcio intracelular.
47 KRAS	Hs00364282_m1	<i>KRAS Proto-Oncogene, GTPase</i>	3845	Oncogene homólogo da família dos genes Ras mamíferos, codifica uma proteína que é um membro da superfamília GTPase, envolvido em diversas malignidades.

Símbolo	ID DO ENSAIO	NOME DO GENE	ID NCBI	FUNÇÃO
48 MAP2K1	Hs00605615_mH	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1</i>	5604	Membro da família MAPK com especificidade dupla, envolvida com a proliferação, diferenciação e regulação da transcrição.
49 MAP2K2	Hs00360961_m1	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 2</i>	5605	Idem ao anterior.
50 MAPK1	Hs01046830_m1	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase 1</i>	5594	Membro da família MAPK, proteínas que integram múltiplos sinais bioquímicos e estão envolvidas em processos celulares, como proliferação, diferenciação e regulação da transcrição.
51 MAPK3	Hs00385075_m1	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase 3</i>	5595	Idem ao anterior.
52 MEF2A	Hs01050409_m1	<i>Myocyte Enhancer Factor 2A</i>	4205	Fator de transcrição de ligação ao DNA que ativa muitos genes específicos do músculo, induzidos por fatores de crescimento e pelo estresse.
53 MEF2C	Hs00231149_m1	<i>Myocyte Enhancer Factor 2C</i>	4208	Idem ao anterior.
54 MEF2D	Hs00954735_m1	<i>Myocyte Enhancer Factor 2D</i>	4209	Idem ao anterior.

Símbolo	ID DO ENSAIO	NOME DO GENE	ID NCBI	FUNÇÃO
55 NFAT5	Hs00232437_m1	<i>Nuclear Factor Of Activated T-Cells 5</i>	10725	Proteínas que desempenham um papel central na transcrição de genes indutíveis durante a resposta imune.
56 NFATC1	Hs00542678_m1	<i>Nuclear Factor Of Activated T-Cells 1</i>	4772	Componente do fator nuclear do complexo de transcrição de ligação ao DNA das células T ativadas.
57 NFATC2	Hs00905451_m1	<i>Nuclear Factor Of Activated T-Cells 2</i>	4773	Idem ao anterior.
58 NFATC3	Hs00190046_m1	<i>Nuclear Factor Of Activated T-Cells 3</i>	4775	Idem ao anterior.
59 NFATC4	Hs00190037_m1	<i>Nuclear Factor Of Activated T-Cells 4</i>	4776	Idem ao anterior.
60 NFKB1	Hs00765730_m1	<i>Nuclear Factor Kappa B Subunit 1</i>	4790	Codifica uma subunidade de ligação ao DNA do complexo da proteína NF-kappa-B.
61 NFKB2	Hs00174517_m1	<i>Nuclear Factor Kappa B Subunit 2</i>	4791	Codifica uma subunidade do fator nuclear de transcrição NF-kappa-B (NFkB)
62 NFKBIA	Hs00153283_m1	<i>NFKB Inhibitor Alpha</i>	4792	Idem ao anterior.
63 NFKBIB	Hs00182115_m1	<i>NFKB Inhibitor Beta</i>	4793	Idem ao anterior.
64 NFKBIE	Hs00234431_m1	<i>NFKB Inhibitor Epsilon</i>	4794	Idem ao anterior.

Símbolo	ID DO ENSAIO	NOME DO GENE	ID NCBI	FUNÇÃO
65 NRAS	Hs00180035_m1	<i>NRAS Proto-Oncogene, GTPase</i>	4893	Oncogene N-ras, envolvido em diversos tipos de câncer.
66 PDPK1	Hs00176884_m1	<i>3-Phosphoinositide Dependent Protein Kinase 1</i>	5170	Envolvido com a síntese de proteínas.
67 PIK3CA	Hs00180679_m1	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha</i>	5290	Proteína que fosforila fosfatidilinositóis, tem papel importante na sinalização celular e funciona como um oncogene.
68 PIK3CB	Hs00927728_m1	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Beta</i>	5291	Idem ao anterior.
69 PIK3CD	Hs00192399_m1	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Delta</i>	5293	Idem ao anterior.
70 PIK3R1	Hs00381459_m1	<i>Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1</i>	5295	Idem ao anterior. Está envolvido com a sinalização da insulina.
71 PIK3R2	Hs00178181_m1	<i>Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 2</i>	5296	Idem ao anterior. Interage com o PIK3CD.

Símbolo	ID DO ENSAIO	NOME DO GENE	ID NCBI	FUNÇÃO
72 PLCB1	Hs00248563_m1	<i>Phospholipase C Beta 1</i>	23236	Catalisa a formação de inositol 1,4,5-trisfosfato e diacilglicerol a partir de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, importante na transdução intracelular que afeta o crescimento e a diferenciação celular, assim como a transcrição gênica.
73 PLCB2	Hs00190117_m1	<i>Phospholipase C Beta 2</i>	5330	Idem ao anterior.
74 PLCE1	Hs00275279_m1	<i>Phospholipase C Epsilon 1</i>	51196	Idem ao anterior.
75 PLCG1	Hs00234046_m1	<i>Phospholipase C Gamma 1</i>	5335	Idem ao anterior
76 PLCG2	Hs00182192_m1	<i>Phospholipase C Gamma 2</i>	5336	Idem ao anterior.
77 PPP3CA	Hs00174223_m1	<i>Protein Phosphatase 3 Catalytic Subunit Alpha</i>	5530	Fosfatase estimulada pela calmodulina, importante na síntese de proteínas.
78 PPP3R1	Hs01547793_m1	<i>Protein Phosphatase 3 Regulatory Subunit B, Alpha</i>	5534	Confere sensibilidade ao cálcio e está envolvido com a síntese de proteínas.
79 PRKCI	Hs00702254_s1	<i>Protein Kinase C Iota</i>	5584	Membro da proteína quinasa C (PKC), das quinases Ser/Thr, envolvidas em uma variedade de processos celulares, tais como proliferação, diferenciação e secreção.
80 PRKCZ	Hs00177051_m1	<i>Protein Kinase C Zeta</i>	5590	Idem ao anterior.

Símbolo	ID DO ENSAIO	NOME DO GENE	ID NCBI	FUNÇÃO
81 PTEN	Hs01920652_s1	<i>Phosphatase And Tensin Homolog</i>	5728	Regula negativamente os níveis intracelulares de fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato e funciona como um supressor de tumor por regulação negativa da via de sinalização AKT / PKB.
82 RAF1	Hs00234119_m1	<i>Raf-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase</i>	5894	Proteína membro da família das MAPK.
83 RAPGEF1	Hs00178409_m1	<i>Rap Guanine Nucleotide Exchange Factor 1</i>	2889	Transdução da via de sinalização da CRK, envolvida na apoptose.
84 REL	Hs00968436_m1	<i>REL Proto-Oncogene, NF-KB Subunit</i>	5966	Envolvido na apoptose, inflamação, respostas imunes e processos oncogênicos.
85 RELA	Hs00153294_m1	<i>RELA Proto-Oncogene, NF-KB Subunit</i>	5970	Proteína associada à REL, envolvida na formação do heterodímero do NF-kappa-β. Ativação positivamente associada com diversos tipos de câncer.
86 RELB	Hs00232399_m1	<i>RELB Proto-Oncogene, NF-KB Subunit</i>	5971	Homólogo ao RELA.
87 RPS6	Hs01058685_g1	<i>Ribosomal Protein S6</i>	6194	Componente da subunidade 40 ribossomal. Possivelmente regula a tradução de proteínas e pode contribuir para o crescimento e proliferação celular.

Símbolo	ID DO ENSAIO	NOME DO GENE	ID NCBI	FUNÇÃO	
88	RPS6KB1	Hs00177357_m1	<i>Ribosomal Protein S6 Kinase B1</i>	6198	Promove a síntese proteica, crescimento celular e proliferação celular. A atividade desse gene foi associada ao câncer humano.
89	SHC1	Hs00427539_m1	<i>SHC Adaptor Protein 1</i>	6464	Proteínas adaptadoras nas vias de transdução de sinais intracelulares.
90	SLC2A4	Hs00168966_m1	<i>Solute Carrier Family 2 Member 4</i>	6517	Proteína que funciona como um transportador de glicose regulado pela insulina.
91	SOS1	Hs00362308_m1	<i>SOS Ras/Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor 1</i>	6654	Fator de troca de nucleotídeos de guanina para proteínas RAS.
92	YWHAB	Hs00793604_m1	<i>Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Beta</i>	7529	Proteína pertencente à família de proteínas 14-3-3, que podem estar envolvidos com a sinalização mitogênica e com o ciclo celular.
93	YWHAE	Hs00356749_g1	<i>Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Epsilon</i>	7531	Tem papel em diversas atividades bioquímicas relacionadas à transdução de sinal, como a divisão celular e a regulação da sensibilidade à insulina, tem sido implicado na patogênese do câncer.
94	YWHAH	Hs00607046_m1	<i>Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Eta</i>	7533	Idem ao anterior.

Símbolo	ID DO ENSAIO	NOME DO GENE	ID NCBI	FUNÇÃO
95 YWHAQ	Hs00863277_g1	<i>Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Theta</i>	10971	Idem ao anterior.
96 YWHAZ	Hs00237047_m1	<i>Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta</i>	7534	Idem ao anterior.

Análise da expressão proteica

A expressão proteica foi analisada através da técnica de imunohistoquímica, a partir de tecido obtido nas biópsias. Os anticorpos primários escolhidos foram: IGF1 na diluição 1:100 (IGF-1 Antibody (H-70) sc-9013), IGF1R β na diluição 1:200 (IGF1-R β Antibody (C-20) sc-713) e IR na diluição 1:50 (Insulin R β (H-70) sc-20739) (Santa Cruz Biotechnology, TX, EUA).

As amostras foram fixadas em formalina e incluídas em parafina, cortadas em micrótomo regulado para espessura de 4 μ m. Os cortes foram posicionados em lâminas e essas foram aquecidas em estufa a 80 °C por uma hora, desparafinizadas com xilol, reidratadas em álcool etílico e em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada em banho-maria a 95 °C por uma hora em tampão citrato. Após, foi bloqueada a atividade endógena da enzima peroxidase com uma solução de peróxido de hidrogênio (3%) em metanol por cerca de 30 minutos. A seguir, os cortes foram incubados com os anticorpos definidos *overnight* a 4 °C. Posteriormente, foram incubados com o anticorpo secundário para detecção. A visualização da reação foi possível utilizando o Liquid DAB (Dako, Glostrup, Dinamarca) conforme as instruções. Depois, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris por 1 minuto, as amostras foram desidratadas com álcool absoluto e colocadas em xilol para montagem das lâminas em resina.

As lâminas foram analisadas por um patologista e foi determinada a intensidade de marcação (+1, +2 ou +3), a porcentagem de células positivas e a estrutura predominantemente marcada.

Análise da rede de interações na via de sinalização do IGF1R

O estudo das interações estabelecidas entre os genes dispostos no ensaio *TaqMan® Array Human IGF1R Signaling 96-well plate* foi realizado através da plataforma online *String* (<https://string-db.org/>). A plataforma permite a visualização e análise proteína-proteína e associação de redes de sinalização. Ela integra diferentes

plataformas públicas, incluindo dados experimentais, predições por métodos computacionais e informações biológicas validadas. Entre os parâmetros escolhidos para análise, o nível de confiança foi 0,90 e foi aceito no máximo 5 interações.

Estudos funcionais do produto gênico

Os dados e a localização dos genes foram retirados das seguintes bases de dados: *Gene* *NCBI* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) e *Ensembl* (<https://www.ensembl.org/index.html>).

Também foi utilizado o cBioPortal for Cancer Genomics (<http://cbioportal.org>), que é um recurso online que proporciona a exploração, visualização e análise de dados referentes à genômica do câncer, de dados recuperados da base de dados do *The Cancer Genome Atlas - TCGA* (<https://cancergenome.nih.gov/>). O TCGA permite uma melhor compreensão da base genética de diversos tipos de câncer, através do sequenciamento de genomas e da bioinformática. Ele disponibiliza dados de 33 tipos de câncer, obtidos por técnicas que elucidam o perfil de expressão gênica, da variação do número de cópias, de microRNAs, de metilação do DNA, sequenciamento de éxons e genotipagem de SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) de, pelo menos, 1.200 genes. Assim, foi utilizado para ver possíveis associações entre a expressão dos genes de interesse do estudo (os 4 mais diferencialmente expressos) com o câncer de endométrio.

População e amostra

Por utilizar um método de rastreamento gênico que consiste em placas de 96 poços contendo sondas liofilizadas correspondentes a rotas de sinalização específicas (TaqMan® Plate Array, da AppliedBiosystems), como forma de fazer uma identificação presumível de genes envolvidos na doença em estudo, optou-se por seguir o tamanho amostral indicado pelo fabricante. Assim, foi assumido um tamanho amostral de 3 placas por grupo, totalizando 6 placas. Além disso, o trabalho feito por Mitkevich e

colaboradores, que também utilizou este mesmo método, também tem o tamanho amostral de 3 (Mitkevich *et al.*, 2013).

Análise estatística

Para avaliação dos parâmetros clínicos das pacientes (apresentados como média \pm DP) foi realizado o teste t de *Student*, considerando distribuição normal de amostras independentes.

O normalizador foi escolhido através da análise pelo programa *NormFinder* e os resultados da expressão gênica foram avaliados utilizando o *software* DataAssistTM. A análise da expressão gênica foi feita através do programa SPSS 18.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*, EUA), e os dados foram considerados não paramétricos. Em consequência do número amostral pequeno, foi realizado o teste *U* de Mann-Whitney para análise dos resultados. No entanto, optou-se por fazer uma análise descritiva dos dados dispostos em *fold change* (RQ log₂). Do mesmo modo, para os dados referentes à imunohistoquímica, foi realizada uma análise descritiva segundo a interpretação de um patologista qualificado e independente ao estudo.

Locais de realização do projeto

A execução dos procedimentos para análise de expressão gênica e proteica foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular, Endócrina e Tumoral instalado no Departamento de Fisiologia, UFRGS e no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular, instalado no Centro de Pesquisa no HCPA, os quais dispõem da infraestrutura necessária para a realização do projeto.

Fontes de financiamento

Este projeto foi submetido a agências de fomento para obtenção de recursos financeiros:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;
- Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES;
- Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre – FIPE/HCPA;
- Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do RS – FAPERGS.

Descarte de resíduos

De acordo com a Resolução Nº 306 de 07 de dezembro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA nº 358 de 29 de abril de 2005, que dispõem sobre o tratamento e disposição final de resíduos de serviços de saúde, os resíduos biológicos gerados nesse estudo (úteros humanos) fazem parte do grupo A3. Esses resíduos foram ser acondicionados em sacos brancos contendo o símbolo universal de risco biológico, sem quaisquer outros tipos de resíduos misturados. Foram entregues ao serviço de coleta competente licitado pela UFRGS. Resíduos de fenol foram tratados como lixo químico, que foi coletado pelo serviço de coleta sediado no Instituto de Química da UFRGS.

RESULTADOS

Caracterização das amostras

As características principais das amostras estudadas estão dispostas na tabela 4. A média de idade (apresentado como média \pm desvio padrão), não foi diferente entre os grupos câncer, 71,33 (\pm 6,11) anos, e controle (endométrio não-neoplásico), 62 (\pm 8,88) anos. Da mesma forma, a idade em que ocorreu a transição menopáusicas não foi diferente entre os grupos, sendo 49,66 (\pm 2,30) para grupo câncer e 52 (\pm 3,70) para o grupo controle ($p = 0,399$). O IMC das pacientes, (apresentado em kg/m^2) também não foi diferentes entre os grupos câncer e controle, sendo os valores 32,30 (\pm 7,25) e 31,16 (\pm 4,01), respectivamente. O grau de diferenciação foi avaliado somente para o grupo caso, aferido por um patologista. Das 3 amostras de câncer, 2 apresentaram diferenciação G3 (66,66 %) e 1 se apresentou como G1 (33,33 %). Em relação ao estadiamento cirúrgico segundo o sistema FIGO, a totalidade das pacientes do grupo câncer apresentaram carcinoma confinado ao corpo uterino (estágios I e II), no entanto, não foi possível acessar a classificação de estadiamento dos tumores.

Tabela 4. Característica das amostras estudadas. ^a dados não avaliados para as amostras controle. Dados representados como media \pm desvio padrão.

	Endométrio não-neoplásico	Câncer de endométrio	<i>p</i>
Idade (média \pm desvio)	62 \pm 8,88	71,33 \pm 6,11	0,208
Idade da transição menopáusicas	52 \pm 3,70	49,66 \pm 2,30	0,399
Índice de Massa Corporal (kg/m^2)	31,16 \pm 4,01	32,30 \pm 7,25	0,824
Grau de diferenciação^a	—	G1 33,33% (n=1) G2 0 G3 66,66% (n=2)	— — —

Na figura 8 estão representados cortes histológicos de duas das amostras utilizadas no estudo, coloridas pela técnica de hematoxilina e eosina. À direita encontra-se uma amostra pertencente ao grupo controle. Todas as pacientes exibiram endométrio atrófico, mostrando ausência de neoplasia e morfologia típica do tecido endometrial. À esquerda está disposto um corte referente às amostras de câncer endometrial. Todos os casos tiveram diagnóstico confirmado de adenocarcinoma endometriode, com extensa necrose. O exame anatomopatológico demonstrou ausência de invasão vascular e/ou perineural nos cortes analisados.

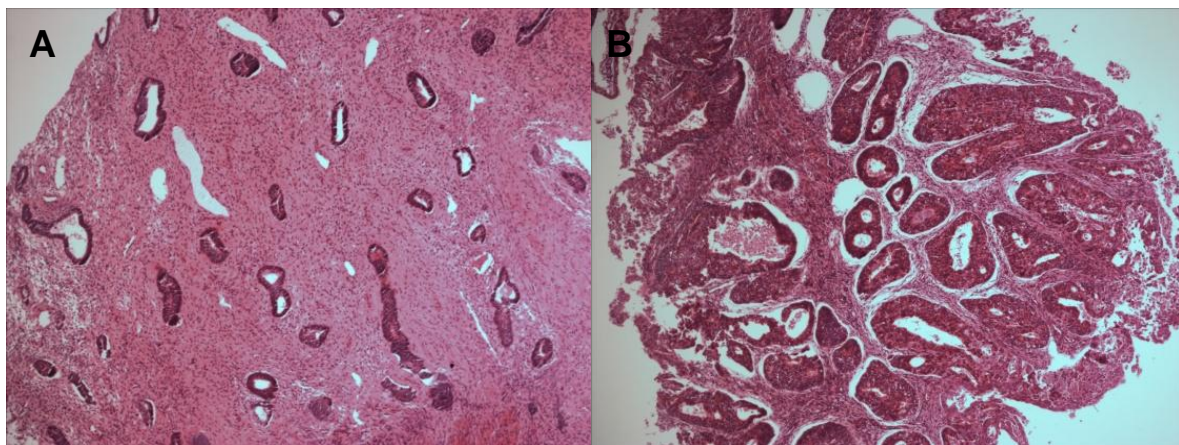


Figura 8. Lâminas de HE em aumento 400x de duas das amostras estudadas. (A) amostra do grupo controle. (B) amostra do grupo câncer.

Análise dos níveis de mRNA da via de sinalização do IGF1R

Com o ensaio TaqMan® Array Human *IGF1R* Signaling foi possível analisar 96 genes. Dentro destes, 4 eram genes endógenos candidatos a normalizadores e 92 eram genes alvo.

Na figura 9 está representada a distribuição dos genes contidos no ensaio de acordo com a função: fatores de transcrição, processo de síntese proteica, mediadores de resposta imune, receptores, genes envolvidos com o metabolismo da glicose, no processo de tumorigênese (oncogenes e proto-oncogenes), genes envolvidos na

sinalização intracelular, no ciclo celular, na apoptose, na proliferação, diferenciação e crescimento celular, genes supressores tumorais e da via da PI3K/Akt/MAPK, proteínas quinases Ser/Thr e canais de Ca²⁺.

Número de genes de acordo com as funções

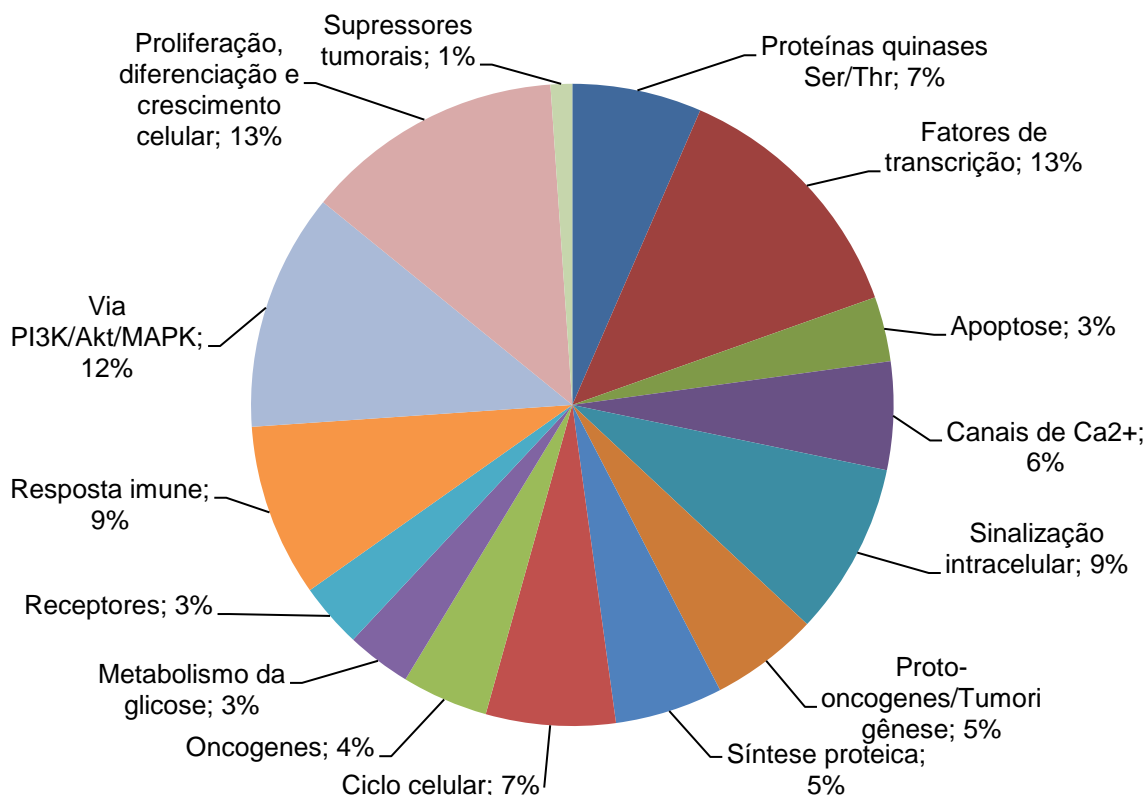


Figura 9. Distribuição dos genes de acordo com a função tida em consideração como genérica, sendo: 12 genes que codificam fatores de transcrição; 12 genes envolvidos na proliferação, diferenciação e crescimento celular; 11 genes participantes na via da PI3K/Akt/MAPK; 8 genes que codificam proteínas importantes em rotas de sinalização intracelular; 8 genes envolvidos na resposta imune; 6 genes que regulam o ciclo celular; 6 genes que codificam proteínas quinases serina/treonina; 5 genes que codificam canais de cálcio; 5 genes considerados proto-oncogenes; 5 genes envolvidos com a síntese proteica; 4 oncogenes; 3 genes que regulam a apoptose; 3 genes que codificam receptores e 3 genes envolvidos no metabolismo da glicose.

Os genes normalizadores têm como pressuposto apresentar expressão constitutiva o mais próximo possível em todas as amostras controle e caso utilizados nos experimentos. Estes genes são assim denominados por não serem afetados por possíveis tratamentos, estágios de desenvolvimento, estado e progressão de determinada doença, nem pelas condições experimentais, de modo que a análise dos resultados obtidos na RT-qPCR está relacionada diretamente ao gene normalizador. Este passo é extremamente importante para uma análise acurada para determinar os níveis da expressão gênica. No entanto já foi demonstrado que torna-se impossível utilizar um único gene de referência, porque todos os genes sofrem algum grau de modificação sob algumas condições.

No ensaio são definidos os 4 primeiros poços como genes endógenos, sendo eles o *18S*, o *GAPDH*, o *HPRT1* e o *GUSB*. Para análise do melhor candidato a normalizador, foi realizado um teste através do *software* NormFinder, que contém um algoritmo que faz uso dos valores de expressão e de ciclo limiar médio para calcular a estabilidade de cada um dos genes em um conjunto de amostras, levando em conta a variação intragrupo e intergrupo. A estabilidade representa a dispersão dos dados, ou seja, indica a variabilidade na expressão destes genes. Quanto menor este valor, maior é considerada a estabilidade. Dos 4 genes candidatos a normalizadores, foram desconsiderados o *18S* e o *HPRT1* das análises por não terem apresentado expressão em algumas amostras estudadas. Assim, conforme os resultados obtidos, o gene com maior estabilidade no nosso estudo foi o *GAPDH* (0,049) (Tabela 5). O gene *GUSB* apresentou o valor de estabilidade de 0,069. Optamos por usar o *GAPDH* para normalizar os genes alvo.

Tabela 5. Valores de estabilidade de genes candidatos a normalizadores obtidos pelo *software* NormFinder.

Gene	ID	Nome do gene	Valor de estabilidade
GAPDH	2597	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>	0,049
GUSB	2990	<i>Glucuronidase Beta</i>	0,069

Para analisar a expressão dos genes de interesse, utilizamos o *software* DataAssist™. Este programa utiliza o método $2^{-\Delta CT}$ para mensurar de forma acurada a expressão gênica quantitativa relativa de um grande número de genes e/ou amostras, obtendo o *Fold Change* (RQ).

Devido a dificuldades técnicas, uma das placas contendo a amostra de uma paciente controle foi inviabilizada e, portanto, o número amostral para o grupo controle foi de 2. Dos 92 genes de interesse analisados, 26 apresentaram expressão somente no grupo câncer: *CACNA1H*, *CRK*, *EIF2B5*, *ELK1*, *FRAP1 (MTOR)*, *GYS1*, *HRAS*, *IGF2*, *IKBKB*, *IKBKE*, *ITPR3*, *KRAS*, *NFAT5*, *NFATC1*, *NFKB1*, *NFKBIB*, *NFKBIE*, *PIK3CA*, *PIK3CB*, *PLCB1*, *PLCB2*, *PLCG2*, *PRKCZ*, *RELB*, *SHC1* e *YWHAZ*, representados na tabela 6.

Tabela 6. Genes com expressão somente no grupo câncer. Dados obtidos no *software* DataAssist™.

Gene	ID	Nome do gene
CACNA1H	8912	<i>Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 H</i>
CRK	1398	<i>CRK Proto-Oncogene</i>
EIF2B5	1967	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 2B Subunit Epsilon</i>
ELK1	2002	<i>ELK1, ETS Transcription Factor</i>
FRAP1 (MTOR)	2475	<i>Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase</i>
GYS1	2997	<i>HRas Proto-Oncogene, GTPase</i>
HRAS	3265	<i>Glycogen Synthase 1</i>
IGF2	3481	<i>Insulin Like Growth Factor 2</i>
IKBKB	3551	<i>Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Beta</i>
IKBKE	9641	<i>Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Epsilon</i>
ITPR3	3710	<i>Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 3</i>
KRAS	3845	<i>KRAS Proto-Oncogene, GTPase</i>
NFAT5	10725	<i>Nuclear Factor Of Activated T-Cells 5</i>

Gene	ID	Nome do gene
NFATC1	4772	<i>Nuclear Factor Of Activated T-Cells 1</i>
NFKB1	4790	<i>Nuclear Factor Kappa B Subunit 1</i>
NFKBIB	4793	<i>NFKB Inhibitor Beta</i>
NFKBIE	4794	<i>NFKB Inhibitor Epsilon</i>
PIK3CA	5290	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha</i>
PIK3CB	5291	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Beta</i>
PLCB1	23236	<i>Phospholipase C Beta 2</i>
PLCB2	5330	<i>Phospholipase C Beta 1</i>
PLCG2	5336	<i>Phospholipase C Gamma 2</i>
PRKCZ	5590	<i>Protein Kinase C Zeta</i>
RELB	5971	<i>RELB Proto-Oncogene, NF-KB Subunit</i>
SHC1	6464	<i>SHC Adaptor Protein 1</i>
YWHAZ	7534	<i>Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta</i>

Outros 46 genes se mostraram expressos tanto no grupo câncer quanto no grupo controle, tornando possível a realização de uma análise comparativa da expressão gênica, utilizando os valores de $2^{-\Delta CT}$. Todos os genes tiveram expressão maior no grupo câncer, quando comparado ao grupo controle, evidenciado pelos valores positivos de RQ log2. Esses valores estão dispostos na tabela 7, em ordem decrescente de expressão.

Tabela 7. Genes diferencialmente expressos no câncer endometrial em relação ao controle. Dados obtidos no software DataAssist™.

Gene	ID	Nome do gene	RQ log2	p valor
FOXO3	2309	<i>Forkhead Box O3</i>	81,60	0,248
PRKCI	5894	<i>Protein Kinase C Iota</i>	71,29	0,083
RPS6KB1	6198	<i>Ribosomal Protein S6 Kinase B1</i>	34,50	0,564
CALM2	805	<i>Calmodulin 2</i>	31,19	0,248
IGF1	3479	<i>Insulin Like Growth Factor 1</i>	18,10	0,564
PPP3R1	2889	<i>Protein Phosphatase 3 Regulatory Subunit B, Alpha</i>	14,97	0,248
YWHAE	7531	<i>Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Epsilon</i>	13,67	0,248
NFATC3	4775	<i>Nuclear Factor Of Activated T-Cells 3</i>	13,39	0,248
MEF2C	4208	<i>Myocyte Enhancer Factor 2C</i>	11,14	0,248
MAPK3	5595	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase 3</i>	9,10	0,083
NFATC2	4773	<i>Nuclear Factor Of Activated T-Cells 2</i>	8,96	0,564
PLCG1	5335	<i>Phospholipase C Gamma 1</i>	8,35	0,248
CACNA1C	775	<i>Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 C</i>	7,74	0,564
PIK3CD	5293	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Delta</i>	7,39	0,248
PDPK1	5170	<i>3-Phosphoinositide Dependent Protein Kinase 1</i>	7,17	0,248
NFKB2	4791	<i>Nuclear Factor Kappa B Subunit 2</i>	6,35	0,564
IKBKG	8517	<i>Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase Subunit Gamma</i>	6,30	0,564
Gene	ID	Nome do gene	RQ log2	p valor

GSK3B	2932	<i>Glycogen Synthase Kinase 3 Beta</i>	6,21	0,248
BRAF	673	<i>B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase</i>	6,09	0,121
BAD	572	<i>BCL2 Associated Agonist Of Cell Death</i>	6,07	0,564
SOS1	6654	<i>SOS Ras/Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor 1</i>	5,02	0,564
MAP2K2	5605	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 2</i>	4,34	1,000
MAP2K1	5604	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1</i>	4,14	0,248
PPP3CA	5970	<i>Protein Phosphatase 3 Catalytic Subunit Alpha</i>	3,64	0,121
PIK3R2	5296	<i>Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 2</i>	3,41	0,564
NRAS	4893	<i>NRAS Proto-Oncogene, GTPase</i>	2,98	0,248
RPS6	6194	<i>Ribosomal Protein S6</i>	2,85	0,564
IRS1	3667	<i>Insulin Receptor Substrate 1</i>	2,40	0,121
CALM1	801	<i>Calmodulin 1</i>	2,31	0,564
RAF1	5584	<i>Raf-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase</i>	2,10	0,121
CREB1	1385	<i>CAMP Responsive Element Binding Protein 1</i>	1,92	0,083
ARAF	369	<i>A-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase</i>	1,73	0,439
YWHAQ	10971	<i>Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Theta</i>	1,17	0,564
ATF4	468	<i>Activating Transcription Factor 4</i>	1,13	1,000
YWHAH	7533	<i>Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Eta</i>	1,11	1,000
CALM3	808	<i>Calmodulin 3</i>	1,07	0,564
RAPGEF1	5534	<i>Rap Guanine Nucleotide Exchange Factor 1</i>	1,06	0,439
Gene	ID	Nome do gene	RQ log2	p valor

AKT2	208	<i>AKT Serine/Threonine Kinase 2</i>	0,87	1,000
YWHAB	7529	<i>Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Beta</i>	0,79	0,564
NFKBIA	4792	<i>NFKB Inhibitor Alpha</i>	0,73	1,000
MEF2D	4209	<i>Myocyte Enhancer Factor 2D</i>	0,56	1,000
EIF4E	1977	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E</i>	0,42	1,000
AKT1	207	<i>AKT Serine/Threonine Kinase 1</i>	0,39	0,248
IGF1R	3480	<i>Insulin Like Growth Factor 1 Receptor</i>	0,36	1,000
RELA	5530	<i>RELA Proto-Oncogene, NF-KB Subunit</i>	0,28	1,000
PIK3R1	5295	<i>Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1</i>	0,07	0,439

Nos genes com expressão aumentada no grupo câncer, encontra-se o IGF1R e o IGF1, com valor de *fold change* 0,36 e 18,10 respectivamente. A expressão destes dois genes, assim como dos restantes encontrados na tabela 7, não foi estatisticamente significativa. Na figura 10 se encontra a representação gráfica dos resultados de expressão gênica, dispostos em RQ log2, do gene menos expresso ao gene mais expresso no câncer de endométrio em relação ao grupo controle.

Os genes que não apresentaram expressão em nenhum dos grupos estão representados na tabela 8. Entre todos os genes analisados, somente o *SLC2A4* não teve expressão em nenhuma amostra dos grupos analisados. Este gene é membro da família do *SLC2A*, que codifica o transportador de glicose GLUT4, importante no mecanismo da glicólise. Este gene não é muito estudado no âmbito do endométrio e, dos artigos consultados, todos indicam expressão reduzida no endométrio. Em consequência disso, é possível que a amplificação gênica tenha sido ineficaz.

Tabela 8. Genes que não apresentaram expressão em nenhum dos grupos

Gene	ID	Nome do gene
SLC2A4	6517	Solute Carrier Family 2 Member 4

Ainda, no ensaio foram encontrados genes em que não foi possível a análise devido à falta de expressão homogênea, isto é, genes que não amplificaram em todas as amostras do estudo. Eles estão apresentados na tabela 9. Foram eles: AKT3, CACNA1F, CACNA1G, CACNA1S, CAMK2A, CAMK2B, CAMK2G, CAMK4, CASP9, CHUK, EIF2B1, GRB2, ITPR1, MAPK1, MEF2A, NFATC4, PLCE1, PTEN e REL.

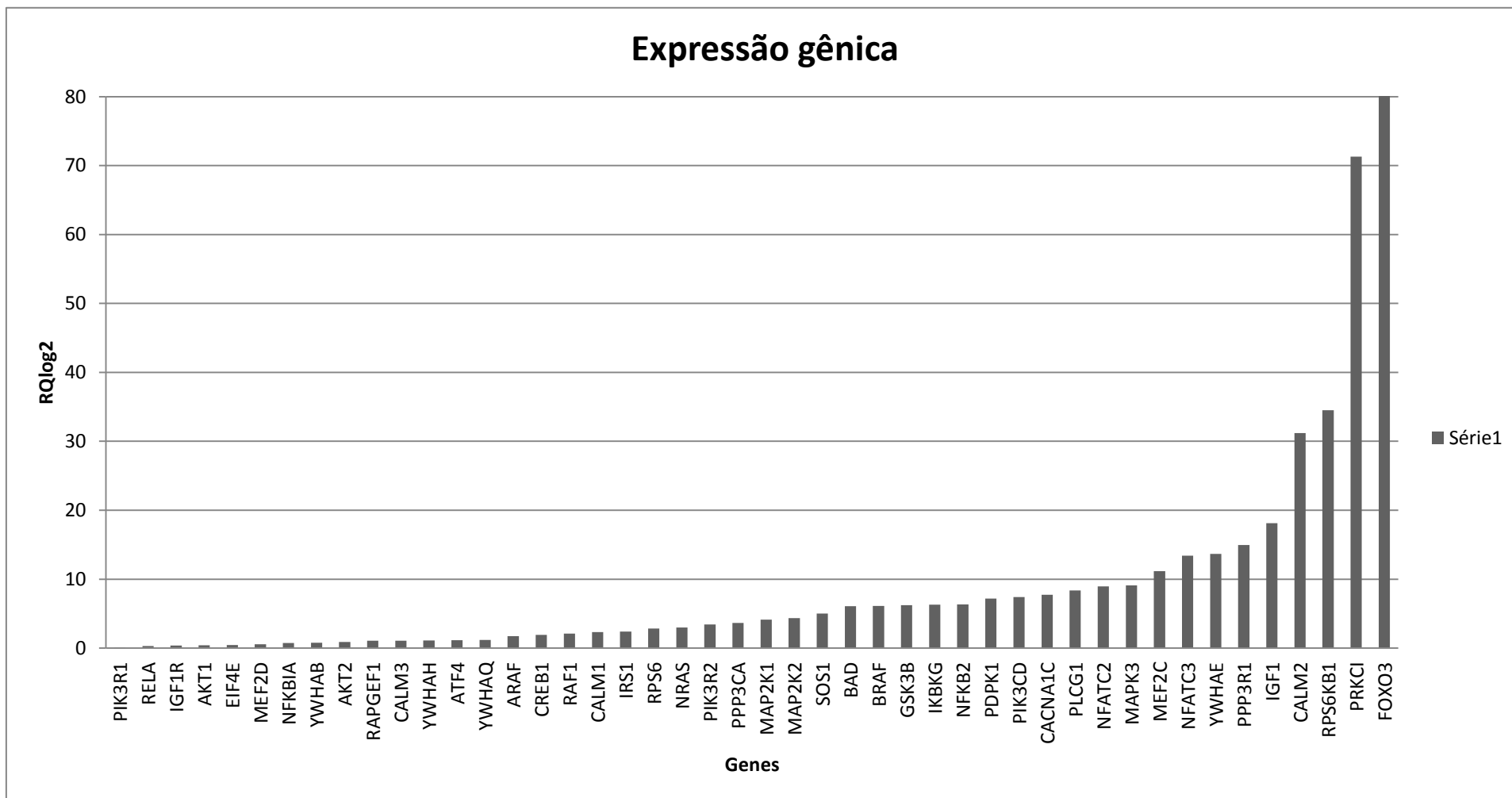


Figura 10. Resultado da expressão gênica apresentados em RQlog2. A expressão do mRNA dos genes de interesse foi normalizada pelo gene *GAPDH*. Valores positivos representam expressão aumentada no grupo câncer em relação ao grupo controle.

Tabela 9. Genes em que não foi possível realizar a análise estatística.

Gene	ID	Nome do gene
AKT3	10000	Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase II Alpha
CACNA1F	778	AKT Serine/Threonine Kinase 3
CACNA1G	8913	Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 F
CACNA1S	779	Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 G
CAMK2A	815	Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 S
CAMK2B	816	Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase II Beta
CAMK2G	818	Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase II Gamma
CAMK4	814	Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase IV
CASP9	842	Caspase 9
CHUK	1147	Conserved Helix-Loop-Helix Ubiquitous Kinase
EIF2B1	1967	Eukaryotic Translation Initiation Factor 2B Subunit Alpha
GRB2	2885	Growth Factor Receptor Bound Protein 2
ITPR1	3708	Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptor Type 1
MAPK1	5594	Mitogen-Activated Protein Kinase 1
MEF2A	4205	Myocyte Enhancer Factor 2 ^a
NFATC4	4776	Nuclear Factor Of Activated T-Cells 4
PLCE1	51196	Phospholipase C Epsilon 1
PTEN	5728	Phosphatase And Tensin Homolog
REL	5966	REL Proto-Oncogene, NF-KB Subunit

Análise proteica da via de sinalização do IGF1R

Foi realizada a técnica de imunohistoquímica para as proteínas IGF1, p-IGF1R β e IR para análise da expressão proteica das mesmas amostras utilizadas para

expressão gênica. Foi analisada a intensidade (+1, +2 ou +3) da marcação, porcentagem de células marcadas e localização (nuclear ou citoplasmática) de cada anticorpo. A descrição dos resultados está disposta na tabela 10.

Tabela 10. Relação da intensidade da marcação nos grupos controle e câncer, e porcentagem de células epiteliais positivas para cada anticorpo.

Anticorpos	Grupo controle	Grupo câncer
IGF1	+1 (60%)	+1 (100%)
p-IGF1R β	+3 (60%)	+2 (90%)
IR	+2 (70%)	+1 (95%)

Para todos os anticorpos, a marcação foi predominantemente citoplasmática, conforme já descrito por alguns estudos, por se tratar de receptores de membrana, com domínios intracelulares. Por esta razão, só foi analisada a porcentagem de células glandulares (epiteliais) com o citoplasma imunorreativo. O IGF1 teve intensidade +1 tanto no grupo controle quanto nos casos, em relação ao controle positivo utilizado. No entanto, 60% das células epiteliais do tecido normal foram positivas, enquanto 100% das células epiteliais do carcinoma endometrial apresentaram positividade para o IGF1. O IGF1R β (subunidade onde se localiza o domínio tirosina quinase) analisado foi o fosforilado, e demonstrou intensidade +3 no grupo controle, com 60% das células epiteliais positivas e +2 no grupo câncer, com mais de 90% de células marcadas. Por fim, analisamos também o receptor de insulina nos dois grupos, sendo que nos controles apresentou intensidade +2, com aproximadamente 70% de células marcadas e nos casos teve predominância de intensidade +1, com 95% de positividade. As imagens obtidas estão na figura 11.

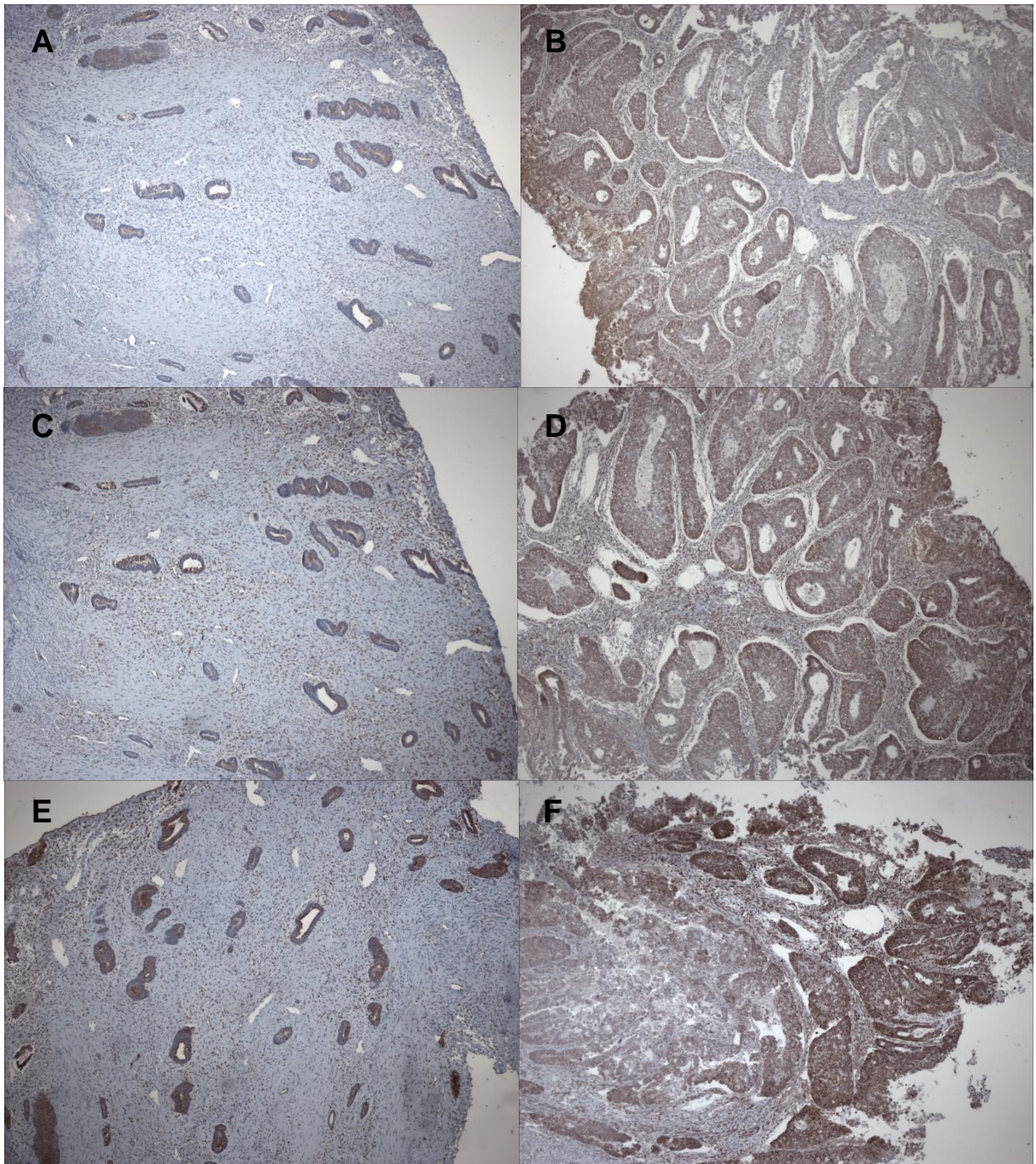


Figura 11: Imagens de imunohistoquímica 400x. Coluna da direita (A, C, E) trata-se dos controles e coluna da esquerda (B, D, F) é a representação dos casos. (A e B) marcação para IGF1; (C e D) marcação para p-IGF1R β ; (E e F) marcação para IR.

Análise da rede de sinalização pelo *String*

Com o objetivo de compreender melhor a interação dos produtos dos com expressão somente no grupo câncer e aqueles com expressão aumentada, utilizamos a plataforma online *String*. Esta base de dados permite criar uma rede de acordo com dados disponíveis de revisões, experimentos, bases de dados, fusão de genes, vizinhança, co-expressão e co-ocorrência no PubMed. Na análise feita, optamos por confiança de 0,90 e selecionamos as ações moleculares entre as proteínas - ativação, ligação, inibição, catálise, fenótipo, reação, modificações pós-traducionais ou regulação transcricional, com efeito positivo, negativo ou não especificado.

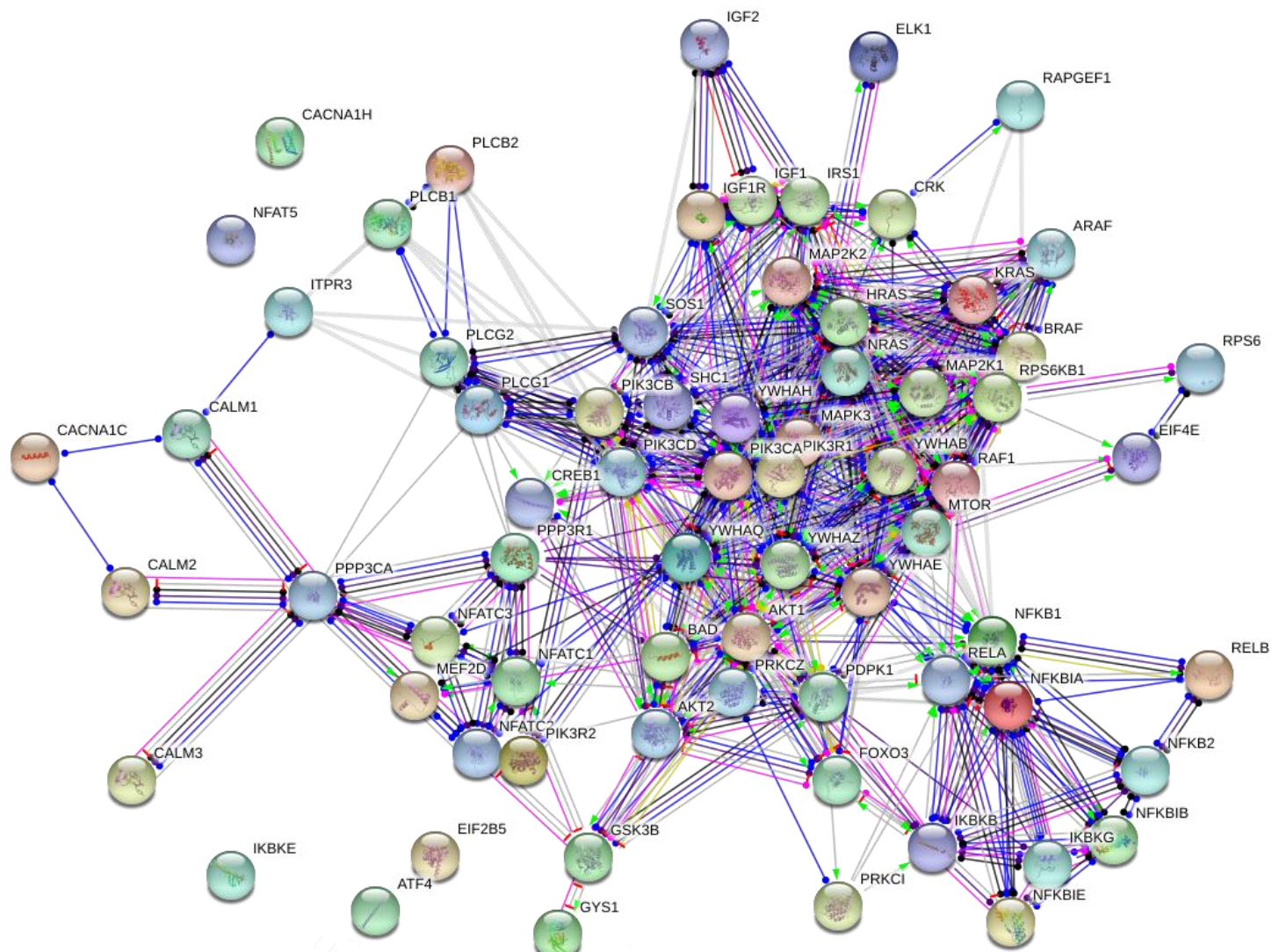
Ao todo, foram inseridas 71 proteínas na análise e obtivemos as interações dispostas na figura 12. O IGF1R (centro da análise) mostrou um maior volume de interações com o IGF1, IRS1 e PIK3R1 e, em segunda circunstância, com a MAPK3, SHC1, PIK3CA, SOS1 e CRK.

Em análise, na figura 13, estão dispostas interações nesta mesma rede, mas com enfoque em 4 processos biológicos disponibilizados pela própria plataforma - via de sinalização do receptor da insulina, resposta à insulina, ligação ao receptor do IGF1 e ligação ao receptor da insulina. Das 71 proteínas, apenas 31 tiveram suas interações destacadas como as mais próximas destes processos. Algumas proteínas demonstraram estar envolvidas em todos os processos - IGF2, IRS1, SHC e PIK3R1.

Análise da funcionalidade dos produtos gênicos

Foram analisados os 4 genes mais expressos no grupo câncer, em relação ao grupo controle - *FOXO3*, *PRKCI*, *RPS6KB1* e *CALM2*. Utilizamos as bases de dados *Gene* NCBI e *Ensembl* para inferir as funções principais destes 4 genes e obter informações gerais sobre suas sequências.

Figura 12. Rede de interações proteína-proteína construída na plataforma *String* (<https://string-db.org/>) com o nível de confiança 0,90 e no máximo 5 interações.



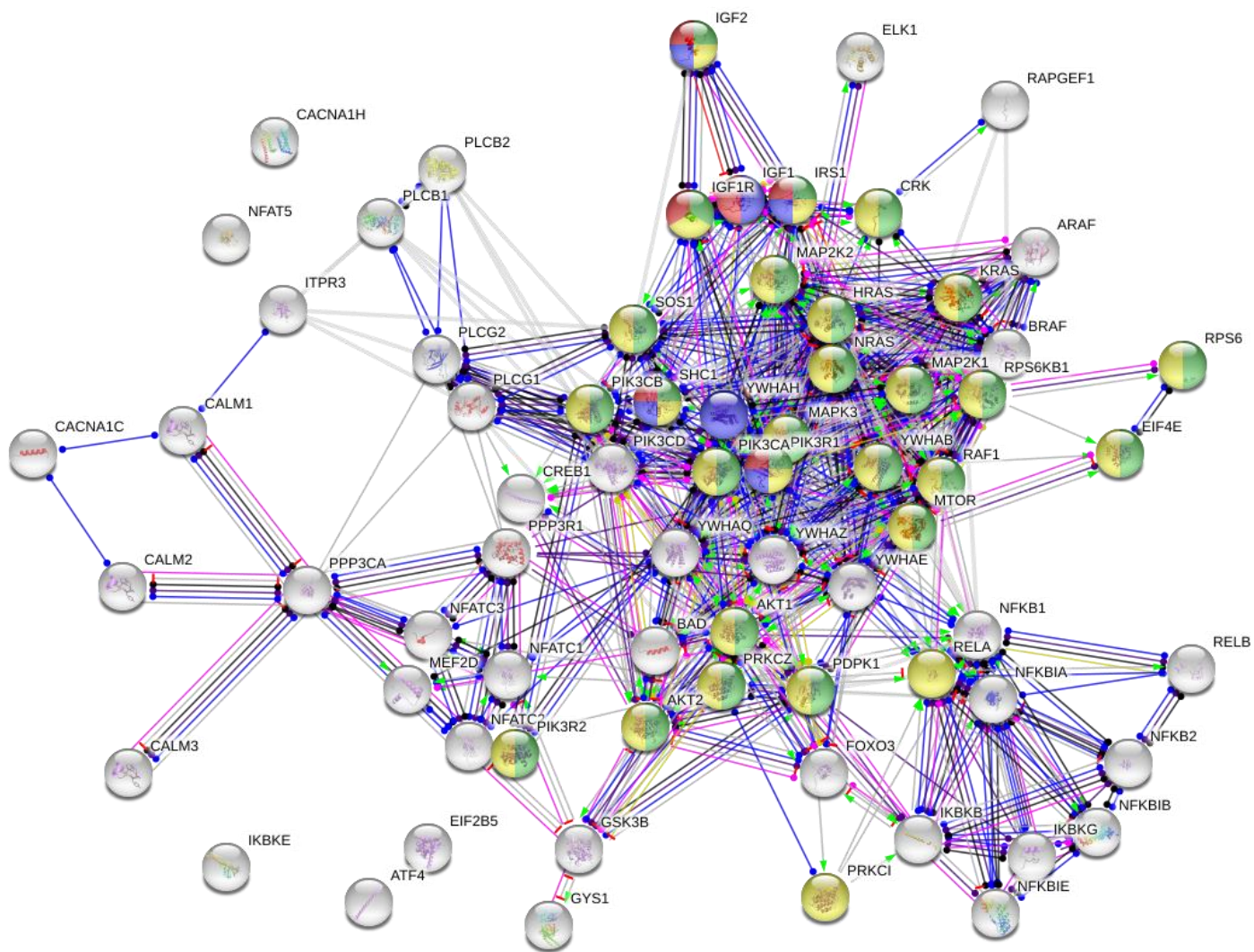
Tipos de ação

- Ativação
- Ligação
- Fenótipo
- Reação

Efeitos da ação

- Inibição
- Catálise
- Modificações pós-traducionais
- Regulação transcricional
- Positiva
- Negativa
- Não especificada

Figura 13. Rede de interações proteína-proteína construída na plataforma *String* (<https://string-db.org/>) com destaque das proteínas envolvidas na via de sinalização do receptor da insulina e receptor do IGF1.



Processo Biológico

- Via de Sinalização do Receptor de Insulina
- Resposta à insulina
- Ligação ao Receptor do IGF1
- Ligação ao Receptor de Insulina

No TCGA, um dos cânceres que foi escolhido para análise foi o de endométrio. O estudo envolvendo o câncer de endométrio no TCGA está disposto com a identificação (ID) TCGA-UCEC e o nome *Uterine Corpus Endometrial Carcinoma*. No projeto, foram descritos 4 subtipos de câncer de endométrio bem definidos e que apresentam prognósticos diferentes - POLE Ultramutado, Hipermutado com Instabilidade dos Microssatélites, Número de Cópias Baixo e Número de Cópias Alto (pior prognóstico). Além disso, eles caracterizaram as diferenças entre o carcinoma endometriode (número de cópias mais baixo, pouca mutação em *TP53* e mutações frequentes no *PTEN* e no *KRAS*) e carcinoma seroso (mutações frequentes no *TP53*, número de cópias extensivo e algum grau de metilação do DNA); e provaram que alguns tumores endometrioides desenvolveram padrões parecidos com os tumores serosos.

FOXO3

O *FOXO3*, *forkhead box O3* (também chamado de FOXO2, Af6q1, FKHRL, FOXO3A e FKHRL1P2) é um gene codificador de proteínas e se encontra localizado no cromossomo 6, braço q21. Durante o *splicing* alternativo são produzidas três variantes (FOXO3-202, 201 e 203), com número total de pares de bases diferentes entre si. Ele é bastante conservado nas espécies com genoma mais próximo ao ser humano (chimpanzés, macacos Rhesus, cães, ratos, zebrafish e outros), tem 103 ortólogos, 8 parálogos e 34 fenótipos. O endométrio é o 6º tecido (dos que foram analisados) com maior expressão do *FOXO3*. Alguns dos principais processos biológicos que está envolvido são a regulação negativa da transcrição pela RNA polimerase, regulação da apoptose e homeostase da glicose. Também está envolvido com o envelhecimento, maturação oocitária, resposta ao estresse oxidativo e manutenção de células-tronco neuronais, entre outros.

Os dados do TCGA apontam cerca de 176 casos com 194 mutações no gene *FOXO3*, em 22 tipos de câncer. A maioria dos casos afetados por mutações neste gene foi no câncer de endométrio (49 casos e 72 mutações). Dados do cBioPortal indicam que, de 547 casos de câncer de endométrio analisados, 3 apresentaram amplificação do número de cópias do gene, 2 apresentaram mutação missense, 4

demonstraram *downregulation* dos níveis de mRNA, 13 demonstraram um aumento da expressão da proteínas, enquanto que 8 tiveram diminuição dos níveis proteicos de FOXO3.

PRKCI

PRKCI (PRKC-lambda/iota, aPKC-lambda/iota, nPKC-iota ou DXS1179E), sigla para *Protein Kinase C Iota*, se encontra localizado no cromossomo 3, braço q26.2 e tem 4950 pares de bases. É um membro da família de quinases Ser/Thr da proteína quinase C (PKC), é cálcio e fosfolípídeo-dependente e necessário no processo em que ocorre resistência à apoptose induzida por drogas, mediada pelo BCL-ABL, na leucemia. Dos 7 variantes de *splicing* - *PRKCI*-201, 202, 205, 207, 203, 206 e 204, somente um (201) é codificador de proteínas, sendo que os restantes são íntrons retidos (processo de retenção de transcritos no núcleo celular). Tem cerca de 96 ortólogos e 11 parálogos, sendo bastante conservado em algumas espécies animais. No tecido humano normal se encontra mais expresso no estômago, tireoide, próstata e pulmões, onde cumpre funções de ligação ao ATP, ligação a íons e fosfolípídeos, e tem atividade de proteína quinase C e proteína quinase Ser/Thr. Os principais processos biológicos em que está envolvido são a organização de filamentos de actina e do citoesqueleto, migração celular, organização de junções célula-célula, transdução de sinais intracelulares, regulação negativa da apoptose, resposta celular à insulina, regulação positiva da entrada de glicose na célula, e estabelecimento de polaridade apical/basal na célula.

Dados do TCGA apontam aproximadamente 164 casos com 176 mutações no gene *PRKCI*, em 20 tipos de câncer. A maioria dos casos afetados por mutações neste gene foi no câncer de endométrio (40 casos e 51 mutações). Dados do cBioPortal indicam que, de 547 casos de câncer de endométrio analisados, 37 apresentaram amplificação do número de cópias do gene, 5 apresentaram mutação missense, 1 demonstrou *downregulation* dos níveis de mRNA, enquanto 4 demonstraram *upregulation* dos níveis de mRNA do *PRKCI*.

RPS6KB1

O gene *RPS6KB1* (*Ribossomal Protein S6 Kinase B1*) codifica uma proteína quinase Ser/Thr que responde à sinalização do mTOR a fim de promover a síntese proteica, crescimento e proliferação celular. Pode ser referido como S6K, PS6K, STK14A, p70- α , S6K- β -1 ou p70(S6K)- α , e está localizado no cromossomo 17, braço q23.1. Ele tem 2 pseudogenes relacionados, 12 transcritos (201 a 212), é conservado em algumas espécies animais e vegetais, existem 207 organismos com ortólogos ao gene humano e 14 parálogos. Dos 12 transcritos, 5 são codificadores de proteínas, 2 resultam em degradação mediada por mutações sem sentido e 5 que não são traduzidos (sendo íntrons retidos e transcritos processados). De modo geral, tem funções de ligação a moléculas de ATP (atividade de proteína quinase) e ligação a proteínas idênticas. Está envolvido em processos como a transição G1/S no ciclo celular (mitose), sinalização TOR, regulação negativa da apoptose, resposta a fatores de crescimento e ao estímulo da insulina, migração e proliferação celular, desenvolvimento de células-tronco, armazenamento e recuperação de memórias a longo-prazo e resposta comportamental ao medo.

Os dados do TCGA apontam 144 casos com 159 mutações no gene *RPS6KB1*, em 22 estudos. A maioria dos casos afetados por mutações neste gene foi no câncer de endométrio (55 casos e 74 mutações). Dados do cBioPortal indicam que, de 547 casos de câncer de endométrio analisados, 15 apresentaram amplificação do número de cópias do gene, 2 apresentaram mutação missense e 2 apresentaram mutação truncada, 2 demonstraram *downregulation* dos níveis de mRNA, enquanto que 1 demonstrou *upregulation* dos níveis de mRNA do *PRKCI*, 3 tiveram aumento dos níveis de proteína e 16 tiveram diminuição da expressão de proteína.

CALM2

A *CALM2* (*calmodulin 2*) - também caM, PHKD, CAMII, LQT15 ou PHKD2, é um gene da família das calmodulinas (existem 3 dispersos no genoma, com a mesma função porém com diferença nos seus nucleotídeos) e codifica uma proteína de ligação ao cálcio. Tem papel importante nas rotas de sinalização, progressão do ciclo celular e

proliferação. Localiza-se no cromossomo 2, braço p21, gera 9 transcritos - 4 codificadores de proteínas, 1 que sofre degradação devido a mutações sem sentido e 4 que não são traduzidos. Foram encontrados pseudogenes nos cromossomos 10, 13 e 17, tem ortólogos em 195 organismos distintos e 12 parálogos. Os tecidos em que é mais expresso incluem o cérebro, a glândula adrenal, os testículos e o cólon. As suas principais funções: ligação à adenilato ciclase, inibição de canais de cálcio, ligação a íons cálcio, ativação de fosfatases, entre outros; e está envolvido na via de sinalização de receptores acoplados à proteína G, detecção de íons cálcio, regulação (positiva e negativa) da fosforilação pela quinase peptidil-treonina, regulação positiva do processo metabólico de nucleotídeos cíclicos, regulação positiva da autofosforilação e desfosforilação de proteínas, regulação da contração cardíaca e do ritmo cardíaco.

Dados do TCGA apontam 59 casos com 47 mutações no gene *CALM2*, em 15 estudos. A maioria dos casos afetados por mutações neste gene foi no câncer de endométrio (25 casos e 22 mutações). Dados do cBioPortal indicam que, de 547 casos de câncer de endométrio analisados, 13 apresentaram amplificação do número de cópias do gene, 3 apresentaram mutação por deleção, 3 tiveram mutação missense e 2 demonstraram *downregulation* dos níveis de mRNA.

DISCUSSÃO

Este estudo consiste de uma análise ampla da via de sinalização do IGF1, mais especificamente de 92 genes *downstream* na via deste fator de crescimento, no câncer de endométrio. O câncer de endométrio é uma doença com incidência crescente e, tanto a sinalização do IGF1 quanto da insulina, têm sido relacionadas a este aumento de casos. O aumento destas proteínas é comum a duas condições - diabetes e obesidade, consideradas epidêmicas e emergentes em países desenvolvidos, onde a incidência do carcinoma endometrial é maior (Hernandez *et al.*, 2015).

Entre os marcadores moleculares sendo estudados no câncer de endométrio, se encontram os receptores de estrogênio e progesterona. Tumores positivos para o ER e PR representam, significativamente, uma melhor sobrevida (Binder e Mutch, 2014). Não só a sinalização do estrogênio, mas também outras vias metabólicas e hormonais desreguladas podem influenciar o endométrio. Uma das vias de sinalização muito desregulada no câncer de endométrio é a via do PI3K/Akt/mTOR. Esta via é responsável pela sinalização intracelular dos receptores com domínios tirosina quinase, incluindo o receptor do IGF1 e o receptor da insulina. Ela é influenciada negativamente pelo PTEN, que está geralmente inativo ou mutado no câncer de endométrio (Cheung *et al.*, 2011). Existe uma interferência entre a sinalização do estrogênio e a sinalização de rotas relacionadas à insulina e ao IGF1. O efeito mitogênico destas duas vias converge *downstream* na sinalização do Akt (Merritt *et al.*, 2016). Esta relação pode ter um papel importante na fisiopatologia do câncer de endométrio (Joehlin-Price *et al.*, 2016). Alguns alvos da regulação da transcrição gênica feita pelo estrogênio, no endométrio, são o IGF1, o PR e diversos outros fatores de transcrição. O aumento destes alvos leva ao início do ciclo celular, por intermédio de moléculas como as ciclinas (Shiozawa *et al.*, 2004). No ciclo normal do endométrio, os IGFs e as IGFBPs regulam o ciclo e a proliferação celular, mantendo estes parâmetros em um ponto fisiológico. Assim, o aumento do IGF1, dado pelo conjunto dos fatores de risco já mencionados (obesidade, diabetes e desregulação do sinal estrogênico), possivelmente promove a sobrevivência celular no câncer de endométrio (Mccampbell *et al.*, 2006).

Alguns dos fatores de risco para o aparecimento de tumores endometriais com evidências mais acentuadas são a obesidade, idade avançada, terapia estrogênica (com maior impacto na menopausa), diabetes, nuliparidade, história de infertilidade, entre outros (Berceanu *et al.*, 2016). A doença é atribuída à pós-menopausa, sendo menos comum em mulheres mais novas. Somente de 2 a 14% dos casos de câncer de endométrio ocorrem em mulheres com 40 anos ou menos. Quando isso acontece, geralmente é identificada uma fonte de excesso de estrogênio (semelhante ao que acontece em mulheres com síndrome de ovários policísticos - SOP) e, em menor proporção, alguma patogênese relacionada a danos no reparo do DNA e Síndrome de Lynch (Colafranceschi *et al.*, 1989; Duska *et al.*, 2001; Garg e Soslow, 2014). Desta forma, um dos critérios para a inclusão de pacientes na população deste estudo foi o estado hormonal delas. Foram incluídas mulheres na pós-menopausa nos dois grupos, negligenciando o fato do endométrio ser atrófico neste estado. Cerca de 50% dos endométrios atróficos na pós-menopausa apresentam algum grau de atividade proliferativa e angiogênica, de forma difusa ou local (Sivridis e Giatromanolaki, 2011; Campagnoli *et al.*, 2013).

A DMT2 é uma das patologias metabólicas em que os pacientes apresentam resistência à insulina, e é usado como parâmetro para predição de doenças cardiovasculares e câncer (Marín-Juez *et al.*, 2014). Nas últimas décadas, evidências epidemiológicas demonstraram que a diabetes e o câncer são condições comuns e, em muitos casos, são diagnosticados no mesmo indivíduo (Szablewski, 2014). Baseado nestas evidências e na observação de que algumas drogas usadas para tratar a hiperglicemia podem diminuir o risco de desenvolvimento do câncer, a DMT2 é considerada como um fator de risco para algumas neoplasias. Em um estudo de revisão feito por Barone e colaboradores, em 2008, foi constatado que, entre 20 tipos de câncer, a diabetes tem maior associação com o câncer de endométrio, de mama e câncer colorretal (Barone *et al.*, 2008). Assim, optamos por incluir no estudo pacientes com diagnóstico de câncer de endométrio e com DMT2 como comorbidade.

Alguns padrões reprodutivos são considerados fatores de risco no câncer de endométrio e estes incluem menarca precoce, menopausa tardia, infertilidade e

nuliparidade (Zucchetto *et al.*, 2009). Por outro lado, o uso de contraceptivos orais, paridade alta e última gestação tardia são considerados fatores protetores (Kalandidi *et al.*, 1996). Quanto mais cedo for a menarca, mais cedo iniciam-se os ciclos ovulatórios e a exposição do endométrio ao estrogênio que, juntamente com a menopausa tardia, faz aumentar a quantidade de ciclos ao longo da vida reprodutiva da mulher (Ali, 2014). No nosso estudo, provavelmente devido ao baixo número amostral, não foi possível observar a diferença dos parâmetros idade e idade da transição menopáusicas entre os grupos câncer e controle.

Outro fator já estabelecido como sendo de risco para o câncer de endométrio é o IMC. Esta relação é maior no carcinoma endometrial do que em outros tipos de câncer, com risco relativo de 1,59 a cada 5 kg/m² aumentados no IMC normal (Crosbie *et al.*, 2010). Em mulheres na pós-menopausa isto ocorre, principalmente, devido à aromatização de androgênios a estrogênio no tecido adiposo, que proporciona o aumento do estímulo promovido por este hormônio. Já em mulheres pré-menopáusicas, supõe-se que a obesidade leva ao hipogonadismo ovariano, juntamente com deficiência de progesterona, levando à tumorigênese (Calle e Kaaks, 2004). Também não foi possível constatar a influência do IMC no nosso trabalho, pois não houve diferença deste parâmetro entre os grupos de estudo.

Um estudo feito por Sadek, Cagampang e colaboradores em 2012, abordou a importância dos estudos de expressão gênica comparativa entre o endométrio normal e o tecido endometrial patológico. O endométrio sofre mudanças, ora cíclicas, na sua espessura e função, de acordo com o ambiente hormonal e sinalização de fatores de crescimento, fatores de sobrevivência e de morte celular programada. Estas mudanças só são possíveis devido a mudanças no perfil de expressão gênica das células que compõe este tecido, tanto em condições fisiológicas (ciclo menstrual, gravidez e entre outros) quanto em condições patológicas, exemplo da SOP, endometriose, menorragias, abortos recorrentes, hiperplasia e câncer (Sadek *et al.*, 2012).

Ayakannu e colaboradores (2015) avaliaram a estabilidade de alguns genes endógenos de referência em tumores endometriais em uma coorte constituída por mulheres em idade pós-reprodutiva. Este grupo analisou cerca de 32 genes potenciais

a melhores normalizadores, incluindo o *18S*, o *GAPDH*, o *GUSB* e o *HPRT1*, em endométrio não-neoplásico (atrófico, secretor e proliferativo) e nos cânceres endometriais do tipo 1 e tipo 2, utilizando os algoritmos geNorm^{PLUS}, NormFinder e BestKeeper. Dos resultados, o *18S* foi o gene considerado menos estável por ser um gene ribossomal e haver uma desproporção entre o rRNA (80%) e o mRNA (1-4%) e por verificar-se uma grande disfunção na maquinaria do rRNA no câncer de endométrio. Ainda, mostraram que, segundo o geNorm, os 6 melhores genes seriam: *IPO8* (importina 8), *PUM1* (*pumilio RNA binding family member 1*), *UBC* (ubiquitina C), *PGK1* (*phosphoglycerate kinase 1*), *MRPL19* (*mitochondrial ribosomal protein*) e *PPIA* (*peptidylprolyl isomerase A*); e segundo o NormFinder e o BestKeeper, o melhor gene normalizador seria o *MRPL19*, seguido do *PPIA* (Ayakannu *et al.*, 2015). Nenhum dos genes candidatos a normalizadores contidos no ensaio TaqMan® Array Human *IGF1R* Signaling, utilizado neste trabalho, foram considerados como sendo os mais estáveis no câncer de endométrio pelo estudo. Assim, foi escolhido o *GAPDH* como normalizador por apresentar maior estabilidade entre os genes candidatos a normalizador.

A sinalização do IGF1 é, sabidamente, um dos reguladores da morte celular programada, chamada de apoptose. Este processo requer regulação rigorosa através de fatores de crescimento, e o IGF1 se encontra envolvido na sua prevenção durante o crescimento tecidual normal, doenças ou estresse tecidual. Os efeitos biológicos do IGF1 e IGF2 são modulados pela sinalização do IGF1R, que inicia uma cascata de fosforilação através da sua atividade de tirosina quinase. Assim, os produtos destes genes estão implicados na homeostase tecidual, regulação da proliferação celular, diferenciação e migração durante o desenvolvimento e nos adultos (Applied Biosystems, 2014). A sinalização do IGF1R inicia quando os ligantes IGF1 e IGF2, importantes fatores de crescimento, interagem com este receptor na membrana plasmática. Esta interação leva à ativação do IRS1/2 e Shc, que posteriormente estimulam o crescimento e a proliferação celular, e inibem a apoptose, através das vias do PI3K/Akt e Ras/MAPK (Dai *et al.*, 2016). No endométrio normal, o *IGF1R* é mais expresso no citoplasma das células epiteliais e, em menos quantidade, nas células estromais (Zhou *et al.*, 1994). Em 2004, um estudo feito por Hirano e colaboradores,

demonstrou que o IGF1R (mRNA e proteína) é altamente expresso no carcinoma endometrial e tem valor prognóstico (Hirano *et al.*, 2004). Outro estudo feito por McCampbell e colaboradores, em 2006, comparou a expressão do IGF1R em endométrio normal, hiperplásico e neoplásico através da técnica de imunohistoquímica e observou que havia um aumento significativo dos níveis da proteína no carcinoma endometrial, em relação aos outros dois tecidos (Mccampbell *et al.*, 2006). Também, já foi demonstrado por Gielen e colaboradores (2005) que, em células de uma linhagem de carcinoma endometrial (ECC-1), a proliferação induzida pelo estrogênio ocorre através da sinalização do IGF1 (Gielen *et al.*, 2005). Até onde foi possível constatar, o nosso trabalho foi o primeiro a limitar a população de estudo em mulheres com câncer de endométrio, na pós-menopausa e com diabetes. Os nossos resultados de expressão gênica demonstraram que os níveis de mRNA do IGF1R estão aumentados no grupo câncer, em relação ao controle, mas não de forma exacerbada. Já os resultados de expressão proteica demonstraram um aumento acentuado dos níveis deste receptor, tanto nas células epiteliais quanto nas estromais, mas de forma difusa. A quantidade de transcritos pode ter sido regulada em consequência do aumento dos níveis de proteína IGF1R.

Shaffie e colaboradores, em 2016, demonstraram que há um aumento nos níveis de mRNA e de proteínas IGF1, PTEN e IGFBP1 no endométrio de mulheres (18 a 45 anos) com SOP e carcinoma endometrial, em relação ao endométrio normal (Shafiee *et al.*, 2016). Outro estudo analisou a expressão gênica do *IGF2* e *IGF1R* em endométrio normal, hiperplásico e neoplásico de mulheres entre 45 e 78 anos, e demonstrou o aumento destes genes no tecido maligno, em relação aos outros tecidos. Além disso, foi observado que estes níveis eram significativamente maiores nos cânceres em estágio III e IV, em relação aos estágios I e II. O estudo também analisou os níveis de proteína IGF1 e IGF1R, e atividade da telomerase e constataram que estavam aumentados nos tumores positivos para IGF2 (Pavelić *et al.*, 2007). Por outro lado, alguns estudos geram controvérsia por demonstrarem diminuição ou inalteração dos níveis plasmáticos ou celulares de IGF1, como por exemplo o estudo feito por Oh e colaboradores, em 2004, que comparou os níveis de IGF1, IGF2 e IGFBP3 em 80 mulheres com câncer de endométrio e 80 mulheres sem histórico de câncer. A média

dos níveis de IGF2 no plasma das mulheres com câncer foi significativamente maior que nos controles, no entanto se observou o contrário nos níveis médios plasmáticos de IGF1 e IGFBP3 (Oh *et al.*, 2004). No nosso estudo, o IGF2 foi um dos genes expressos somente nos casos e o IGF1 apresentou expressão 18,10-*fold* maior no grupo câncer, em relação ao grupo controle. Os níveis proteicos do IGF1 foram consideravelmente maiores nos tecidos de câncer de endométrio (100%) do que nos controles (60%), mostrando a provável sinalização exacerbada deste fator. Ainda não se encontra bem esclarecido o papel do IGF2 na tumorigênese do câncer de endométrio, mas supõe-se que esteja envolvido na manutenção do fenótipo maligno (aumento da proliferação e diminuição da taxa de apoptose), através da estimulação autócrina do IGF1R (Pavelić *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2014).

Em mamíferos, o gene *SHC1* codifica 3 proteínas adaptadoras - p46, p52 e p66. Alguns estudos sugerem que esta família de proteínas promove atividade proliferativa, mitogênica e anti-apoptótica. O membro mais estudado é o p66 e é comprovado que ele está geralmente mais expresso em células epiteliais, sendo que a expressão aberrante pode estar associada com alguns tipos de câncer (câncer de mama, próstata e colorretal, por exemplo) (Davol *et al.*, 2003; Grossman *et al.*, 2007; Pomerleau *et al.*, 2014). Assim, o p66 apresenta-se como um potencial alvo de estudo para entender a fisiopatologia do câncer. Zhang e colaboradores, em 2015, fizeram o silenciamento da proteína p66 em uma linhagem de câncer de cólon (HCT8) e isso levou à inibição da viabilidade celular, provavelmente pela via do PI3K/Akt/Mdm-2/p53 (Zhang *et al.*, 2015). Alterações neste gene ainda não se encontram descritas no câncer de endométrio, mas por se tratar de um dos componentes da via da sinalização do IGF1R e IR, ele foi analisado no nosso ensaio e demonstrou estar expresso só no grupo câncer. Portanto, até onde sabemos este estudo é o primeiro a demonstrar uma relação entre este gene e câncer de endométrio. Da mesma forma, foi analisada a expressão do IRS1, que age *downstream* na via da sinalização do IGF1R e do IR, e observamos que ele está aumentado 2,40-*fold* no câncer de endométrio. Além de ter expressão aumentada em várias neoplasias, o IRS1 medeia mecanismos de resistência a drogas utilizadas para tratamento do câncer, está envolvido com a mobilidade celular e aparecimento de metástases (Reuveni *et al.*, 2013). Frente à estimulação por fatores de crescimento, a

subunidade p85 do PI3K se liga ao IRS1, ativando a sua própria atividade kinase e convertendo PIP2 (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato) em PIP3 (Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato). Por sua vez, o PIP3 recruta proteínas como a Akt e PDK1 para a membrana celular, e estas moléculas fosforilam proteínas (exemplo da Mdm-2 e GSK3 β) que são responsáveis pela transcrição gênica (Hao *et al.*, 2014). McCampbell e colaboradores, em 2010, demonstraram que, nos estágios iniciais do desenvolvimento da hiperplasia endometrial, há perda da inibição do IRS1 e esse mecanismo é promovido pela ativação excessiva do mTOR, levando à progressão da hiperplasia até o desenvolvimento do câncer (Mccampbell *et al.*, 2010).

Dos 92 genes avaliados, alguns já são reconhecidos como participantes no desenvolvimento dos tumores endometriais, como por exemplo a via PI3K/Akt/mTOR e Ras/MAPK. Os produtos destes genes fazem parte da grande família das tirosinas quinases e têm como uma das funções principais a regulação da transcrição gênica, sobrevivência e morte celular, metabolismo e organização do citoesqueleto celular. Ademais, as vias da Akt e da MAPK estão frequentemente mutadas no câncer, em que o crescimento e a sobrevivência das células cancerígenas vão depender, em parte, da sinalização aberrante dessas vias (Aksamitiene *et al.*, 2012). Dentro da via, avaliamos a expressão dos genes *PIK3-CA*, *CB*, *CD*, *R1* e *R2*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *MAPK1* e *MAPK3*, *IRS1*, *AKT-1*, *2* e *3*. Destes, o *MAP2K1* e o *AKT3* não tiveram seus perfis de expressão avaliados, pois não tiveram expressão homogênea em todos os grupos. O *PIK3CA* e o *PIK3CB* estavam expressos somente no câncer de endométrio. O restante dos genes teve expressão maior no grupo câncer, em comparação com o grupo controle.

A via de sinalização da MAPK pode ser ativada por vários estímulos, fatores de transcrição e enzimas. Ela influencia a expressão gênica, o metabolismo, divisão celular, morfologia e sobrevivência da célula. Nesta via existem 3 efetores - MAP3K (ou MAPKKK), MAP2K (MAPKK) e MAPK, que podem ser atenuados por fosfatases (MAKPs ou DUSP). Existem três vias mais importantes da MAPK, que são a via das quinases controladas por sinalização extracelular 1 e 2 (ERK1/2), quinases c-Jun-N-terminal (JNKs) e *p38* (Slattery *et al.*, 2012). Em câncer de endométrio, ovário e mama,

a via da MAPK é ativada por estímulos mitogênicos de fatores de crescimento (por exemplo IGF e EGF) e esteroides sexuais, nomeadamente estrogênio e progesterona (Lee *et al.*, 2000). Li e colaboradores, em 2015, inibiram a MAPK em linhagens de câncer endometrial - HEC-1B e Ishikawa, com um inibidor específico (U0126), e viram que diminuiu a expressão de alguns marcadores da transição epitelial-mesenquimal (EMT) (Li *et al.*, 2015). Em mamíferos, existem dois genes que codificam a MAPKK, que são a MAP2K1 e MAP2K2. Esta quinase tem dupla especificidade, podendo agir tanto como tirosina quinase quanto como quinase Ser/Thr. Em ratos, a perda de função da MAP2K1 leva à morte embrionária, enquanto que a MAP2K2 mutante resulta em duração normal da vida dos animais, levando à premissa de que a MAP2K1 pode suprimir a perda de função do seu homólogo (Nadeau *et al.*, 2009). No nosso estudo, não foi possível avaliar a expressão da MAP2K1. A MAP2K2, MAPK1 e MAPK3 tiveram, respectivamente, um aumento de 4,34-fold, 4,14-fold e 9,10-fold no câncer de endométrio, corroborando com os estudos que indicam este aumento.

O PI3K (também conhecido como p110 α) tem um papel crucial na proliferação, sobrevivência e motilidade celular. Os membros desta família estão classificados em 3 grupos. Os de classe I são heterodímeros que consistem de uma subunidade catalítica p110 (α , β e δ) e uma subunidade regulatória p85. A subunidade p85 modula a atividade, estabilidade e localização da enzima. Esta subunidade se refere coletivamente às subunidades p85 α , p85 β e p55 γ , codificadas respectivamente pelos genes *PIK3R1*, *PIK3R2* e *PIK3R3*. As classes II e III têm apenas uma subunidade catalítica (Hao *et al.*, 2014). Há mais de uma década, Samuels e colaboradores viram que o *PIK3CA* está amplamente mutado em diversos cânceres, incluindo câncer cerebral, de mama, gástrico, pulmonar e de cólon. Sugeriram que este gene funciona como oncogene quando mutado (Samuels *et al.*, 2004). Dados apresentados pelo TCGA mostram que o *PIK3CA* é o oncogene que mais sofre mutações em cânceres humanos. Wang e colaboradores sugeriram que o *PIK3CA* está mutado em até 39% dos casos de câncer de endométrio do tipo endometrióide. Foram descobertas mutações múltiplas na via do PI3K e estas incluem, também, mutações no *PIK3R1* e *PIK3R2*, no *PTEN* e na *KRas* (Weigelt *et al.*, 2013). Cheung e colaboradores, em 2011,

demonstraram existir múltiplas mutações nos genes *PIK3R1* e *PIK3R2*, que resultam em ganho de função e, possivelmente, em desestabilização do *PTEN* através da disrupção da homodimerização da subunidade p85 α das enzimas. Estes autores sugeriram que a interação entre o *PTEN* e a p85 α seja importante no câncer humano, incluindo na patogênese do câncer de endométrio, e que pode ser um alvo terapêutico (Cheung *et al.*, 2011). A expressão aumentada dos genes *PIK3CA*, *PIK3CB*, *PIK3CD*, *PIK3R1* e *PIK3R2* neste trabalho corroboram com as hipóteses apresentadas por estes estudos e podem indicar o aumento da atividade proliferativa por meio desta via, conforme descrito no câncer de endométrio.

A da sinalização da Akt, participante da via do PI3K, parece estar desregulada em todos os tipos de câncer de endométrio e isso está implicado em um fenótipo mais agressivo (Nout *et al.*, 2012). Ainda, evidências demonstraram que a via PI3K/Akt/mTOR tem papel central no mecanismo da EMT, além do papel na proliferação e sobrevivência celular já conhecido (Larue e Bellacosa, 2005). Um estudo demonstrou que a *AKT1* e *AKT2* estavam superexpressos nas células de linhagens celulares de carcinoma endometrial ECC-1 e Ishikawa, enquanto que a *AKT3* estava deletado na duas linhagens. Já na linhagem AN3CA, a *AKT1* e a *AKT3* também estavam deletados (Wang *et al.*, 2010). O aumento da expressão da *AKT1* e *AKT2* neste trabalho pode estar relacionado ao aumento da atividade da via PI3K/Akt/mTOR mediada pelos receptores da insulina e do IGF1.

A atividade do mTOR tem sido abordada no câncer endometrial. Ele é uma subunidade catalítica de dois complexos moleculares distintos, mTORC1 e mTORC2. O mTORC1 afeta a proliferação celular ao mediar a biogênese ribossomal, a tradução e síntese de proteínas e inibir a autofagia (Kim *et al.*, 2002). A sinalização do mTORC2 é menos estudada, mas sabe-se que participa da organização do citoesqueleto e ativação da Akt (Jacinto *et al.*, 2004). A via da PI3K/Akt pode ser um alvo terapêutico, através da observação dos efeitos da inibição do mTOR pela rapamicina. Diversas outras drogas inibidoras do mTOR têm entrado em estudos clínicos para tratamento do câncer de endométrio (Yap *et al.*, 2008). Um derivado oral da rapamicina (Everolimus) já teve efeito inibitório da proliferação e crescimento tumoral demonstrado *in vitro* e *in*

vivo, e mostrou resultados satisfatórios em pacientes com carcinoma endometrial progressivo ou recorrente (Beuvink *et al.*, 2005). No nosso trabalho, o *mTOR* se mostrou expresso somente no grupo câncer. Isto pode indicar que a proliferação excessiva observada nos tumores endometriais também seja influenciada pela ativação da Akt.

O *PTEN* é um gene supressor tumoral que codifica uma enzima (fosfatase), com esta atividade tanto para lipídeos como para proteínas, e responsável por regular a divisão celular em todos os tecidos. O produto deste gene previne o crescimento e a divisão rápida ou de forma descontrolada e há evidências de que também controla a migração, adesão em outros tecidos e angiogênese (*Gene NCBI*). Este gene se encontra intermitentemente deletado ou mutado em muitos tipos de câncer, incluindo o carcinoma endometrial. A inativação do *PTEN* no câncer de endométrio por ocorrer por perda alélica ou por mutações pontuais, que levam à diminuição da sua expressão (Shanmugapriya *et al.*, 2017). Já foi reportado que cerca de 85% dos carcinomas endometriais e 55% das lesões pré-cancerígenas têm alterações do *PTEN*. A atividade de fosfatase em lipídeos causa parada do ciclo celular no ponto de checagem G1/S. A regulação positiva de mecanismos pró-apoptóticos que envolvem a Akt é mediada pelo *PTEN*, assim como a regulação negativa de mecanismos apoptóticos através da Bcl-2 (Kurose *et al.*, 2001). A ação do *PTEN* se opõe àquela da *PI3KCA* no controle dos níveis de Akt fosforilada, e mutações neste gene levam ao aumento da atividade do *PI3KCA* (Boruban *et al.*, 2008). Já a atividade de fosfatase em proteínas está envolvida com a inibição da adesão focal e a migração celular, assim como da sinalização da *MAPK* proporcionada por fatores de crescimento (Bansal *et al.*, 2009). Não foi possível analisar a expressão do *PTEN* neste estudo pois, em algumas amostras, não houve amplificação do mRNA. Isso pode ter ocorrido devido à variabilidade entre as pacientes utilizadas no estudo. No entanto a perda ou alteração do *PTEN* no câncer de endométrio pode levar à proliferação celular excessiva e diminuição da apoptose (Yang *et al.*, 2015).

O papel da *GSK3β* tem sido estudado em doenças neurodegenerativas (esclerose múltipla e doença de *Alzheimer*), na resposta inflamatória e em alguns tipos

de câncer (Lappas, 2014; Ma, 2014; Remsing Rix *et al.*, 2014). Esta enzima já é estabelecida como regulador negativo da via Wnt/ β -Catenina. A GSK3 β está envolvida com a proliferação e motilidade de diversos tipos de células, nomeadamente células da microglia, mastócitos, células tronco epidermais e células de câncer de mama (Lapid *et al.*, 2013). Encontramos a GSK3 β aumentada em 6,21-*fold* no câncer de endométrio, ele pode estar agindo como um oncogene e promovendo a sobrevivência celular. Em um estudo feito por Chen e colaboradores (2016), foi demonstrada a superexpressão da GSK3 β em tecido de câncer de endométrio e que ela está positivamente correlacionada com o estadiamento FIGO. Este grupo também fez silenciamento desta quinase através de transfecção com siRNA e isso levou à supressão da proliferação, migração e invasão celular, assim como ao aumento da apoptose, através da *downregulation* do NF κ B. Com estas evidências, afirmaram que a GSK3 β pode ser um novo alvo terapêutico no câncer de endométrio (Chen *et al.*, 2016). Yin e colaboradores testaram a inibição da GSK3 β com cloreto de lítio e o inibidor específico VIII em células de linhagem de câncer de endométrio e modelos *in vivo*. Estes inibidores provocaram efeitos citoestáticos e citotóxicos em diversas linhagens. Observaram que a inibição da GSK3 β levou à parada do ciclo celular na fase G2/M em linhagens equivalentes ao carcinoma endometrial do tipo I e tipo II e concluíram que a atividade da enzima está associada com a tumorigênese do câncer de endométrio (Yin *et al.*, 2013).

O NF κ B induz a transcrição gênica de canais de cálcio com papel importante na sobrecarga de Ca²⁺ citosólico, provocando a evasão de células malignas do efeito do estresse metabólico causado por medicamentos e da apoptose. Isso ocorre através da sinalização pela CaMK2 (*Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase II*), responsável pela indução de fatores anti-apoptóticos. Estas proteínas têm atividade dependente da calmodulina (CALM1, CALM2 e CALM3), que é um ligante do Ca²⁺ e serve de intermediário entre a proteína alvo de regulação e o cálcio. A calmodulina também tem o papel de modular a atividade de enzimas como quinases e fosfatases, podendo ser inibitório ou estimulatório. As células cancerígenas reprogramam o seu metabolismo, dependendo do microambiente a que são submetidas, através desta via, podendo ocorrer seleção de populações resistentes à apoptose (Park *et al.*, 2017).

Observamos um aumento da *NFKB2* (6,35-fold), *NFKBIA* (0,73-fold), *CALM1* (2,31-fold), *CALM2* (31,19-fold) e *CALM3* (1,07-fold). A subunidade *NFKB1*, o *NFKBIB* e *NFKBIE* foram expressos somente no câncer de endométrio. No entanto, não foi possível avaliar a expressão de nenhuma das isoformas da *CAMK2* contidas no nosso ensaio. Poucos estudos associam a sinalização desta proteína com o câncer de endométrio. Todavia, aqueles que encontramos, indicam que ela tem expressão aumentada no câncer de endométrio e, portanto, está correlacionada com o potencial maligno deste tumor (Takai *et al.*, 2009; Naz *et al.*, 2016) .

O *CRK* (Molécula adaptadora crk) codifica o c-CRK (ou proteína p38) que se liga a diversas proteínas fosforiladas por quinases, agindo em vias de sinalização de moléculas de adesão celular e fatores de crescimento e, de forma patológica, se encontra superexpressa em diversos tipos de câncer (exemplos: pulmão, ovários, glioblastoma e de mama) (Kumar *et al.*, 2017). No presente estudo, este gene apresentou expressão somente nas amostras de câncer. No entanto, encontramos apenas um estudo referente ao seu homólogo - CRKL, sendo associado ao câncer de endométrio. Os autores demonstraram que houve aumento da expressão da proteína CRKL em 50,5% (44 de 87) dos carcinomas endometriais estudados e que a sua superexpressão na linhagem celular Ishikawa inibiu a apoptose, com diminuição dos níveis das caspases 3 e 9 (Cai *et al.*, 2017).

Ainda, avaliamos os genes da via Ras-Raf, que são considerados oncogenes e já têm mutação reconhecida no câncer. O gene *RAF1*, também conhecido como c-Raf, codifica uma MAPK3 e está envolvido na sinalização ERK1/2, respondendo a fatores de crescimento e citocinas. A expressão alterada deste gene já foi observada em melanomas e câncer de pulmão (Fedorov *et al.*, 2003; Montagut *et al.*, 2008). Ainda não se encontra descrito o seu perfil de transcrição no câncer de endométrio, mas Wang e colaboradores descreveram a amplificação deste gene no genoma de 4 linhagens celulares de câncer de endométrio (entre 5 estudadas) e sugerem que ele tenha um papel importante na oncogênese neste tecido (Wang *et al.*, 2010). No nosso trabalho, ele demonstrou estar 2,10-fold aumentado no carcinoma de endométrio. As proteínas *BRaf* e *ARaf* também pertencem à família Raf de quinases Ser/Thr e podem

estar envolvidas na aquisição de fenótipo tumoral. Um estudo demonstrou que a BRAf se encontra ativada por mutações em vários tipos de câncer, mas com baixa prevalência no câncer de endométrio. No câncer de endométrio, essas mutações são mais encontradas em tumores hMLH1-negativos do que em positivos (Feng *et al.*, 2005). No estudo feito por Wang e colaboradores, é sugerido que ARaf participe como regulador negativo do metabolismo celular e viram que o gene estava deletado em quase todas as linhagens de câncer de endométrio que estudaram (Wang *et al.*, 2010). Em nossa população de estudo, estes dois oncogenes demonstraram expressão somente no grupo câncer. A superfamília Ras (pequenas GTPases), que inclui os oncogenes *HRas*, *KRas* e *NRas*, se encontra em todas as células animais e está implicada na transdução de sinais celulares. As vias das Ras incluem sinalização por fatores de crescimento extracelulares e vias clássicas intracelulares, como a do PI3K e da MAPK, com papel muito relacionado à atividade de reprogramação transcricional, sobrevivência celular, apoptose, coordenação de rotas metabólicas, promoção da proliferação e aquisição de invasividade. Estas características fenotípicas já se encontram descritas como essenciais para sobrevivência no câncer (Martinko *et al.*, 2018). As proteínas Ras fazem a comunicação da superfície celular com o núcleo através da ligação a moléculas efetoras em um loop específico, que por sua vez vão ativar vias de sinalização específicas. As vias Raf/MAPK e PI3K/Akt muitas vezes podem ser ativadas em simultâneo pelas proteínas Ras e acionar respostas celulares conflitantes como a proliferação, apoptose, parada do ciclo celular, diferenciação e senescência. O tipo de resposta vai depender do tipo celular, da duração e da força do estímulo externo (Ninomiya *et al.*, 2004). No presente estudo, o gene *NRas* demonstrou estar aumentado no câncer de endométrio, em relação ao endométrio normal, o *HRas* e *KRas* tiveram expressão somente no grupo câncer. Algumas evidências demonstraram que, *in vivo*, *KRas* recruta Raf1 para a membrana plasmática com mais eficiência e é um efetor mais potente que *HRas*. De forma diferente, *HRas* é um ativador mais potente do PI3K que *KRas* (Yan *et al.*, 1998). Supõe-se que a sinalização da Ras contribua para o desenvolvimento do câncer endometrial (Ninomiya *et al.*, 2004).

O ATF4 (*Activating Transcription Factor 4*) - ou CREB2, e o CREB1 (*CAMP Responsive Element Binding Protein 1*) fazem parte de uma família de proteínas que se ligam ao DNA, especificamente ao elemento responsivo ao AMPc (adenosina monofosfato cíclico), denominada CREB (*CAMP Responsive Element Binding*). Estas proteínas estão envolvidas em uma série de processos celulares como a migração celular, homeostase mitocondrial, proliferação e morte celular, além da transcrição celular (Gong *et al.*, 2017). Além destes processos, o aumento da expressão gênica conferido pela via do CREB tem papel importante no sistema nervoso central, pois regula a sobrevivência neuronal, a consolidação da memória e no refinamento da transmissão sináptica (Ali *et al.*, 2015). O ATF4 e o CREB1 apresentaram aumento nas amostras de câncer de endométrio estudadas, e provavelmente exercem influência na proliferação das células malignas. Em um estudo publicado em 2009 por Catalano e colaboradores, foi induzida a expressão de ciclina D1 e o aumento da proliferação celular em células da linhagem Ishikawa, através da leptina. Com um ensaio de imunoprecipitação, verificaram que o STAT3 (*signal transducers and activators of transcription 3*) e o CREB eram necessárias para isso (Catalano *et al.*, 2009).

O FOXO3 (*Forkhead Box O3*) é um fator de transcrição pertencente à família *forkhead box*, que controla funções intrínsecas da célula através da regulação da progressão do ciclo celular e resistência ao estresse. Esta proteína, juntamente com a GSK3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*), participa da via de sinalização do PI3K/Akt, *downstream* na rota do IGF1. Achados controversos indicam a alta expressão do FOXO3 como supressor tumoral (câncer de ovário e câncer de mama), enquanto outros lhe atribuem o papel de oncogene (leucemia mieloide), promovendo a sobrevivência de células cancerígenas (Fengxia *et al.*, 2016). Devido ao aumento de 81,60-fold do FOXO3 no câncer de endométrio neste estudo, supomos que este gene teve o papel de oncogene nas amostras estudadas. A família FOXO contém quatro membros - FOXO1 (previamente conhecido como FKHR), FOXO3 (ou FKHL1), FOXO4 (AFX) e FOXO6, além de algumas variantes de *splicing* pouco estudadas (Lam *et al.*, 2012). O FOXO1 é constitutivamente expresso no endométrio normal (epitélio e estroma), e a repressão da expressão do FOXO3a está relacionada com a transformação das células estromais endometriais em células decíduais. Em seres

humanos, o FOXO6 se encontra expresso somente no cérebro e o FOXO4 tem expressão no endométrio, mas sem função esclarecida (Brosens *et al.*, 2009). Em 2008, Goto e colaboradores analisaram 60 tecidos de câncer de endométrio provenientes de biópsias quanto aos níveis de proteína e mRNA do FOXO1. Eles viram que havia imunorreatividade para aproximadamente 80% dos tumores, mas os transcritos eram 6 vezes menos expressos no câncer de endométrio do que no endométrio normal, enquanto a expressão do FOXO3 e FOXO4 não foi diferente entre os tecidos (Goto *et al.*, 2008). Na análise feita do FOXO3 no câncer de endométrio pelo cBioPortal, observamos que a expressão gênica e proteica deste fator de transcrição apresentaram resultados variados, levando à conclusão de que ele deve ser mais estudado para elucidação do seu papel no câncer de endométrio.

O NFAT (Fator nuclear de células T ativadas) age como sensor de cálcio, integrador da sinalização do cálcio com outras vias envolvidas com o crescimento, resposta imune e resposta inflamatória. Os membros desta família codificam fatores de transcrição que se encontram constitutivamente ativados em vários tipos de câncer, onde ativam outras vias envolvidas no crescimento e progressão tumoral (Qin *et al.*, 2014). Em condições normais, os membros NFAT se localizam no citoplasma da célula, em um estado inativo (hiperfosforilado). Eles são ativados através de estímulos a receptores de células T (TCR), receptores tirosina quinase (RTKs) e receptores acoplados à proteína G. Isso leva à quebra de moléculas PIP2 e liberação de DAG (diacilglicerol) e IP3 (inositol trifosfato), induzindo a liberação de cálcio do retículo endoplasmático e abertura de canais de cálcio especializados na célula. O cálcio intracelular vai se ligar a moléculas de calmodulina que, por sua vez, se ligam à calcineurina e a ativam. A ativação da calcineurina leva à desfosforilação e translocação nuclear da NFAT, onde ela vai ter o efeito na transcrição gênica (Medyouf e Ghysdael, 2008). Existem 4 membros clássicos da família NFAT - NFAT- 1, 2, 3 e 4 que são responsivos ao cálcio, e 1 membro - NFAT5, que não necessita de ativação pela calcineurina (Pan *et al.*, 2013). Evidências levam à hipótese de que os genes NFAT estão relacionados ao crescimento e metástases no câncer. Especula-se que a baixa incidência de câncer em pacientes com Síndrome de Down pode estar associada ao aumento de 1,5-fold dos genes *DSCR1* (*Down syndrome critical region gene 1*) e

DYRK1 (Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A), que, em sinergia, inibem a sinalização calcineurina/NFAT (Arron *et al.*, 2006). Em nosso estudo, observamos que o NFAT5 e o NFATC1 (NFAT2) foram expressos só no câncer de endométrio, o NFATC3 (NFAT4) e NFATC2 (NFAT1) tiveram expressão aumentada no câncer em 13,39-*fold* e 8,96-*fold*, respectivamente. Ainda não é totalmente compreendido o mecanismo de ação destes fatores de transcrição no câncer, mas um estudo feito por Sales e colaboradores relaciona esta via ao aumento da taxa de crescimento celular no câncer de endométrio e atribui isso à *upregulation* do CXCL8 (interleucina 8) e IL-11 (interleucina 11) (Sales *et al.*, 2009).

A *PPP3CA (Protein Phosphatase 3 Catalytic Subunit Alpha)*, mais conhecida como calcineurina A, codifica uma proteína fosfatase (fosfatase-2B) e é dependente do Ca^{2+} /camodulina. O produto deste gene ativa o fator de transcrição NFAT e a expressão elevada já foi relacionada a eventos associados ao câncer, como a migração, invasão e adesão das células cancerígenas, com evidências em diversos tipos de câncer (Cadigan e Nusse, 1997). Em um estudo publicado em 2005 por Vellon e colaboradores, foi demonstrado que no câncer de mama o *PPP3CA* sofre *upregulation* em decorrência da sinalização da MAPK e do NF κ B, promovendo a sobrevivência celular e resistência à quimioterapia (Dolcet *et al.*, 2005). A *PPP3R1* (calcineurina B) codifica uma das isoformas da subunidade regulatória da fosfatase e é muito correlacionada com a progressão da doença de *Alzheimer* (Peterson *et al.*, 2014). Aqui, observamos aumento tanto do *PPP3CA* (3,64-*fold*) quanto do *PPP3R1* (14,97-*fold*), sugerindo que possivelmente tenham um papel na fisiopatologia do carcinoma endometrial. Ainda não é muito explorada a sinalização destas proteínas no câncer de endométrio.

A proteína quinase C, ou PKC/PRKC, pertence à família de proteínas quinases Ser/Thr e tem três classes de isoenzimas - clássica (α , β I, β II e γ), *novel* (δ , ϵ , θ , η , e μ) e atípica (ζ e ν / λ) (Qu *et al.*, 2016). A PRKCZ (ζ) e a PRKCI (ν / λ) são proteínas quinases atípicas, com papel fundamental na proliferação, diferenciação e carcinogênese, que podem agir como oncogenes (Lee *et al.*, 2013). Foi estudada a relação entre a PRKCZ e a DMT2 em um estudo de 2013. Viram que a PRKCZ contribui para esta doença e

está envolvida na sua patogênese, por participar na transmissão do sinal da insulina. Foi levantada a hipótese de que a hipermetilação da PRKCZ participar no estabelecimento e manutenção da diabetes (Zou *et al.*, 2013). Ainda, um estudo feito por Seto e Andrulis (2015), descreveu a PRKCZ como um potencial componente regulador da via de sinalização do IGF1R e sugeriu sua importância na tumorigênese no câncer de ovário (Seto e Andrulis, 2015). Foi observado o papel da PRKCZ na transdução de sinal em múltiplas vias, incluindo na ativação da cascata ERK/MAPK, sinalização da RPS6K e do NFkB e essa observação pode explicar como que esta enzima promove a carcinogênese (Hirai e Chida, 2003). A expressão PRKCI tem sido estudada no tecido de câncer prostático, mas os mecanismos pela qual ela se encontra envolvida na tumorigênese da próstata ainda não foi esclarecida (Campa *et al.*, 2012). Qu e colaboradores demonstraram que a PRKCI regula a autofagia negativamente através da via de sinalização PIK3/Akt/mTOR e sugeriram o tratamento de carcinomas com altos níveis de autofagia através desta proteína (Qu *et al.*, 2016). O aumento observado na expressão do mRNA da PRKCZ e PRKCI no câncer de endométrio provavelmente deve-se ao aumento da sinalização da PI3K/Akt/mTOR, promovida pelo IGF1R e IR.

A RPS6 é uma proteína ribossomal que compõe a subunidade 40S. Ela está *downstream* na via da mTOR como molécula efetora e é geralmente ativada em múltiplos cânceres. Esta proteína funciona como substrato para a RPS6KB1, uma proteína quinase Ser/Thr envolvida na regulação da proliferação celular, crescimento celular e síntese de proteínas (Zhang *et al.*, 2013). A fosforilação da RPS6 por esta enzima facilita a tradução de proteínas por aumenta a afinidade do ribossomo pelas TOP mRNA (oligopirimidina terminal 5') (Ruvinsky e Meyuhas, 2006). A RPS6KB1 é altamente expressa, por exemplo, no carcinoma escamoso de cabeça e pescoço, no câncer de próstata, câncer de pulmão e carcinoma hepatocelular e supõe-se que esteja implicada na predição do prognóstico (Li *et al.*, 2012; Chaisuparat *et al.*, 2013; Cai *et al.*, 2015). Os nossos resultados demonstram um aumento da expressão no grupo câncer tanto do RPS6 (2,85-*fold*) quanto no RPS6KB1 (34,50-*fold*), que pode indicar que esta via, juntamente com a do mTOR, está envolvida na tumorigênese do câncer de endométrio.

CONCLUSÃO

Nos últimos anos, muitos estudos têm focado em elucidar o papel da sinalização da insulina e do IGF1R no câncer de endométrio, a fim de propor o mecanismo da tumorigênese neste tecido e explicar as crescentes taxas de incidência da doença. Os resultados apontam que, por ser uma via mitogênica, a maioria dos genes contidos no ensaio *TaqMan® Array Human IGF1R Signaling* apresentaram expressão aumentada nas amostras de câncer de endométrio.

O objetivo de escolher um ensaio relativo à sinalização do IGF1R foi o de analisar um número maior de moléculas efetoras nesta via, que é um dos alvos de estudo no câncer de endométrio. O IGF1R pode estar sendo alvo de *downregulation* através de algum mecanismo influenciado pelo aumento dos níveis proteicos deste receptor.

Os 26 genes com expressão somente no câncer de endométrio - *CACNA1H, CRK, EIF2B5, ELK1, FRAP1 (MTOR), GYS1, HRAS, IGF2, IKBKB, IKBKE, ITPR3, KRAS, NFAT5, NFATC1, NFKB1, NFKBIB, NFKBIE, PIK3CA, PIK3CB, PLCB1, PLCB2, PLCG2, PRKCZ, RELB, SHC1* e *YWHAZ*, podem ser considerados como possíveis biomarcadores prognósticos para a doença em futuros estudos. Isso poderia ser útil para ajudar a avaliar a complexidade dos casos de câncer de endométrio e apoiar a escolha de intervenções terapêuticas.

Este estudo é um dos primeiros que descreve o aumento acentuado da expressão do gene *SHC1* no câncer de endométrio e apontou o seu possível papel nos mecanismos tumorigênicos na doença, dada a sua íntima relação com IGF1R. O produto deste gene participa da produção de uma resposta biológica à sinalização da insulina e do IGF1, através da ativação dos seus receptores.

Além disso, os genes *PRKCI* e *FOXO3*, ainda que não estejam bem descritos na literatura referente ao câncer de endométrio, foram os que apresentaram maior expressão neste tumor, em relação ao grupo controle. Eles podem ser candidatos para mais estudos, a fim de confirmar a sua participação no desenvolvimento desta neoplasia e averiguar a possibilidade de serem alvos terapêuticos.

REFERÊNCIAS

AARNIO, M. et al. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. **Int J Cancer**, v. 81, n. 2, p. 214-8, Apr 1999. ISSN 0020-7136. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10188721> >.

AIZEN, D. et al. Proliferative and signaling activities of insulin analogues in endometrial cancer cells. **Mol Cell Endocrinol**, v. 406, p. 27-39, May 2015. ISSN 1872-8057. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25697343> >.

American Joint Committee on Cancer. Cancer Staging Manual. <https://cancerstaging.org/references-tools/deskreferences/Pages/default.aspx>, 2016. Acesso em: 05.11.2017.

AKSAMITIENE, E.; KIYATKIN, A.; KHOLODENKO, B. N. Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. **Biochem Soc Trans**, v. 40, n. 1, p. 139-46, Feb 2012. ISSN 1470-8752. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22260680> >.

ALI, A. M. et al. Optogenetic Inhibitor of the Transcription Factor CREB. **Chem Biol**, v. 22, n. 11, p. 1531-1539, Nov 2015. ISSN 1879-1301. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26590638> >.

ALI, A. T. Reproductive factors and the risk of endometrial cancer. **Int J Gynecol Cancer**, v. 24, n. 3, p. 384-93, Mar 2014. ISSN 1525-1438. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24463639> >.

ALVINO, C. L. et al. Understanding the mechanism of insulin and insulin-like growth factor (IGF) receptor activation by IGF-II. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. e27488, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22140443> >.

AMADIO, G. et al. Emerging drugs for endometrial cancer. **Expert Opin Emerg Drugs**, v. 19, n. 4, p. 497-509, Dec 2014. ISSN 1744-7623. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25330855> >.

ARCIDIACONO, B. et al. **Insulin Resistance and Cancer Risk: An Overview of the Pathogenetic Mechanisms**. Exp. Diabetes Res. 2012 2012.

ARIMA, R. et al. Cause-specific mortality in endometrioid endometrial cancer patients with type 2 diabetes using metformin or other types of antidiabetic medication. **Gynecol Oncol**, v. 147, n. 3, p. 678-683, 12 2017. ISSN 1095-6859. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29054569> >.

ARRON, J. R. et al. NFAT dysregulation by increased dosage of DSCR1 and DYRK1A on chromosome 21. **Nature**, v. 441, n. 7093, p. 595-600, Jun 2006. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16554754> >.

AYAKANNU, T. et al. Validation of endogenous control reference genes for normalizing gene expression studies in endometrial carcinoma. **Mol Hum Reprod**, v. 21, n. 9, p. 723-35, Sep 2015. ISSN 1460-2407. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26124453> >.

BAKER, M. E. What are the physiological estrogens? **Steroids**, v. 78, n. 3, p. 337-40, Mar 2013. ISSN 1878-5867. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23313336> >.

BAKER, R.; GOVAN, D. The effect of hormonal therapy of prostatic cancer on serum aldolase. **Cancer Res**, v. 13, n. 2, p. 141-6, Feb 1953. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13042799> >.

BAKER, W. H.; KELLEY, R. M.; SOHIER, W. D. Hormonal treatment of metastatic carcinoma of the breast. **Am J Surg**, v. 99, p. 538-43, Apr 1960. ISSN 0002-9610. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13796040> >.

BANNO, K. et al. Carcinogenic mechanisms of endometrial cancer: involvement of genetics and epigenetics. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 40, n. 8, p. 1957-67, Aug 2014. ISSN 1447-0756. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25131761> >.

BANSAL, N.; YENDLURI, V.; WENHAM, R. M. The molecular biology of endometrial cancers and the implications for pathogenesis, classification, and targeted therapies. **Cancer Control**, v. 16, n. 1, p. 8-13, Jan 2009. ISSN 1526-2359. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19078924> >.

BARONE, B. B. et al. Long-term all-cause mortality in cancer patients with preexisting diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. **JAMA**, v. 300, n. 23, p. 2754-64, Dec 2008. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19088353> >.

BARTOSCH, C. et al. Human endometrium ultrastructure during the implantation window: a new perspective of the epithelium cell types. **Reprod Sci**, v. 18, n. 6, p. 525-39, Jun 2011. ISSN 1933-7205. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21421901> >.

BATTISTA, M. J.; SCHMIDT, M. Fulvestrant for the treatment of endometrial cancer. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 25, n. 4, p. 475-83, 2016. ISSN 1744-7658. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26882357> >.

BAXTER, R. C. Insulin-like growth factor binding proteins in the human circulation: a review. **Horm Res**, v. 42, n. 4-5, p. 140-4, 1994. ISSN 0301-0163. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7532612> >.

BEN, Q. et al. Diabetes mellitus and risk of pancreatic cancer: A meta- analysis of cohort studies. **European Journal of Cancer**, v. 47, n. 13, p. 1928-1937, 2011. ISSN 0959-8049.

BERCEANU, C. et al. Morphological, imaging and surgical aspects in endometrial endometrioid adenocarcinoma. **Rom J Morphol Embryol**, v. 57, n. 3, p. 995-1002, 2016. ISSN 1220-0522. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28002515> >.

BEUVINK, I. et al. The mTOR inhibitor RAD001 sensitizes tumor cells to DNA-damaged induced apoptosis through inhibition of p21 translation. **Cell**, v. 120, n. 6, p. 747-59, Mar 2005. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15797377> >.

BHARATI, R. et al. Does risk of endometrial cancer for women without a germline mutation in a DNA mismatch repair gene depend on family history of endometrial cancer or colorectal cancer? **Gynecol Oncol**, v. 133, n. 2, p. 287-92, May 2014. ISSN 1095-6859. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24631449> >.

BINDER, P. S.; MUTCH, D. G. Update on prognostic markers for endometrial cancer. **Womens Health (Lond)**, v. 10, n. 3, p. 277-88, May 2014. ISSN 1745-5065. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24956294> >.

BLUNDELL, T. L. et al. Insulin-like growth factor: a model for tertiary structure accounting for immunoreactivity and receptor binding. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 75, n. 1, p. 180-4, Jan 1978. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/272633> >.

BORUBAN, M. C. et al. From endometrial hyperplasia to endometrial cancer: insight into the biology and possible medical preventive measures. **Eur J Cancer Prev**, v. 17, n. 2, p. 133-8, Apr 2008. ISSN 1473-5709. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18287870> >.

BOWKER, S. L. et al. Glucose-lowering agents and cancer mortality rates in type 2 diabetes: assessing effects of time-varying exposure. **Diabetologia**, v. 53, n. 8, p. 1631-7, Aug 2010. ISSN 1432-0428. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20407744> >.

BROSENS, J. J.; WILSON, M. S.; LAM, E. W. FOXO transcription factors: from cell fate decisions to regulation of human female reproduction. **Adv Exp Med Biol**, v. 665, p. 227-41, 2009. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20429428> >.

CADIGAN, K. M.; NUSSE, R. Wnt signaling: a common theme in animal development. **Genes Dev**, v. 11, n. 24, p. 3286-305, Dec 1997. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9407023> >.

CAI, C. et al. miR-195 Inhibits Tumor Progression by Targeting RPS6KB1 in Human Prostate Cancer. **Clin Cancer Res**, v. 21, n. 21, p. 4922-34, Nov 2015. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26080838> >.

CAI, L.; WANG, H.; YANG, Q. CRKL overexpression promotes cell proliferation and inhibits apoptosis in endometrial carcinoma. **Oncol Lett**, v. 13, n. 1, p. 51-56, Jan 2017. ISSN 1792-1074. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28123521> >.

CALLE, E. E.; KAAKS, R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 8, p. 579-91, Aug 2004. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15286738> >.

CAMPA, D.; CANZIAN, F.; KAAKS, R. Genetic variability in the PRKCI gene and prostate cancer risk. **Cell Cycle**, v. 11, n. 2, p. 209, Jan 2012. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22189710> >.

CAMPAGNOLI, C. et al. Life-style and metformin for the prevention of endometrial pathology in postmenopausal women. **Gynecol Endocrinol**, v. 29, n. 2, p. 119-24, Feb 2013. ISSN 1473-0766. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22946682> >.

CATALANO, S. et al. Evidence that leptin through STAT and CREB signaling enhances cyclin D1 expression and promotes human endometrial cancer proliferation. **J Cell Physiol**, v. 218, n. 3, p. 490-500, Mar 2009. ISSN 1097-4652. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18988190> >.

CAVAGNA, M.; MANTESE, J. C. Biomarkers of Endometrial Receptivity—A Review. **Placenta**, v. 24, n. sB, p. S39-S47, 2003. ISSN 0143-4004.

CHAI SUPARAT, R.; ROJANAWATSIRIVEJ, S.; YODSANGA, S. Ribosomal protein S6 phosphorylation is associated with epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Pathol Oncol Res**, v. 19, n. 2, p. 189-93, Apr 2013. ISSN 1532-2807. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23015458> >.

CHEN, S. et al. The role of glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) in endometrial carcinoma: A carcinogenesis, progression, prognosis, and target therapy marker. **Oncotarget**, v. 7, n. 19, p. 27538-51, May 2016. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27050373> >.

CHEUNG, L. W. et al. High frequency of PIK3R1 and PIK3R2 mutations in endometrial cancer elucidates a novel mechanism for regulation of PTEN protein stability. **Cancer Discov**, v. 1, n. 2, p. 170-85, Jul 2011. ISSN 2159-8290. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21984976> >.

CHIANTERA, V. et al. Laparoscopic radical hysterectomy in cervical cancer as total mesometrial resection (L-TMMR): a multicentric experience. **Gynecol Oncol**, v. 139, n. 1, p. 47-51, Oct 2015. ISSN 1095-6859. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26166805> >.

CHO, S. et al. Endometrial osteopontin mRNA expression and plasma osteopontin levels are increased in patients with endometriosis. **Am J Reprod Immunol**, v. 61, n. 4, p. 286-93, Apr 2009. ISSN 1600-0897. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19260859> >.

COLAFRANCESCHI, M. et al. Clinico-pathological profile of endometrial carcinoma in young women (under 40 years of age). **Eur J Gynaecol Oncol**, v. 10, n. 5, p. 353-6, 1989. ISSN 0392-2936. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2553414> >.

COLOMBO, N. et al. Endometrial cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 22, n. suppl6, p. vi35-vi39, 2011. ISSN 0923-7534.

COSGROVE, C. M. et al. Epigenetic silencing of MLH1 in endometrial cancers is associated with larger tumor volume, increased rate of lymph node positivity and reduced recurrence-free survival. **Gynecol Oncol**, v. 146, n. 3, p. 588-595, 09 2017. ISSN 1095-6859. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28709704> >.

CROSBIE, E. J. et al. Body mass index, hormone replacement therapy, and endometrial cancer risk: a meta-analysis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 19, n. 12, p. 3119-30, Dec 2010. ISSN 1538-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21030602> >.

DAI, C. et al. Insulin-like growth factor 1 regulates growth of endometrial carcinoma through PI3k signaling pathway in insulin-resistant type 2 diabetes. **Am J Transl Res**, v. 8, n. 8, p. 3329-36, 2016. ISSN 1943-8141. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27648123> >.

DALEY-BROWN, D. et al. Type II Endometrial Cancer Overexpresses NILCO: A Preliminary Evaluation. **Dis Markers**, v. 2017, p. 8248175, 2017. ISSN 1875-8630. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28659656> >.

DAVOL, P. A. et al. Shc proteins are strong, independent prognostic markers for both node-negative and node-positive primary breast cancer. **Cancer Res**, v. 63, n. 20, p. 6772-83, Oct 2003. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14583473> >.

DEDES, K. J. et al. Emerging therapeutic targets in endometrial cancer. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 8, n. 5, p. 261-71, May 2011. ISSN 1759-4782. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21221135> >.

DELIGDISCH, L. Hormonal pathology of the endometrium. **Mod Pathol**, v. 13, n. 3, p. 285-94, Mar 2000. ISSN 0893-3952. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10757339> >.

DJIOGUE, S. et al. Insulin resistance and cancer: the role of insulin and IGFs. **Endocr Relat Cancer**, v. 20, n. 1, p. R1-R17, Feb 2013. ISSN 1479-6821. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23207292> >.

DOLCET, X. et al. NF- κ B in development and progression of human cancer. **Virchows Arch**, v. 446, n. 5, p. 475-82, May 2005. ISSN 0945-6317. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15856292> >.

DUSKA, L. R. et al. Endometrial cancer in women 40 years old or younger. **Gynecol Oncol**, v. 83, n. 2, p. 388-93, Nov 2001. ISSN 0090-8258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11606102> >.

EKNOYAN, G. Adolphe Quetelet (1796-1874)--the average man and indices of obesity. **Nephrol Dial Transplant**, v. 23, n. 1, p. 47-51, Jan 2008. ISSN 0931-0509. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17890752> >.

ELWOOD, J. M. Estrogens and endometrial cancer: some answers and some further questions. **Can Med Assoc J**, v. 124, n. 9, p. 1129-31, May 1981. ISSN 0008-4409. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7237333> >.

ERITJA, N. et al. Endometrial Carcinoma: Specific Targeted Pathways. **Adv Exp Med Biol**, v. 943, p. 149-207, 2017. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27910068> >.

ETHIER, J. L. et al. Is hormonal therapy effective in advanced endometrial cancer? A systematic review and meta-analysis. **Gynecol Oncol**, v. 147, n. 1, p. 158-166, 10 2017. ISSN 1095-6859. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28689667> >.

EZCURRA, D.; HUMAIDAN, P. **A review of luteinising hormone and human chorionic gonadotropin when used in assisted reproductive technology.** *Reprod. Biol. Endocrinol.* 12 2014.

FAGOTTI, A. et al. Standardized training programmes for advanced laparoscopic gynaecological surgery. **Curr Opin Obstet Gynecol**, v. 25, n. 4, p. 327-31, Aug 2013. ISSN 1473-656X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23823566> >.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, IDF Diabetes Atlas - 6th Edition. <http://www.diabetesatlas.org/>, 2015. Acesso em: 20.10.2017.

FEDOROV, L. M. et al. Loss of p53 in craf-induced transgenic lung adenoma leads to tumor acceleration and phenotypic switch. **Cancer Res**, v. 63, n. 9, p. 2268-77, May 2003. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12727849> >.

FENG, Y. Z. et al. BRAF mutation in endometrial carcinoma and hyperplasia: correlation with KRAS and p53 mutations and mismatch repair protein expression. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 17, p. 6133-8, Sep 2005. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16144912> >.

FENGXIA, Y. et al. Elucidating the role of the FoxO3a transcription factor in the IGF-1-induced migration and invasion of uveal melanoma cancer cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, 2016.

FLEMING, G. F. Systemic chemotherapy for uterine carcinoma: metastatic and adjuvant. **J Clin Oncol**, v. 25, n. 20, p. 2983-90, Jul 2007. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17617530> >.

FREEMAN, S. J. et al. The revised FIGO staging system for uterine malignancies: implications for MR imaging. **Radiographics**, v. 32, n. 6, p. 1805-27, Oct 2012. ISSN 1527-1323. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23065170> >.

FRIBERG, E. et al. Diabetes mellitus and risk of endometrial cancer: a meta-analysis. **Diabetologia**, v. 50, n. 7, p. 1365-74, Jul 2007. ISSN 0012-186X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17476474> >.

GAO, Z. et al. Targeting BRD4 proteins suppresses the growth of NSCLC through downregulation of eIF4E expression. **Cancer Biol Ther**, p. 0, Jan 2018. ISSN 1555-8576. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29333921> >.

GARG, K.; SOSLOW, R. A. Endometrial carcinoma in women aged 40 years and younger. **Arch Pathol Lab Med**, v. 138, n. 3, p. 335-42, Mar 2014. ISSN 1543-2165. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24576029> >.

GARGETT, C. E.; CHAN, R. W.; SCHWAB, K. E. Hormone and growth factor signaling in endometrial renewal: role of stem/progenitor cells. **Mol Cell Endocrinol**, v. 288, n. 1-2, p. 22-9, Jun 2008. ISSN 0303-7207. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18403104> >.

GE, Y. et al. Hypermethylation of EIF4E promoter is associated with early onset of gastric cancer. **Carcinogenesis**, v. 39, n. 1, p. 66-71, Jan 2018. ISSN 1460-2180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29342273> >.

GIELEN, S. C. et al. Steroid-modulated proliferation of human endometrial carcinoma cell lines: any role for insulin-like growth factor signaling? **J Soc Gynecol Investig**, v. 12, n. 1, p. 58-64, Jan 2005. ISSN 1071-5576. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15629674> >.

GONG, S. et al. Roflumilast restores cAMP/PKA/CREB signaling axis for FtMt-mediated tumor inhibition of ovarian cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 68, p. 112341-112353, Dec 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29348829> >.

GOTO, T. et al. Mechanism and functional consequences of loss of FOXO1 expression in endometrioid endometrial cancer cells. **Oncogene**, v. 27, n. 1, p. 9-19, Jan 2008. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17599040> >.

GRADY, D. et al. Hormone replacement therapy and endometrial cancer risk: a meta-analysis. **Obstet Gynecol**, v. 85, n. 2, p. 304-13, Feb 1995. ISSN 0029-7844. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7824251> >.

GROSSMAN, S. R. et al. p66 Shc tumor levels show a strong prognostic correlation with disease outcome in stage IIA colon cancer. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 19, p. 5798-804, Oct 2007. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17908971> >.

GUERTIN, D. A.; SABATINI, D. M. An expanding role for mTOR in cancer. **Trends Mol Med**, v. 11, n. 8, p. 353-61, Aug 2005. ISSN 1471-4914. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16002336> >.

HALPERIN, R. et al. Comparative immunohistochemical study of endometrioid and serous papillary carcinoma of endometrium. **Eur J Gynaecol Oncol**, v. 22, n. 2, p. 122-6, 2001. ISSN 0392-2936. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11446475> >.

HAMPEL, H. et al. Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: later age of onset. **Gastroenterology**, v. 129, n. 2, p. 415-21, Aug 2005. ISSN 0016-5085. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16083698> >.

HANLEY, K. Z.; BIRDSOONG, G. G.; MOSUNJAC, M. B. Recent Developments in Surgical Pathology of the Uterine Corpus. **Arch Pathol Lab Med**, v. 141, n. 4, p. 528-541, Apr 2017. ISSN 1543-2165. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28353387> >.

HAO, Y.; ZHAO, S.; WANG, Z. Targeting the protein-protein interaction between IRS1 and mutant p110 α for cancer therapy. **Toxicol Pathol**, v. 42, n. 1, p. 140-7, Jan 2014. ISSN 1533-1601. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24178578> >.

HAWKINS, S. M.; MATZUK, M. M. The menstrual cycle: basic biology. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1135, p. 10-8, 2008. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18574203> >.

HECHT, J. L.; MUTTER, G. L. Molecular and pathologic aspects of endometrial carcinogenesis. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 29, p. 4783-91, Oct 2006. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17028294> >.

HERNANDEZ, A. V. et al. Insulin resistance and endometrial cancer risk: A systematic review and meta-analysis. **Eur J Cancer**, v. 51, n. 18, p. 2747-58, Dec 2015. ISSN 1879-0852. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26597445> >.

HIRAI, T.; CHIDA, K. Protein kinase Czeta (PKCzeta): activation mechanisms and cellular functions. **J Biochem**, v. 133, n. 1, p. 1-7, Jan 2003. ISSN 0021-924X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12761192> >.

HIRANO, S. et al. Clinical implications of insulin-like growth factors through the presence of their binding proteins and receptors expressed in gynecological cancers. **Eur J Gynaecol Oncol**, v. 25, n. 2, p. 187-91, 2004. ISSN 0392-2936. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032278> >.

HOPFER, H. et al. In vitro interactions of endometrial stromal and epithelial cells in Matrigel: reorganization of the extracellular matrix. **Pathobiology**, v. 62, n. 2, p. 104-8, 1994. ISSN 1015-2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7945912> >.

HUANG, S. et al. Impact of laparoscopy on the biological behavior and gene expression of endometrial adenocarcinoma cells. **Gynecol Endocrinol**, v. 33, n. 11, p. 899-903, Nov 2017. ISSN 1473-0766. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28656791> >.

HULKA, B. S. et al. Predominance of early endometrial cancers after long-term estrogen use. **JAMA**, v. 244, n. 21, p. 2419-22, Nov 1980. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7431569> >.

HUSSEIN, Y. R.; SOSLOW, R. A. Molecular insights into the classification of high-grade endometrial carcinoma. **Pathology**, v. 50, n. 2, p. 151-161, Feb 2018. ISSN 1465-3931. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29246451> >.

HWA, V.; OH, Y.; ROSENFELD, R. G. **The insulin- like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily.** *Endocr. Rev.* 20: 761-787 p. 1999.

INCA. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. <https://www1.inca.gov.br/vigilancia/incidencia.asp>, 2016. Acesso em: 28.10.2017.

JABBOUR, H. N. et al. Endocrine regulation of menstruation. **Endocr Rev**, v. 27, n. 1, p. 17-46, Feb 2006. ISSN 0163-769X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16160098> >.

JACINTO, E. et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. **Nat Cell Biol**, v. 6, n. 11, p. 1122-8, Nov 2004. ISSN 1465-7392. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15467718> >.

JOEHLIN-PRICE, A. S. et al. Endometrial Cancer Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor (IGF1R) Expression Increases with Body Mass Index and Is Associated with Pathologic Extent and Prognosis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 25, n. 3, p. 438-45, Mar 2016. ISSN 1538-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26682991> >.

JOHNSON, J. A. et al. Diabetes and cancer (1): evaluating the temporal relationship between type 2 diabetes and cancer incidence. **Diabetologia**, v. 55, n. 6, p. 1607-18, Jun 2012. ISSN 1432-0428. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22476947> >.

JÚNIOR, N. L. C. D. A.; ATHANAZIO, D. A. Terapia de reposição hormonal e o câncer do endométrio. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, n. 11, p. 2613-2622, 2007.

KALANDIDI, A. et al. A case-control study of endometrial cancer in relation to reproductive, somatometric, and life-style variables. **Oncology**, v. 53, n. 5, p. 354-9, 1996 Sep-Oct 1996. ISSN 0030-2414. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8784467> >.

KAMELLE, S.; SIENKO, A.; BENBROOK, D. M. Retinoids and steroids regulate menstrual phase histological features in human endometrial organotypic cultures. **Fertil Steril**, v. 78, n. 3, p. 596-602, Sep 2002. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12215339> >.

KENNEDY, B. J. A progestogen for treatment of advanced endometrial cancer. **JAMA**, v. 184, p. 758-61, Jun 1963. ISSN 0098-7484. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14031934> >.

KERR, J.; ANDERSON, C.; LIPPMAN, S. M. Physical activity, sedentary behaviour, diet, and cancer: an update and emerging new evidence. **Lancet Oncol**, v. 18, n. 8, p. e457-e471, Aug 2017. ISSN 1474-5488. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28759385> >.

KIM, D. H. et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. **Cell**, v. 110, n. 2, p. 163-75, Jul 2002. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12150925> >.

KISTNER, R. W.; GRIFFITHS, C. T.; CRAIG, J. M. Use of progestational agents in the management of endometrial cancer. **Cancer**, v. 18, n. 12, p. 1563-79, Dec 1965. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5891823> >.

KITSON, S. J.; EVANS, D. G.; CROSBIE, E. J. Identifying High-Risk Women for Endometrial Cancer Prevention Strategies: Proposal of an Endometrial Cancer Risk Prediction Model. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 10, n. 1, p. 1-13, Jan 2017. ISSN 1940-6215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27965288> >.

KLEINMAN, D. et al. Modulation of insulin-like growth factor I (IGF-I) receptors and membrane-associated IGF-binding proteins in endometrial cancer cells by estradiol. **Endocrinology**, v. 136, n. 6, p. 2531-2537, 1995.

KOKKA, F. et al. Hormonal therapy in advanced or recurrent endometrial cancer. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 12, p. CD007926, Dec 2010. ISSN 1469-493X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21154390> >.

KOTOWICZ, B. et al. Clinical significance of pretreatment serum levels of VEGF and its receptors, IL- 8, and their prognostic value in type I and II endometrial cancer patients. **PLoS One**, v. 12, n. 10, p. e0184576, 2017. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28991928> >.

KREIZMAN-SHEFER, H. et al. Distribution of estrogen and progesterone receptors isoforms in endometrial cancer. **Diagn Pathol**, v. 9, p. 77, Mar 2014. ISSN 1746-1596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24684970> >.

KURIBAYASHI, Y. et al. Frequency of endometrial cancer and atypical hyperplasia in infertile women undergoing hysteroscopic polypectomy. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 43, n. 9, p. 1465-1471, Sep 2017. ISSN 1447-0756. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28708275> >.

KURMAN, R. J. et al. **WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs**. Lyon, França: 2014. 307 ISBN 9283224353, 9789283224358.

KUROSE, K. et al. Frequent loss of PTEN expression is linked to elevated phosphorylated Akt levels, but not associated with p27 and cyclin D1 expression, in primary epithelial ovarian carcinomas. **Am J Pathol**, v. 158, n. 6, p. 2097-106, Jun 2001. ISSN 0002-9440. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11395387> >.

LAM, E. W.; SHAH, K.; BROSENS, J. J. The diversity of sex steroid action: the role of micro-RNAs and FOXO transcription factors in cycling endometrium and cancer. **J Endocrinol**, v. 212, n. 1, p. 13-25, Jan 2012. ISSN 1479-6805. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21382987> >.

LANCASTER, J. M. et al. Society of Gynecologic Oncology statement on risk assessment for inherited gynecologic cancer predispositions. **Gynecol Oncol**, v. 136, n. 1, p. 3-7, Jan 2015. ISSN 1095-6859. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25238946> >.

LAPID, K. et al. GSK3 β regulates physiological migration of stem/progenitor cells via cytoskeletal rearrangement. **J Clin Invest**, v. 123, n. 4, p. 1705-17, Apr 2013. ISSN 1558-8238. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23478410> >.

LAPPAS, M. GSK3 β is increased in adipose tissue and skeletal muscle from women with gestational diabetes where it regulates the inflammatory response. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e115854, 2014. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25541965> >.

LARUE, L.; BELLACOSA, A. Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. **Oncogene**, v. 24, n. 50, p. 7443-54, Nov 2005. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16288291> >.

LE GALLO, M.; BELL, D. W. The emerging genomic landscape of endometrial cancer. **Clin Chem**, v. 60, n. 1, p. 98-110, Jan 2014. ISSN 1530-8561. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24170611> >.

LEE, A. M. et al. Prkcz null mice show normal learning and memory. **Nature**, v. 493, n. 7432, p. 416-9, Jan 2013. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23283171> >.

LEE, H. et al. MEKK1 activation of human estrogen receptor alpha and stimulation of the agonistic activity of 4-hydroxytamoxifen in endometrial and ovarian cancer cells. **Mol Endocrinol**, v. 14, n. 11, p. 1882-96, Nov 2000. ISSN 0888-8809. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11075819> >.

LEI, C.; DIANNA, J. M.; PAUL, Z. Z. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus— present and future perspectives. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 8, n. 4, p. 228, 2011. ISSN 1759-5029.

LESSEY, B. A. The role of the endometrium during embryo implantation. **Human Reproduction**, v. 15, p. 39-50, 2000. ISSN 0268-1161.

LI, P. D. et al. Overexpression of RPS6KB1 predicts worse prognosis in primary HCC patients. **Med Oncol**, v. 29, n. 5, p. 3070-6, Dec 2012. ISSN 1559-131X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22684641> >.

LI, Y. et al. Autocrine motility factor promotes epithelial-mesenchymal transition in endometrial cancer via MAPK signaling pathway. **Int J Oncol**, v. 47, n. 3, p. 1017-24, Sep 2015. ISSN 1791-2423. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26201353> >.

LIAO, C. et al. Is diabetes mellitus associated with increased incidence and disease- specific mortality in endometrial cancer? A systematic review and meta- analysis of cohort studies. **Gynecologic Oncology**, v. 135, n. 1, p. 163-171, 2014. ISSN 0090-8258.

LU, L. et al. Long-term overweight and weight gain in early adulthood in association with risk of endometrial cancer. **Int J Cancer**, v. 129, n. 5, p. 1237-43, Sep 2011. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21387312> >.

LUNDSTRÖM, E. et al. Estrone - a partial estradiol antagonist in the normal breast. **Gynecol Endocrinol**, v. 31, n. 9, p. 747-9, 2015. ISSN 1473-0766. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26190536> >.

LUSTOSA, S. A. et al. Expression profiling using a cDNA array and immunohistochemistry for the extracellular matrix genes FN-1, ITGA-3, ITGB-5, MMP-2, and MMP-9 in colorectal carcinoma progression and dissemination. **ScientificWorldJournal**, v. 2014, p. 102541, 2014. ISSN 1537-744X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24737953> >.

LÉPINE, J. et al. Circulating estrogens in endometrial cancer cases and their relationship with tissular expression of key estrogen biosynthesis and metabolic pathways. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 95, n. 6, p. 2689-98, Jun 2010. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20371658> >.

MA, T. GSK3 in Alzheimer's disease: mind the isoforms. **J Alzheimers Dis**, v. 39, n. 4, p. 707-10, 2014. ISSN 1875-8908. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24254703> >.

MACK, T. M. Estrogens and endometrial cancer: selection of matched controls. **N Engl J Med**, v. 295, n. 23, p. 1319, Dec 1976. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/980066> >.

MARJORIBANKS, J. et al. Long-term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 1, p. CD004143, 01 2017. ISSN 1469-493X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28093732> >.

MARTINKO, A. J. et al. Targeting RAS-driven human cancer cells with antibodies to upregulated and essential cell-surface proteins. **eLife**, v. 7, 2018.

MARUYAMA, T.; YOSHIMURA, Y. Molecular and cellular mechanisms for differentiation and regeneration of the uterine endometrium. **Endocr J**, v. 55, n. 5, p. 795-810, Oct 2008. ISSN 1348-4540. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18580040> >.

MARÍN-JUEZ, R. et al. Hyperinsulinemia induces insulin resistance and immune suppression via Ptpn6/Shp1 in zebrafish. **J Endocrinol**, v. 222, n. 2, p. 229-41, Aug 2014. ISSN 1479-6805. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24904114> >.

MAYBIN, J. A.; CRITCHLEY, H. O. Menstrual physiology: implications for endometrial pathology and beyond. **Hum Reprod Update**, v. 21, n. 6, p. 748-61, 2015 Nov-Dec 2015. ISSN 1460-2369. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26253932> >.

MCCAMPBELL, A. S. et al. Overexpression of the insulin-like growth factor I receptor and activation of the AKT pathway in hyperplastic endometrium. **Clin Cancer Res**, v. 12, n. 21, p. 6373-8, Nov 2006. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17085648> >.

_____. Loss of inhibitory insulin receptor substrate-1 phosphorylation is an early event in mammalian target of rapamycin-dependent endometrial hyperplasia and carcinoma. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 3, n. 3, p. 290-300, Mar 2010. ISSN 1940-6215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20179297> >.

MCCLUGGAGE, W. G. Pathologic Staging of Endometrial Carcinomas: Selected Areas of Difficulty. **Adv Anat Pathol**, v. 25, n. 2, p. 71-84, Mar 2018. ISSN 1533-4031. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29356713> >.

MCKERN, N. M. et al. Structure of the insulin receptor ectodomain reveals a folded-over conformation. **Nature**, v. 443, n. 7108, p. 218-21, Sep 2006. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16957736> >.

MCLENNAN, C. E.; RYDELL, A. H. Extent of endometrial shedding during normal menstruation. **Obstet Gynecol**, v. 26, n. 5, p. 605-21, Nov 1965. ISSN 0029-7844. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5855347> >.

MEDYOUF, H.; GHYSDAEL, J. The calcineurin/NFAT signaling pathway: a novel therapeutic target in leukemia and solid tumors. **Cell Cycle**, v. 7, n. 3, p. 297-303, Feb 2008. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18235236> >.

MERRITT, M. A. et al. Insulin/IGF and sex hormone axes in human endometrium and associations with endometrial cancer risk factors. **Cancer Causes Control**, v. 27, n. 6, p. 737-48, 06 2016. ISSN 1573-7225. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27125830> >.

MILLER, D. et al. **Late-Breaking Abstract 1: Randomized phase III noninferiority trial of first line chemotherapy for metastatic or recurrent endometrial carcinoma: A Gynecologic Oncology Group study.** 125: 771-771 p. 2012.

MITKEVICH, V. A. et al. Ribonuclease binase apoptotic signature in leukemic Kasumi-1 cells. **Biochimie**, v. 95, n. 6, p. 1344-9, Jun 2013. ISSN 1638-6183. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23499289> >.

MONTAGUT, C. et al. Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma. **Cancer Res**, v. 68, n. 12, p. 4853-61, Jun 2008. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18559533> >.

MOORE, K.; BREWER, M. A. Endometrial Cancer: Is This a New Disease? **Am Soc Clin Oncol Educ Book**, v. 37, p. 435-442, 2017. ISSN 1548-8756. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28561715> >.

MORICE, P. et al. Endometrial cancer. **Lancet**, v. 387, n. 10023, p. 1094-1108, Mar 2016. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26354523> >.

MU, N. et al. Insulin resistance: a significant risk factor of endometrial cancer. **Gynecol Oncol**, v. 125, n. 3, p. 751-7, Jun 2012. ISSN 1095-6859. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22449736> >.

MURALI, R.; SOSLOW, R. A.; WEIGELT, B. Classification of endometrial carcinoma: more than two types. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 7, p. e268-e278, 2014. ISSN 1470-2045.

NADEAU, V. et al. Map2k1 and Map2k2 genes contribute to the normal development of syncytiotrophoblasts during placentation. **Development**, v. 136, n. 8, p. 1363-74, Apr 2009. ISSN 0950-1991. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19304888> >.

NATHANSON, I. T.; KELLEY, R. M. Hormonal treatment of cancer. **N Engl J Med**, v. 246, n. 5, p. 180-9; concl, Jan 1952. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14890833> >.

NAZ, H. et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV: A multifunctional enzyme and potential therapeutic target. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 121, n. 1, p. 54-65, 05 2016. ISSN 1873-1732. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26773169> >.

NESTLER, J. E. Metformin for the treatment of the polycystic ovary syndrome. **N Engl J Med**, v. 358, n. 1, p. 47-54, Jan 2008. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18172174> >.

NESTLER, J. E. et al. A direct effect of hyperinsulinemia on serum sex hormone-binding globulin levels in obese women with the polycystic ovary syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 72, n. 1, p. 83-9, Jan 1991. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1898744> >.

NIEMAN, K. M. et al. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1831, n. 10, p. 1533-41, Oct 2013. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23500888> >.

NIKAS, G. Cell- surface morphological events relevant to human implantation. **Human Reproduction**, v. 14, p. 37-44, 1999. ISSN 0268-1161.

NIMPTSCH, K.; PISCHON, T. Obesity Biomarkers, Metabolism and Risk of Cancer: An Epidemiological Perspective. **Recent Results Cancer Res**, v. 208, p. 199-217, 2016. ISSN 0080-0015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27909909> >.

NINOMIYA, Y. et al. K-Ras and H-Ras activation promote distinct consequences on endometrial cell survival. **Cancer Res**, v. 64, n. 8, p. 2759-65, Apr 2004. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15087391> >.

NOUT, R. A. et al. Improved risk assessment of endometrial cancer by combined analysis of MSI, PI3K-AKT, Wnt/ β -catenin and P53 pathway activation. **Gynecol Oncol**, v. 126, n. 3, p. 466-73, Sep 2012. ISSN 1095-6859. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22609107> >.

O'HARA, A. J.; BELL, D. W. The genomics and genetics of endometrial cancer. **Adv Genomics Genet**, v. 2012, n. 2, p. 33-47, Mar 2012. ISSN 1179-9870. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22888282> >.

OBERHELMAN, H. A. Hormonal treatment of mammary cancer. **Surg Clin North Am**, v. 39, n. 1, p. 3-12, Feb 1959. ISSN 0039-6109. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13625077> >.

OH, J. C. et al. Increased plasma levels of insulin-like growth factor 2 and insulin-like growth factor binding protein 3 are associated with endometrial cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 13,

n. 5, p. 748-52, May 2004. ISSN 1055-9965. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15159305> >.

OKULICZ, W. C.; ACE, C. I.; SCARRELL, R. Zonal changes in proliferation in the rhesus endometrium during the late secretory phase and menses. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 214, n. 2, p. 132-8, Feb 1997. ISSN 0037-9727. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9034130> >.

ONSTAD, M. A.; SCHMANDT, R. E.; LU, K. H. Addressing the Role of Obesity in Endometrial Cancer Risk, Prevention, and Treatment. **J Clin Oncol**, v. 34, n. 35, p. 4225-4230, Dec 2016. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27903150> >.

OPŁAWSKI, M. et al. Identification of a gene expression profile associated with the regulation of angiogenesis in endometrial cancer. **Mol Med Rep**, v. 16, n. 3, p. 2547-2555, Sep 2017. ISSN 1791-3004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28656251> >.

OUTLINES, P. Staging - Uterine Carcinoma. <http://pathologyoutlines.com/topic/uterusstaging.html>, 2011. Acesso em: 05.11.2017.

PADYKULA, H. A. Regeneration in the primate uterus: the role of stem cells. **Ann N Y Acad Sci**, v. 622, p. 47-56, 1991. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2064204> >.

PAN, M. G.; XIONG, Y.; CHEN, F. NFAT gene family in inflammation and cancer. **Curr Mol Med**, v. 13, n. 4, p. 543-54, May 2013. ISSN 1875-5666. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22950383> >.

PARAZZINI, F. et al. The epidemiology of endometrial cancer. **Gynecologic Oncology**, v. 41, n. 1, p. 1-16, 1991. ISSN 0090-8258.

PARK, K. C. et al. Survival of cancer stem-like cells under metabolic stress via CaMK2 α -mediated upregulation of sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase expression. **Clin Cancer Res**, Dec 2017. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29279319> >.

PAVELIĆ, J.; RADAKOVIĆ, B.; PAVELIĆ, K. Insulin-like growth factor 2 and its receptors (IGF 1R and IGF 2R/mannose 6-phosphate) in endometrial adenocarcinoma. **Gynecol Oncol**, v. 105, n. 3, p. 727-35, Jun 2007. ISSN 0090-8258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17399767> >.

PECTASIDES, D.; PECTASIDES, E.; ECONOMOPOULOS, T. Systemic therapy in metastatic or recurrent endometrial cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v. 33, n. 2, p. 177-190, 2007. ISSN 0305-7372.

PEREIRA, E. B. et al. Survey of Current Practice Patterns in the Treatment of Early-Stage Endometrial Cancer. **Int J Gynecol Cancer**, v. 26, n. 2, p. 341-7, Feb 2016. ISSN 1525-1438. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26569061> >.

PEREZ-LOPEZ, F. R. et al. Systematic review and meta-analysis of the effect of metformin treatment on overall mortality rates in women with endometrial cancer and type 2 diabetes mellitus. **Maturitas**, v. 101, p. 6-11, Jul 2017. ISSN 1873-4111. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28539171> >.

PETERSON, D. et al. Variants in PPP3R1 and MAPT are associated with more rapid functional decline in Alzheimer's disease: the Cache County Dementia Progression Study. **Alzheimers Dement**, v. 10, n. 3, p. 366-71, May 2014. ISSN 1552-5279. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23727081> >.

PICKAR, J. H. et al. Safety and benefit considerations for menopausal hormone therapy. **Expert Opin Drug Saf**, v. 16, n. 8, p. 941-954, Aug 2017. ISSN 1744-764X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28664754> >.

POLLAK, M. The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 3, p. 159-69, Feb 2012. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22337149> >.

POMERLEAU, V. et al. Met receptor-induced Grb2 or Shc signals both promote transformation of intestinal epithelial cells, albeit they are required for distinct oncogenic functions. **BMC Cancer**, v. 14, p. 240, Apr 2014. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24708867> >.

PONTES, A. et al. Tratamento Clínico e Seguimento das Hiperplasias de Endométrio. **RBGO**, v. 22, n. 6, p. 325-331, 2000.

QIN, J. J. et al. NFAT as cancer target: mission possible? **Biochim Biophys Acta**, v. 1846, n. 2, p. 297-311, Dec 2014. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25072963> >.

QU, L. et al. PRKCI negatively regulates autophagy via PIK3CA/AKT-MTOR signaling. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 470, n. 2, p. 306-312, Feb 2016. ISSN 1090-2104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26792725> >.

QUEVEDO, C.; SALINAS, M.; ALCÁZAR, A. Initiation factor 2B activity is regulated by protein phosphatase 1, which is activated by the mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in insulin-like growth factor 1-stimulated neuronal cells. **J Biol Chem**, v. 278, n. 19, p. 16579-86, May 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12624094> >.

REMSING RIX, L. L. et al. GSK3 alpha and beta are new functionally relevant targets of tivantinib in lung cancer cells. **ACS Chem Biol**, v. 9, n. 2, p. 353-8, Feb 2014. ISSN 1554-8937. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24215125> >.

REUVENI, H. et al. Therapeutic destruction of insulin receptor substrates for cancer treatment. **Cancer Res**, v. 73, n. 14, p. 4383-94, Jul 2013. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23651636> >.

ROSE, P. G. Endometrial carcinoma. **N Engl J Med**, v. 335, n. 9, p. 640-9, Aug 1996. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8692240> >.

RUVINSKY, I.; MEYUHAS, O. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. **Trends Biochem Sci**, v. 31, n. 6, p. 342-8, Jun 2006. ISSN 0968-0004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16679021> >.

SABINE, C. et al. Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. **Nature**, v. 456, n. 7220, p. 344, 2008. ISSN 0028-0836.

SADEK, K. H. et al. Variation in stability of housekeeping genes in endometrium of healthy and polycystic ovarian syndrome women. **Hum Reprod**, v. 27, n. 1, p. 251-6, Jan 2012. ISSN 1460-2350. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22052386> >.

SAJID, W. et al. Structural and biological properties of the Drosophila insulin-like peptide 5 show evolutionary conservation. **J Biol Chem**, v. 286, n. 1, p. 661-73, Jan 2011. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20974844> >.

SALES, K. J. et al. Prostaglandin F(2alpha)-F-prostanoid receptor regulates CXCL8 expression in endometrial adenocarcinoma cells via the calcium-calcieneurin-NFAT pathway. **Biochim Biophys Acta**, v. 1793, n. 12, p. 1917-28, Dec 2009. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19819266> >.

SALKER, M. S. et al. Loss of Endometrial Sodium Glucose Cotransporter SGLT1 is Detrimental to Embryo Survival and Fetal Growth in Pregnancy. **Sci Rep**, v. 7, n. 1, p. 12612, Oct 2017. ISSN 2045-2322. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28974690> >.

SAMANI, A. A. et al. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. **Endocr Rev**, v. 28, n. 1, p. 20-47, Feb 2007. ISSN 0163-769X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16931767> >.

SAMUELS, Y. et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. **Science**, v. 304, n. 5670, p. 554, Apr 2004. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15016963> >.

SARANI, S. A. et al. Morphological evidence for the 'implantation window' in human luminal endometrium. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 14, n. 12, p. 3101, 1999. ISSN 0268-1161.

Sociedade Brasileira de Diabetes. <http://www.diabetes.org.br/profissionais/>, Acesso em: 03.10.2017.

SCHRIJNDERS, D. et al. Sex differences in obesity related cancer incidence in relation to type 2 diabetes diagnosis (ZODIAC-49). **PLoS One**, v. 13, n. 1, p. e0190870, 2018. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29370205> >.

SCIACCA, L. et al. In IGF-I receptor-deficient leiomyosarcoma cells autocrine IGF-II induces cell invasion and protection from apoptosis via the insulin receptor isoform A. **Oncogene**, v. 21, n. 54, p. 8240-50, Nov 2002. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12447687> >.

SEGEV, Y. et al. The incidence of endometrial cancer in women with BRCA1 and BRCA2 mutations: an international prospective cohort study. **Gynecol Oncol**, v. 130, n. 1, p. 127-31, Jul 2013. ISSN 1095-6859. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23562522> >.

SETO, K. K.; ANDRULIS, I. L. Atypical protein kinase C zeta: potential player in cell survival and cell migration of ovarian cancer. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0123528, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25874946> >.

SHAFIEE, M. N. et al. Up-regulation of genes involved in the insulin signalling pathway (IGF1, PTEN and IGFBP1) in the endometrium may link polycystic ovarian syndrome and endometrial cancer. **Mol Cell Endocrinol**, v. 424, p. 94-101, Mar 2016. ISSN 1872-8057. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26802879> >.

SHANMUGAPRIYA, S.; SUBRAMANIAN, P.; KANIMOZHI, S. Geraniol Inhibits Endometrial Carcinoma via Downregulating Oncogenes and Upregulating Tumour Suppressor Genes. **Indian J Clin Biochem**, v. 32, n. 2, p. 214-219, Jun 2017. ISSN 0970-1915. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28428697> >.

SHAO, T. et al. Discovery of 2-methoxy-3-phenylsulfonamino-5-(quinazolin-6-yl or quinolin-6-yl)benzamides as novel PI3K inhibitors and anticancer agents by bioisostere. **Eur J Med Chem**, v. 75, p. 96-105, Mar 2014. ISSN 1768-3254. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24530495> >.

SHAPIRO, S. et al. Recent and past use of conjugated estrogens in relation to adenocarcinoma of the endometrium. **N Engl J Med**, v. 303, n. 9, p. 485-9, Aug 1980. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6248785> >.

SHIOZAWA, T. et al. Estrogen-induced proliferation of normal endometrial glandular cells is initiated by transcriptional activation of cyclin D1 via binding of c-Jun to an AP-1 sequence. **Oncogene**, v. 23, n. 53, p. 8603-10, Nov 2004. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15467760> >.

SIITERI, P. K. Steroid hormones and endometrial cancer. **Cancer Res**, v. 38, n. 11 Pt 2, p. 4360-6, Nov 1978. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/359136> >.

SINGH, P.; ALEX, J. M.; BAST, F. Insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor receptor 1 (IGF-1R) signaling systems: novel treatment strategies for cancer. **Med Oncol**, v. 31, n. 1, p. 805, Jan 2014. ISSN 1559-131X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24338270> >.

SINGHAL, H. et al. Progesterone receptor isoforms, agonists and antagonists differentially reprogram estrogen signaling. **Oncotarget**, v. 9, n. 4, p. 4282-4300, Jan 2018. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29435103> >.

SIVRIDIS, E.; GIATROMANOLAKI, A. The pathogenesis of endometrial carcinomas at menopause: facts and figures. **J Clin Pathol**, v. 64, n. 7, p. 553-60, Jul 2011. ISSN 1472-4146. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21330315> >.

SLATTERY, M. L.; LUNDGREEN, A.; WOLFF, R. K. MAP kinase genes and colon and rectal cancer. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 12, p. 2398-408, Dec 2012. ISSN 1460-2180. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23027623> >.

SMITH, D. C. et al. Association of exogenous estrogen and endometrial carcinoma. **N Engl J Med**, v. 293, n. 23, p. 1164-7, Dec 1975. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1186789> >.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. Números da Obesidade no Brasil. <https://www.endocrino.org.br/numeros-da-obesidade-no-brasil/>, Acesso em: 21.12.2017.

AMERICAN CANCER SOCIETY, Endometrial Cancer Stages. 2017. Acesso em: 05.11.2017.

SOROSKY, J. I. Endometrial cancer. **Obstet Gynecol**, v. 111, n. 2 Pt 1, p. 436-47, Feb 2008. ISSN 0029-7844. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18238985> >.

_____. Endometrial cancer. **Obstet Gynecol**, v. 120, n. 2 Pt 1, p. 383-97, Aug 2012. ISSN 1873-233X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22825101> >.

STUENKEL, C.; BARRETT-CONNOR, E. Hormone replacement therapy: where are we now? **West J Med**, v. 171, n. 1, p. 27-30, Jul 1999. ISSN 0093-0415. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10483342> >.

SZABLEWSKI, L. Diabetes mellitus: influences on cancer risk. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 30, n. 7, p. 543-53, Oct 2014. ISSN 1520-7560. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25044584> >.

TAFE, L. J. et al. Endometrial and ovarian carcinomas with undifferentiated components: clinically aggressive and frequently underrecognized neoplasms. **Mod Pathol**, v. 23, n. 6, p. 781-9, Jun 2010. ISSN 1530-0285. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20305618> >.

TAKAI, N. et al. Targeting calcium/calmodulin-dependence kinase I and II as a potential anti-proliferation remedy for endometrial carcinomas. **Cancer Lett**, v. 277, n. 2, p. 235-43, May 2009. ISSN 1872-7980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19168280> >.

TAO, M. H.; FREUDENHEIM, J. L. DNA methylation in endometrial cancer. **Epigenetics**, v. 5, n. 6, p. 491-8, Aug 2010. ISSN 1559-2308. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20543579> >.

TZIVION, G.; DOBSON, M.; RAMAKRISHNAN, G. FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. **Biochim Biophys Acta**, v. 1813, n. 11, p. 1938-45, Nov 2011. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21708191> >.

ULLRICH, A. et al. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. **Nature**, v. 313, n. 6005, p. 756-61, 1985 Feb 28-Mar 6 1985. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2983222> >.

_____. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. **EMBO J**, v. 5, n. 10, p. 2503-12, Oct 1986. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2877871> >.

VALDEZ, J. et al. On-demand dissolution of modular, synthetic extracellular matrix reveals local epithelial-stromal communication networks. **Biomaterials**, v. 130, p. 90-103, 06 2017. ISSN 1878-5905. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28371736> >.

VALEJO, F. A. M.; TIEZZI, D. G. Tratamento do câncer de endométrio. **FEMINA**, v. 37, n. 11, p. 603-610, 2009.

VERDI, J. et al. Endometrial stem cells in regenerative medicine. **J Biol Eng**, v. 8, p. 20, 2014. ISSN 1754-1611. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25097665> >.

VITALE, S. G. et al. Surgical treatment of high stage endometrial cancer: current perspectives. **Updates Surg**, v. 68, n. 2, p. 149-54, Jun 2016. ISSN 2038-3312. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26826083> >.

VON GRUENIGEN, V. E. et al. Treatment effects, disease recurrence, and survival in obese women with early endometrial carcinoma : a Gynecologic Oncology Group study. **Cancer**, v. 107, n. 12, p. 2786-91, Dec 2006. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17096437> >.

WALLBILLICH, J. J. et al. High Glucose-Mediated STAT3 Activation in Endometrial Cancer Is Inhibited by Metformin: Therapeutic Implications for Endometrial Cancer. **PLoS One**, v. 12, n. 1, p. e0170318, 2017. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28114390> >.

WAN, J. et al. The positivity of G-protein-coupled receptor-30 (GPR 30), an alternative estrogen receptor is not different between type 1 and type 2 endometrial cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 53, p. 90897-90904, Oct 2017. ISSN 1949-2553. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29207611> >.

WANG, Y. et al. Genomic characterization of gene copy-number aberrations in endometrial carcinoma cell lines derived from endometrioid-type endometrial adenocarcinoma. **Technol Cancer Res Treat**, v. 9, n. 2, p. 179-89, Apr 2010. ISSN 1533-0338. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20218740> >.

WEBB, P. M. Environmental (nongenetic) factors in gynecological cancers: update and future perspectives. **Future Oncol**, v. 11, n. 2, p. 295-307, 2015. ISSN 1744-8301. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25591840> >.

WEIGELT, B. et al. PI3K pathway dependencies in endometrioid endometrial cancer cell lines. **Clin Cancer Res**, v. 19, n. 13, p. 3533-44, Jul 2013. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23674493> >.

WEROHA, S. J.; HALUSKA, P. The insulin-like growth factor system in cancer. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 41, n. 2, p. 335-50, vi, Jun 2012. ISSN 1558-4410. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22682634> >.

WHITE, M. F.; KAHN, C. R. The insulin signaling system. **J Biol Chem**, v. 269, n. 1, p. 1-4, Jan 1994. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8276779> >.

WISEMAN, M. The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. **Proc Nutr Soc**, v. 67, n. 3, p. 253-6, Aug 2008. ISSN 1475-2719. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18452640> >.

WRIGHT, J. V.; SCHLIESMAN, B.; ROBINSON, L. Comparative measurements of serum estriol, estradiol, and estrone in non-pregnant, premenopausal women; a preliminary investigation. **Altern Med Rev**, v. 4, n. 4, p. 266-70, Aug 1999. ISSN 1089-5159. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10468650> >.

XIE, Y. et al. Regulation of insulin-like growth factor signaling by metformin in endometrial cancer cells. **Oncol Lett**, v. 8, n. 5, p. 1993-1999, Nov 2014. ISSN 1792-1074. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25289085> >.

YAN, J. et al. Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. **J Biol Chem**, v. 273, n. 37, p. 24052-6, Sep 1998. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9727023> >.

YANG, H. P. et al. PTEN expression in benign human endometrial tissue and cancer in relation to endometrial cancer risk factors. **Cancer Causes Control**, v. 26, n. 12, p. 1729-36, Dec 2015. ISSN 1573-7225. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26376893> >.

YAP, T. A. et al. Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. **Curr Opin Pharmacol**, v. 8, n. 4, p. 393-412, Aug 2008. ISSN 1471-4892. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18721898> >.

YIN, Y. et al. Glycogen synthase kinase 3 β inhibition as a therapeutic approach in the treatment of endometrial cancer. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 8, p. 16617-37, Aug 2013. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23941783> >.

YOUNG, S. L. Oestrogen and progesterone action on endometrium: a translational approach to understanding endometrial receptivity. **Reprod Biomed Online**, v. 27, n. 5, p. 497-505, Nov 2013. ISSN 1472-6491. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23933037> >.

ZHA, J.; LACKNER, M. R. Targeting the insulin-like growth factor receptor-1R pathway for cancer therapy. **Clin Cancer Res**, v. 16, n. 9, p. 2512-7, May 2010. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20388853> >.

ZHANG, L. et al. The silence of p66(Shc) in HCT8 cells inhibits the viability via PI3K/AKT/Mdm-2/p53 signaling pathway. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 8, p. 9097-104, 2015. ISSN 1936-2625. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26464652> >.

ZHANG, Y.; NI, H. J.; CHENG, D. Y. Prognostic value of phosphorylated mTOR/RPS6KB1 in non- small cell lung cancer. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 14, n. 6, p. 3725-8, 2013. ISSN 2476-762X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23886172> >.

ZHOU, H. et al. Targeting of phospho-eIF4E by homoharringtonine eradicates a distinct subset of human acute myeloid leukemia. **Leuk Lymphoma**, p. 1-13, Jan 2018. ISSN 1029-2403. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29334312> >.

ZHOU, J. et al. Insulin-like growth factor system gene expression in human endometrium during the menstrual cycle. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 79, n. 6, p. 1723-34, Dec 1994. ISSN 0021-972X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7527408> >.

ZIEL, H. K.; FINKLE, W. D. Increased risk of endometrial carcinoma among users of conjugated estrogens. **N Engl J Med**, v. 293, n. 23, p. 1167-70, Dec 1975. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/171569> >.

_____. Association of estrone with the development of endometrial carcinoma. **Am J Obstet Gynecol**, v. 124, n. 7, p. 735-40, Apr 1976. ISSN 0002-9378. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1258933> >.

ZOU, L. et al. Hypermethylation of the PRKCZ Gene in Type 2 Diabetes Mellitus. **J Diabetes Res**, v. 2013, p. 721493, 2013. ISSN 2314-6745. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23671888> >.

ZUCCHETTO, A. et al. Hormone-related factors and gynecological conditions in relation to endometrial cancer risk. **Eur J Cancer Prev**, v. 18, n. 4, p. 316-21, Aug 2009. ISSN 1473-5709. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19554665> >.

ANEXO 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES COM CÂNCER DE ENDOMÉTRIO

CAAE: 56519216.2.0000.5327

Título do Projeto: Análise da Via de Sinalização do Receptor da Insulina em Câncer de Endométrio

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar o papel da hiperinsulinemia no desenvolvimento do câncer endometrial, a fim de entender melhor a doença e pesquisar novas formas de tratamento. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

A insulina é um hormônio responsável pelo controle do açúcar no sangue e a resistência à insulina (hiperinsulinemia) é o excesso de insulina no sangue, sendo uma das características da diabetes e obesidade. Imagina-se que a hiperinsulinemia influencia no desenvolvimento de alguns tipos de câncer. Assim, essa pesquisa irá avaliar a expressão de genes (que estão no DNA) e proteínas que se relacionam à insulina para entender qual o papel dessas proteínas no surgimento do câncer de endométrio.

Se você aceitar participar da pesquisa, será realizada uma coleta de um pedaço do endométrio (útero) retirado na sua cirurgia para que sejam avaliados genes (que estão no DNA) e proteínas relacionados à insulina. Cabe salientar que o endométrio é sempre descartado após a cirurgia, então, este estudo não irá influenciar em nenhum procedimento assistencial de rotina. Além disso, o seu prontuário eletrônico será acessado para avaliar seu histórico de saúde (como níveis de açúcar no sangue, peso, idade, uso de hormônios, entre outras informações). Após serem realizadas as análises do estudo, o material biológico destinado a essa pesquisa será descartado.

Não são conhecidos riscos pela participação na pesquisa, no entanto pode haver quebra de confidencialidade, o que será minimizado pelo uso de códigos nas amostras coletadas.

A participação neste estudo não trará benefícios diretos para você, porém, no futuro, essas avaliações poderão auxiliar na prevenção e no tratamento da doença.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a

identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Edison Capp _ Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular, telefone (51) 33597625, com a pesquisadora Vânia Marisia Santos Fortes dos Reis, pelo telefone (51) 33083559 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

ANEXO 2 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PACIENTES CONTROLE

CAAE: 56519216.2.0000.5327

Título do Projeto: Análise da Via de Sinalização do Receptor da Insulina em Câncer de Endométrio

Você está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é avaliar o papel da hiperinsulinemia no desenvolvimento do câncer endometrial, a fim de entender melhor a doença e pesquisar novas formas de tratamento. Você está sendo convidada porque não tem câncer e suas características serão comparadas com as de mulheres com câncer de endométrio. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

A insulina é um hormônio responsável pelo controle do açúcar no sangue e a resistência à insulina (hiperinsulinemia) é o excesso de insulina no sangue, sendo uma das características da diabetes e obesidade. Imagina-se que a hiperinsulinemia influencia no desenvolvimento de alguns tipos de câncer. Assim, essa pesquisa irá avaliar a expressão de genes (que estão no DNA) e proteínas que se relacionam à insulina para entender qual o papel dessas proteínas no surgimento do câncer de endométrio.

Se você aceitar participar da pesquisa, será realizada uma coleta de um pedaço do endométrio (útero) retirado na sua cirurgia para que sejam avaliados genes (que estão no DNA) e proteínas relacionados à insulina. Cabe salientar que o endométrio é sempre descartado após a cirurgia, então, este estudo não irá influenciar em nenhum procedimento assistencial de rotina. Além disso, o seu prontuário eletrônico será acessado para avaliar seu histórico de saúde (como níveis de açúcar no sangue, peso, idade, uso de hormônios, entre outras informações). Após serem realizadas as análises do estudo, o material biológico destinado a essa pesquisa será descartado.

Não são conhecidos riscos pela participação na pesquisa, no entanto pode haver quebra de confidencialidade, o que será minimizado pelo uso de códigos nas amostras coletadas.

A participação neste estudo não trará benefícios diretos para você, porém, no futuro, essas avaliações poderão auxiliar na prevenção e no tratamento da doença.

Sua participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não participar, ou ainda, desistir de participar e retirar seu consentimento, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que você recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela sua participação na pesquisa e você não terá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, o seu nome não aparecerá na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com o pesquisador responsável Edison Capp _ Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular, telefone (51) 33597625, com a pesquisadora Vânia Marisia Santos Fortes dos Reis, pelo telefone (51) 33083559 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____