

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

ATIVIDADE DE TIROSINA QUINASE E EXPRESSÃO DO SUBSTRATO 1 DO
RECEPTOR DE INSULINA (IRS-1) EM MIOMÉTRIO E MIOMA HUMANOS

RAFAEL BUENO ORCY

Orientador Prof. Dr. Edison Capp

Co-orientador Prof^a. Dr^a. Helena von Eye Corleta

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, UFRGS, como requisito para obtenção do grau de Mestre.

Porto Alegre, junho de 2003

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Edison Capp, pela amizade, estímulo, orientação, e compreensão.

À Profa. Helena von Eye Corleta, co-orientadora deste trabalho, pela valiosa contribuição para realização dos experimentos, revisão e apoio.

À Prof^a. Roselis Silveira Martins da Silva e ao Prof. Luiz Carlos Rios Kucharski pela adoção, orientação e constantes colaborações metodológicas e didáticas.

À Prof^a. Ilma Simoni Brum da Silva, por sua serenidade, compreensão e importante colaboração neste trabalho, bem como todo pessoal de seu laboratório, Adriane, Beatriz, Débora, Lúcia, Isabel, Idelma e bolsistas.

À Prof^a. Poli Mara Spritzer, pelos aconselhamentos e constantes orientações que guiaram o desenvolvimento desse mestrado.

Ao Prof. Paulo Ivo pelo apoio, orientações e pelas freqüentes participações nesse trabalho, bem como a seus alunos do laboratório.

À Mariana, Ana, Vanessa, Humberto, Fabíola, Glauco, Ubirajara, Gabriela, Letícia, Matheus, Carmem, Alessandra e Mere e demais pessoal do laboratório pela agradável convivência diária.

À Márcia Trapp, por sua ajuda no aprendizado das técnicas, aconselhamentos e amizade.

Aos amigos Marcelo Tavares e Antônio Miragem, por suas constantes colaborações.

Ao grande amigo Guilherme Toscani, por sua amizade, colaboração, apoio incondicional em todas etapas desse trabalho.

Aos amigos Denizar, Alexandre, e Márcio, pelo incentivo ao estudo e apoio incondicional.

À Míriam, secretária do Grupo de Pesquisa, pelo auxílio, disponibilidade e agradável convivência.

À minha mãe e irmãos e namorada, pelo carinho e apoio diário.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
INTRODUÇÃO.....	11
Insulina.....	11
Receptor de Insulina.....	14
Transdução do Sinal de Insulina.....	18
Substratos do receptor de insulina.....	21
Miométrio e mioma.....	23
OBJETIVOS.....	27
MATERIAL E MÉTODOS.....	28
Delineamento do estudo.....	28
População e amostra.....	28
Fosforilação do substrato sintético poly(GLU 4:TYR 1).....	29
<i>Western blots</i>	30
Revelação das Autorradiografias.....	32
Análise Estatística.....	33
RESULTADOS.....	34
Fosforilação do Substrato Sintético Poly (Glu 4: Tyr 1) em miométrio normal e mioma humanos.....	34
Expressão do substrato do receptor de insulina-1 em miométrios e miomas.....	38

DISCUSSÃO42

CONCLUSÕES47

BIBLIOGRAFIA48

RESUMO

Objetivos: determinar a atividade de tirosina quinase do receptor de insulina-fosforilação de substrato exógeno poly (Glu 4: Tyr 1)- e expressão do substrato do receptor de insulina 1 em miométrio normal e mioma. **Delineamento:** estudo experimental. **Pacientes:** mulheres com miomas submetidas a histerectomia. **Intervenção:** frações de membrana plasmática células de miométrio e mioma foram preparadas e a seguir as amostras foram estimuladas com e sem insulina e incubadas com o substrato exógeno poly (Glu 4: Tyr 1). Para estudar a expressão de IRS-1, lisato total dos tecidos foi utilizado. *Western blots* utilizando anticorpos específicos foram realizados. **Principais medidas:** medida da incorporação de radioatividade (^{32}P -ATP) nas frações de membrana plasmática incubadas com e sem insulina. Quimioluminescência seguida por densitometria foi usada para avaliar expressão de IRS-1. **Resultados:** níveis de IRS-1 em miométrio ($0,190 \pm 0,022$) e mioma ($0,226 \pm 0,022$) não foram diferentes ($p > 0,05$). A fosforilação do substrato exógeno poly (Glu 4: Tyr 1) também não foi diferente entre miométrio ($1,566 \pm 0,177$) e em mioma ($1,98 \pm 0,612$) ($p > 0,05$). **Conclusão:** a expressão protéica de IRS-1 não foi diferente entre miométrios e miomas. A capacidade de fosforilar substratos exógenos com resíduos de tirosina foi semelhante em miomas e miométrios. Outras etapas da via de transdução do sinal da insulina podem estar envolvidas na proliferação alterada dos miomas.

ABSTRACT

Objective: to determine the IR tyrosine kinase activity- phosphorylation of exogenous substrate poly (Glu 4: Tyr 1) and insulin receptor substrate 1 expression in normal myometrium and leiomyoma. **Design:** experimental study. **Patients:** women with leiomyoma submitted to hysterectomy. **Intervention:** plasma membrane fraction of human myometrium and leiomyoma cells were prepared and samples were stimulated with and without insulin and incubated with exogenous substrate poly (Glu 4: Tyr 1). To study IRS-1 expression, a whole lysate was used. Western blots using specific antibodies were performed. **Main measures:** measurement of radioactivity (^{32}P -ATP) incorporated in plasma membranes incubated with and without insulin were performed. Chemoluminescent methods followed by densitometry were used to assess IRS-1 expression. **Results:** IRS-1 levels in myometrium (0.190 ± 0.022) and in leiomyoma (0.226 ± 0.022) ($p > 0.05$) were not different. The phosphorylation of the exogenous substrate poly (Glu 4: Tyr 1) was not different in myometrium (1.566 ± 0.177) and in leiomyoma (1.98 ± 0.612) ($p > 0.05$) too. **Conclusion:** There was no difference in IRS-1 expression and IR tyrosine kinase activity (phosphorylation of exogenous substrate) between normal myometrium and leiomyoma. Other steps of insulin signaling chain may participate in the altered proliferation of leiomyomas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Síntese da molécula de insulina.....	12
Figura 2. Modelo esquemático do receptor de insulina.....	16
Figura 3. Modelo esquemático da transdução do sinal da insulina.....	20
Figura 4 . Substratos do receptor de insulina.....	22
Figura 5. Fosforilação do polipeptídeo sintético poly(Glu 4:Tyr 1), (-) incubado com albumina e (+) com insulina.	35
Figura 6. Número de vezes que o estimulado (insulina) fosforilou mais que o basal (albumina).	37
Figura 7. <i>Western blot</i> com anticorpo anti-IRS-1.....	39
Figura 8. Expressão de β -actina.....	40
Figura 9. Expressão de IRS-1 em miométrio e mioma.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de adenosina
bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
cpm	Contagens por minuto
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Ditiotreitol
EGF	Fator de crescimento epidermal
Gab-1	Ligante-1
Glu	Glutamina
GLUT	Transportador de glicose
Grb2	<i>growth factor receptor bound 2</i>
GTP	Trifosfato de guanidina
HEPES	N-[2- hidroxietil] piperazina]- N- [2-ácido etanosulfônico]
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
IRS	Substrato do receptor de insulina
MAP-quinase	<i>Mitogen-activated protein Kinase</i>
Met	Metionina
NET	NaCl, EDTA, Tris
PH	<i>Pleckstrin homology</i>
PI3	Fosfatidil-inositol-3
PM	Peso molecular
PTB	<i>Phosphotyrosine binding</i>
PTyr	Fosfotirosina
Ras	<i>sarcoma homology</i>
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro

SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
SH	<i>Src – sarcoma homology</i>
Shc	<i>Src-homology collagen</i>
Sos	<i>Son-of-sevenless</i>
TCA	Ácido tricloroacético
Tris	Hidroximetil aminometano
Tyr	Tirosina
Val	Valina
X	Qualquer aminoácido

INTRODUÇÃO

Insulina

A insulina é um hormônio peptídico (PM = 5700 kDa), secretado pelas células β do pâncreas, formado por duas cadeias de aminoácidos – cadeias A e B com 21 e 30 resíduos, respectivamente - unidas entre si por duas pontes de dissulfeto (figura 1). A estrutura da insulina varia com a espécie do animal, sendo que, entre mamíferos, a seqüência difere apenas em alguns aminoácidos. A cadeia A é a parte mais exposta da molécula e, provavelmente, a responsável pela atividade da molécula (El-Salhy e cols., 1983; Ullrich, 1990).

Nos mamíferos, a insulina é o principal hormônio controlador dos níveis de glicose plasmática sendo, assim, responsável pela disponibilidade dos substratos energéticos. A insulina ainda promove outros eventos celulares, como a regulação do transporte de íons e aminoácidos, metabolismo dos lipídeos, síntese de glicogênio, proteínas e DNA. Através destas ações, a insulina mostra-se como elemento primordial para o armazenamento dos nutrientes absorvidos pela ingesta e para o crescimento e diferenciação celular. (White e Kahn 1994; Cheathan e Kahn, 1995; Marks e cols., 1996; Navarro e cols., 1999).

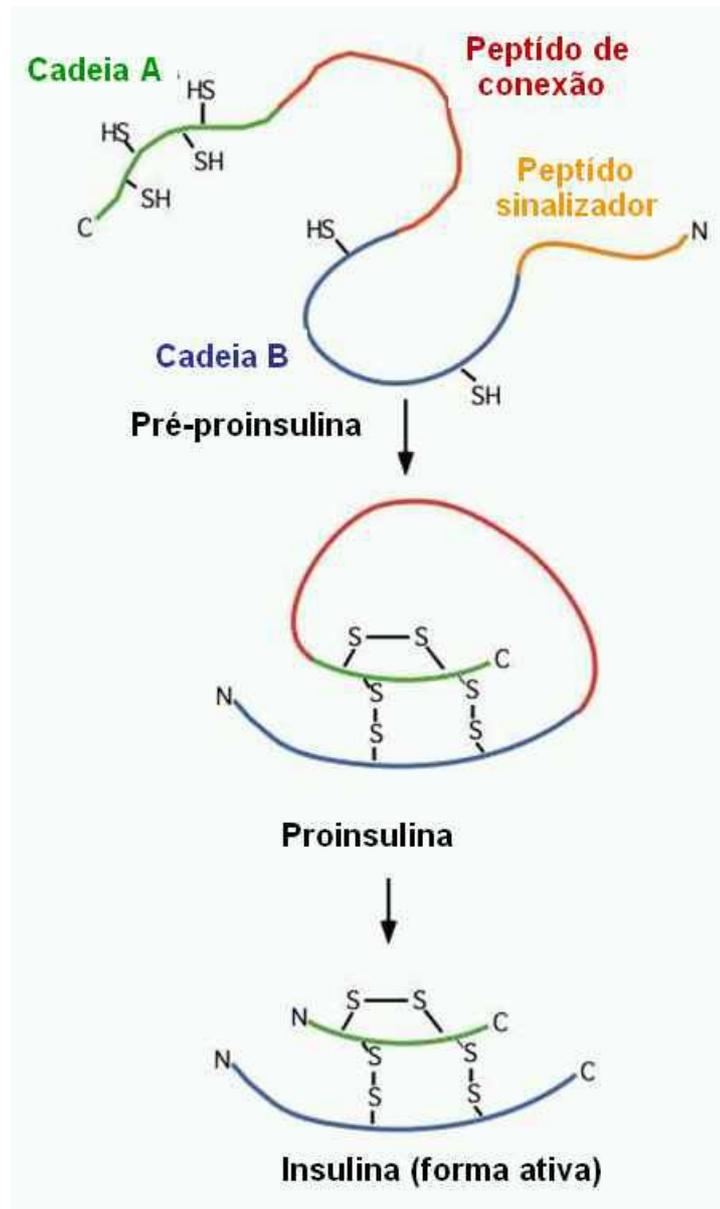


Figura 1. Síntese da molécula de insulina

O gene da insulina humana está localizado no cromossomo 11, e produz um RNAm que dirige a síntese de uma molécula chamada de pré-proinsulina (PM = 11500 kDa), que possui quatro peptídeos: um peptídeo sinalizador (cadeia B) um de conexão ou C, e a cadeia A. A perda do peptídeo sinalizador confere à molécula um peso molecular de 9000 kDa e 86 resíduos de aminoácidos, sendo, então, chamada de proinsulina. Após, no complexo de Golgi, ocorre a proteólise do peptídeo C com a formação da insulina (Le Roith, 1997).

Sua secreção, pelas células β , é controlada por vários fatores, como os níveis plasmáticos de glicose, de glucagon, de somatostatina e pelo sistema nervoso parassimpático. O principal regulador da secreção de insulina é a glicose, que entra nas células β através do transportador de glicose 2 (GLUT 2). O aumento da concentração de glicose ativa mecanismos para movimento de grânulos secretórios ao longo dos microtúbulos que levam à fusão das vesículas com a membrana plasmática e exocitose do hormônio (Bressler e Johnson, 1997).

Níveis circulantes elevados de insulina estão relacionados com aumento de risco para vários tipos de câncer e obesidade. Massa corporal é correlacionada com câncer de mama, colorretal, próstata, endométrio e ovário. Em mulheres pós-menopausa obesas, a hiperinsulinemia parece ser um marco para o aumento do risco de câncer de mama (Gupta e cols., 2002).

A ação da insulina se inicia com a ligação ao receptor na membrana celular. A ligação a este receptor, da família dos receptores tirosina quinase, desencadeia uma cascata de sinalização intracelular que leva ao aumento de transportadores de

glicose (GLUT 4) na superfície celular, ativa, entre outros, a síntese de DNA e a síntese de glicogênio.

Receptor de Insulina

O receptor de insulina pertence a uma grande família com mais de 50 membros, denominados “receptores de tirosina quinase” que inclui vários fatores de crescimento celular, e está presente em todos os vertebrados (Seedorf, 1995; Nystrom e Quon, 1999). Estudos filogenéticos mostraram que domínios catalíticos dessa família estão presentes em poríferos, sugerindo uma grande importância na evolução das espécies (Skorokhod e cols., 1999).

O receptor de insulina (\cong 350 kDa) é um heterotetrâmero composto de duas subunidades α e duas subunidades β (figura 2). O gene que codifica o receptor está localizado no cromossomo 19 e contém 22 exons e 21 introns, sendo os responsáveis pela atividade de tirosina quinase os exons 17 e 21 (White e Khan, 1994). As subunidades α têm sítios de ligação para a insulina e são completamente extracelulares. As subunidades β atravessam a membrana plasmática e possuem capacidade de tirosina quinase. As duas subunidades α estão ligadas por pontes de dissulfeto, e cada subunidades α se liga a uma subunidade β formando o heterotetrâmero (White e Khan, 1994; Pessin e Saltiel, 2000).

O seqüenciamento do receptor de insulina foi realizado em 1985 por Ebina e cols. (1985) e Ullrich e cols. (1985), que, ao mesmo tempo, identificaram duas isoformas do receptor de insulina (A e B). Estas isoformas se diferenciam pelo

splicing alternativo do exon 11 e têm afinidade, internalização e distribuição tecidual diferente (Kellerer e cols., 1993).

A subunidade α contém 719 ou 731 aminoácidos, dependendo da inclusão do exon 11 durante o processamento do RNAm, com uma peso molecular de aproximadamente 130 kDa (Ebina e cols., 1985; Ullrich e cols., 1985). Entre os resíduos 155 e 312, estão concentradas 21 resíduos de cisteína, sendo esse domínio denominado domínio rico em cisteína. Este domínio também é encontrado em outros receptores da família, como IGF-1 e EGF (Kido e cols., 2001; Cheatham e Kahn, 1995; Ullrich e cols., 1985).

A subunidade β contém 620 aminoácidos e tem peso molecular de 95 kDa, apresentando domínios extracelular, transmembrana e intracelular. O domínio intracelular possui atividade intrínseca de tirosina quinase e pode ser funcionalmente separado em subdomínios: um domínio justamembrana; um de ligação para o ATP, que se liga em um resíduo de lisina; um regulador de quinase, com 3 resíduos de tirosina (Tyr 1158, Tyr 1162, Tyr 1163), e um carboxi-terminal (Kido e cols., 2001; Ullrich e cols., 1985; Ebina e cols., 1985).

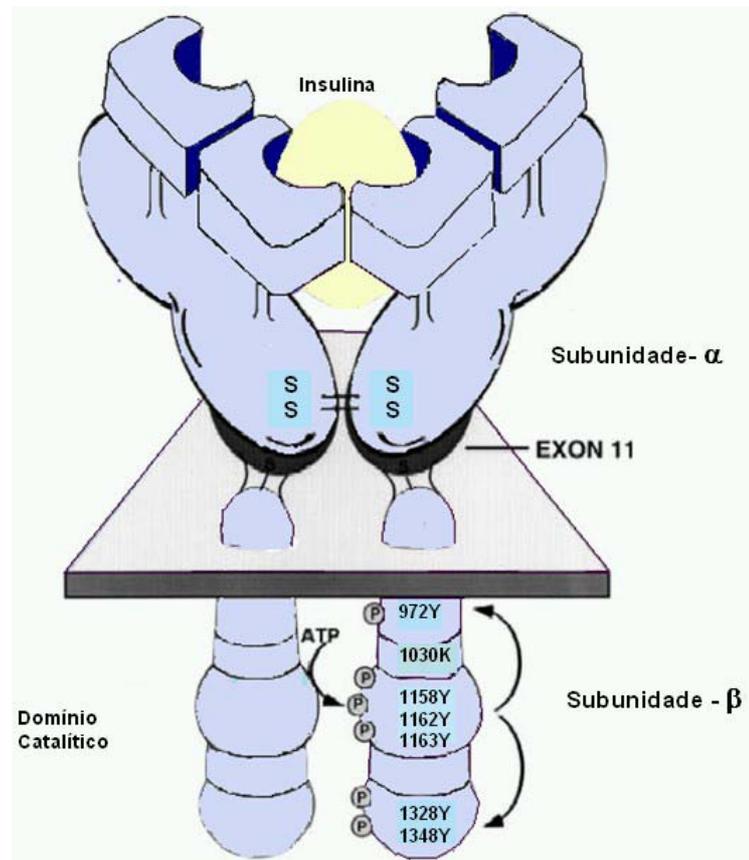


Figura 2. Modelo esquemático do receptor de insulina.

A subunidade α do receptor exerce um efeito inibitório sobre a potencial capacidade de tirosina quinase da subunidade β . A ligação da insulina causa uma mudança conformacional da subunidade α que perde essa capacidade de inibição, deixando, assim, a subunidade β capaz de se autofosforilar, fosforilar substratos citoplasmáticos e desencadear toda a resposta sinalizadora da insulina (Kido e cols., 2001; Ullrich e cols., 1985).

A autofosforilação do domínio catalítico do receptor - resíduos de tirosina 1158, 1162 e 1163 - é necessária para a atividade de tirosina quinase do receptor e para a fosforilação dos substratos citoplasmáticos. O papel da fosforilação dos resíduos de tirosina 1328 e 1334 do domínio C-terminal ainda não é claro, mas pode estar relacionado a diferenças quanto à sinalização insulina *versus* IGF-1, tendo em vista que o receptor de IGF possui apenas um resíduo de tirosina nessa região. (Kido e cols., 2001; Van Obberghen e cols., 2001; Cheatham e Kahn, 1995).

A insulina pode se ligar aos receptores para fatores de crescimento IGF-I e IGF-II. A afinidade da insulina é 100 a 1000 vezes maior pelo receptor de insulina do que para estes receptores. Os níveis plasmáticos de IGF-I são aproximadamente 100 vezes maiores que os de insulina, tornando possível sua ação através do receptor de insulina. O IGF-II possui a mesma afinidade para ambos os receptores de insulina e IGF- I (Kido e cols., 2001; Van Obberghen e cols., 2001).

A modulação da atividade de tirosina quinase do receptor de insulina parece ser realizada pela fosforilação em sítios de serina e treonina (Pederson e cols., 2001;

Kellerer e cols., 1995a). Serina 1306 é um sítio candidato a responsável por esta modulação.

Transdução do Sinal de Insulina

Quando a insulina se liga à subunidade α do seu receptor, ocorre uma mudança na estrutura quaternária da subunidade β que permite a ligação do ATP no resíduo de lisina 1030. Com o ATP ligado, o domínio quinase sofre uma rotação ao longo do seu eixo principal e em direção ao domínio carboxi-terminal da subunidade β . Ocorre, então, a fosforilação nos 3 domínios de tirosina de uma subunidade. Esses domínios causam a fosforilação dos sítios ativos da outra subunidade β num modelo chamado de transfosforilação (Kido e cols., 2001).

Após a autofosforilação, as primeiras proteínas a serem fosforiladas são os substratos do receptor de insulina (IRS-1 a 4). O IRS-1 fosforilado liga-se tanto ao domínio SH2 da *growth factor receptor bound 2* (Grb2), ativando a via de sinalização dependente da Ras, quanto à PI₃-quinase (Seedorf, 1995). Após a ligação da insulina e a respectiva autofosforilação do receptor, podem ocorrer vários eventos de sinalização intracelular (figura 3). O papel dos IRS-1 e IRS-2 parece ser fundamental para a sobrevivência. A falta ou disfunção do IRS-2 está associada à resistência à insulina e a ablação de IRS-1 e IRS-2 em ratos resultou em morte de embriões, resultado mais letal que a falta do próprio receptor de insulina ou de IGF-I, o que sugere que as proteínas IRSs são também segundos mensageiros citoplasmáticos de outros receptores (Kido e cols., 2001).

Os domínios SH (*Sarcoma-Homology*) são encontrados em diversas proteínas das vias de transmissão de sinal (Cheatham e Kahn, 1995). A função primária é ligar-se a fosfotirosinas e, desta forma, ativar as proteínas para transmitir a função adequada. Experimentos usando técnicas combinadas demonstraram que a especificidade é determinada pelos aminoácidos localizados após o sítio de fosfotirosina (Whitehead e cols.,2000). Os domínios SH1 têm ação catalítica, isto é, atividade de tirosina quinase. Os domínios SH2 e SH3 mediam interações proteína-proteína em vias de sinalização intracelular, e são freqüentes fora da família de proteínas com domínios SH. O SH2 se liga a peptídeos com consenso PTyr-Met/Val-X-Met e o SH3 interage com peptídeos ricos em prolina. O SH4 está envolvido com miristilação e sinal de localização de membrana (Accili, 2001).

A Grb2 é uma proteína acopladora que possui domínios SH2 e SH3. O domínio SH2 liga-se ao IRS-1, ativando a p21ras que regula a atividade GTPase, enquanto o domínio SH3 se liga na proteína Sos (De Fea e Roth, 1997).

A PI₃-quinase é uma enzima heterodimérica composta de uma subunidade regulatória (p85) e de uma subunidade catalítica (p110). A p85 contém o domínio SH2, que se liga ao IRS-1 e a p110 possui o domínio SH3, que se ligará a outras proteínas (Cheatham e Kahn, 1995). A PI₃-quinase liga fosfoinositídeos da membrana, catalisando sua fosforilação. Isso gera vários mediadores que estão envolvidos com a captação de glicose e síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas, bem como com a modulação da expressão gênica (Shepherd e Kahn, 1999; Accili, 2001).

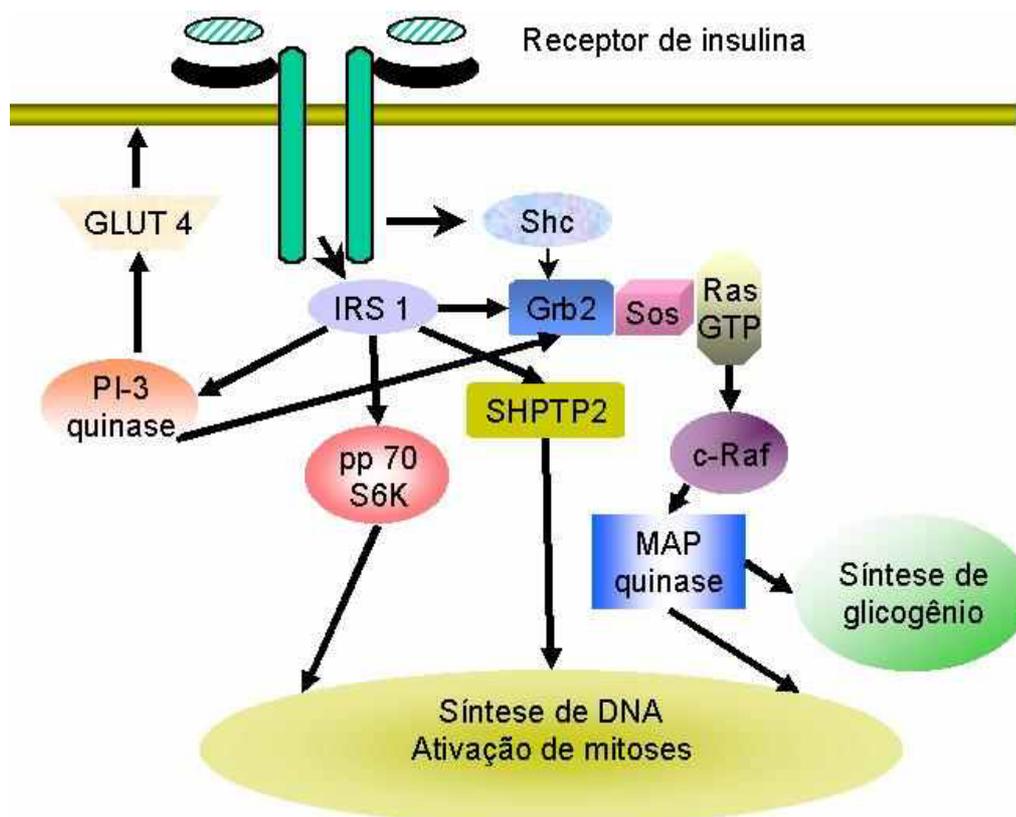


Figura 3. Modelo esquemático da transdução do sinal da insulina.

Substratos do receptor de insulina

A família de substratos do receptor de insulina apresenta nove membros: quatro substratos do receptor de insulina (IRSs), as proteínas IRS-1, IRS-2, IRS-3, e IRS-4; três proteínas Shc (*Src-Homology Collagen*); Grb-2 (*growth factor receptor bound-2*) associado ao ligante-1 (Gab-1) e p62 (figura 4) (Van Obberghen e cols., 2001).

Os quatro IRSs têm um domínio comum na sua porção NH₂-terminal – *pleckstrin homology* (PH), seguidos de um domínio de ligação de fosfotirosina – PTB (*phosphotyrosine binding*) - e um domínio terminal de COOH-terminal, de tamanhos variados, com sítios potenciais para fosfotirosinas. Alguns desses sítios têm sido identificados como sítios para ligação domínios SH2, ativando uma série de sinalizadores como PI₃-quinase, Grb2 e SHP-2. Ambos os domínios, PH e PTB, são altamente conservados nos quatro IRSs, mas o domínio COOH-terminal é pouco conservado. Os pesos moleculares das proteínas IRSs são; 185kDa para IRS-1, 190kDa para IRS-2, 60kDa para o IRS-3 e 160kDa para IRS-4. As três proteínas SHC (pesos moleculares 46kDa, 52kDa e 66kDa) têm em seu domínio carboxi-terminal domínios SH2. Gab-1 (peso meolecular 77kDa) não possui o domínio PTB, mas seu domínio terminal tem vários sítios de fosfotirosinas (Van Obberghen e cols., 2001).

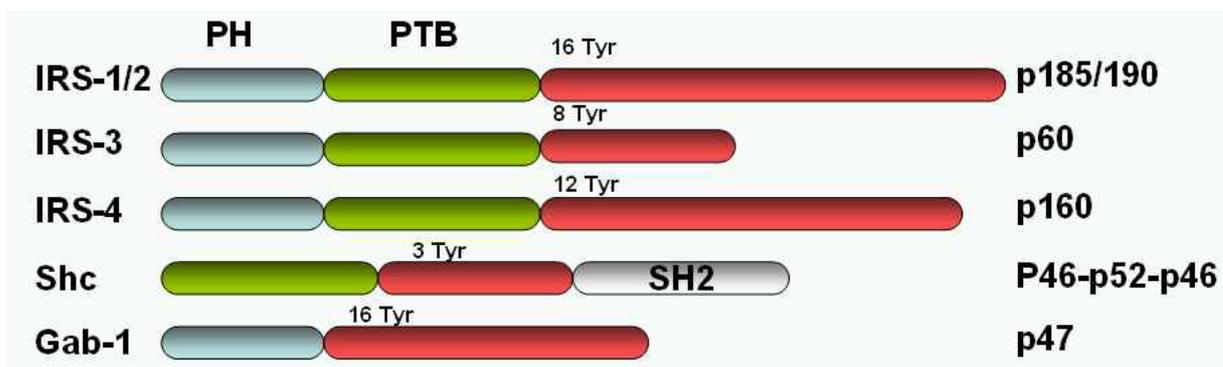


Figura 4 . Substratos do receptor de insulina

Enquanto são bem descritas as funções dos IRS-1 e IRS-2 nas ações metabólicas da insulina, o papel do IRS-3 e do IRS-4 é pouco claro. O IRS-4 não é encontrado no músculo esquelético e nos adipócitos. O IRS-3 no adipócito não parece fosforilar níveis significativos de PI_3 quinase, enzima que catalisa a fosforilação de grupos fosfatidil-inositol, que desencadeiam ações intracelulares (Whitehead e cols., 2000). O IRS fosforilado pode ativar várias proteínas de sinalização, como PI_3 quinase e Grb_2 , mediadores que estão envolvidos com a captação de glicose, síntese de glicogênio e expressão gênica (Seedorf, 1995; Shepherd e Kahn, 1999; Accili, 2001).

O IRS-1 é o principal substrato do receptor de insulina e contém 22 sítios potenciais para fosforilação de tirosina, sendo pelo menos, oito tirosinas do IRS-1 fosforiladas após a ligação da insulina com o receptor. O substrato se liga a proteínas como IP_3 -quinase, que possuem domínios SH2, através dos vários sítios de tirosina (White e Kahn, 1994; Seedorf, 1995). A extinção dos IRS-2 causa, nos tecidos periféricos, resistência à insulina associada a um crescimento deficiente das células β pancreáticas, sugerindo que seu gene apresente alguma associação com o diabetes tipo II (Kido e cols., 2001).

Miométrio e mioma

O útero é um órgão formado por músculo liso, o miométrio e por epitélio glandular, o endométrio. É no endométrio que ocorrem alterações cíclicas causadas

pelos hormônios esteróides ovarianos, estrogênio e progesterona, constituindo as fases proliferativa e secretora.

A túnica muscular do útero, ou miométrio, é formada por feixes de músculo liso, sendo sua parte mais profunda amplamente vascularizada, havendo, porém, mais tecido fibroso no istmo e cérvix do que no corpo e no fundo (Palmer e cols.,1998).

Os miomas são tumores benignos que se desenvolvem no miométrio em um grande número de mulheres e se tornam sintomáticos apenas em um terço delas. Cerca de 25% da população feminina apresentam miomas, sendo que essa freqüência aumenta para 77% quando são realizados exames patológicos cuidadosos e novas técnicas de imagem (Stewart, 2001). Estes tumores são os maiores responsáveis por histerectomias nos Estados Unidos. Entretanto, sua etiologia não é clara, sendo descritos fatores de predisposição que incluem, idade (mulheres menopáusicas), etnia, mulheres nulíparas, e obesidade (Stewart, 2001; Flake e cols., 2003). Tanto o miométrio quanto os miomas têm baixa atividade mitótica, porém os miomas apresentam grandes quantidades de matriz extracelular o que pode explicar o rápido crescimento desse tecido (Palmer e cols.,1998).

Anormalidades citogenéticas têm sido encontradas em aproximadamente 40% destes tumores examinados (Flake e cols., 2003), sendo as mais freqüentes a translocação entre os cromossomos 12 e 14, a trissomia do 12, a deleção do 7 e o rearranjo envolvendo o braço longo do 12 e o curto do cromossomo 6 (Chaves e cols., 2001).

Estrogênio e progesterona são reconhecidamente apontados como promotores de crescimento desse tumor (De Leo, 2001; Flake e cols., 2003). Durante o período reprodutivo e a gravidez ou, ainda, após o uso de contraceptivos orais, ocorre o aumento no crescimento desses tumores. Com a diminuição dos níveis estrogênicos na pós-menopausa ocorre a regressão desse tecido (Maruo e cols., 2000).

Os principais sintomas dos miomas são hemorragia, dor suprapúbica e, não raramente, infertilidade e abortamentos podem ocorrer (Giudice e cols., 1993; Stewart, 2001). O sangramento e as dores podem causar anemia e transtornos sociais, como o aumento de faltas no trabalho, sintomas urinários, e constipação (Stewart, 2001).

O tratamento pode ser medicamentoso ou cirúrgico. A administração de um agonista do Hormônio liberador do hormônio do crescimento (GnRH) é a principal terapia medicamentosa. Estes agonistas causam uma dessensibilização dos receptores, diminuindo os níveis de gonadotrofinas, o que reduz o volume uterino em 35 a 65 %. Contudo, produzem diversos efeitos colaterais, como osteopenia, sendo administrados apenas por períodos curtos de 3 a 6 meses, com a finalidade de diminuição dos tumores para remoção cirúrgica (Stewart, 2001). A histerectomia elimina tanto os sintomas quanto as chances de recidiva (Stewart, 2001).

A via de transdução da insulina envolve uma série de fosforilações que têm como resultado o crescimento celular e a promoção de síntese protéica, o que leva a um crescimento tecidual. A insulina e outros fatores de crescimento têm sido apontados como promotores de crescimento em alguns tumores (Grupta e cols.,

2002). Estudar a via de transdução do sinal de insulina nesse tecido é importante para apontar possíveis responsáveis pela diferenciação e pelo crescimento dos miomas. Em um trabalho recente, realizado em nosso laboratório, detectou-se que a expressão protéica e de RNAm para o receptor de insulina era semelhante em miomas comparando com miométrios saudáveis das mesmas pacientes. Como não houve diferença quanto à atividade de tirosina quinase dos receptores das células tumorais comparando-se com as normais, estudos na via de sinalização, como a fosforilação e a expressão de substratos do receptor de insulina podem contribuir para elucidar o envolvimento desse hormônio no desenvolvimento do mioma.

OBJETIVOS

Verificar e comparar a capacidade do receptor de insulina de fosforilar substratos citoplasmáticos nestes dois tecidos.

Comparar a expressão de IRS-1 em miomas e miométrios humanos.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento do estudo

Foi realizado um estudo de caso-controle, retrógrado, prospectivo.

População e amostra

Participaram deste estudo mulheres que foram à histerectomia no Serviço de Ginecologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As pacientes foram informadas e autorizaram a utilização de parte do material para estudo do receptor de insulina (consentimento informado – anexo A). Este projeto foi submetido à Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (projeto no. 99/294) e está ética e metodologicamente de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde).

As pacientes não utilizavam medicação hormonal e não eram diabéticas. O tecido foi proveniente de cirurgias por indicação do médico da paciente, não tendo influência deste protocolo de pesquisa. O material obtido (mioma e miométrio) foi logo congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C até ser preparado por

técnicas reconhecidamente efetivas no estudo da atividade do receptor de insulina humano (Kellerer e cols., 1995b; Capp e cols., 1996).

Fosforilação do substrato sintético poly(GLU 4:TYR 1)

A atividade de fosforilação do substrato sintético poly(GLU 4:TYR 1) foi analisada pelo método descrito por Braun e cols. (1984), com algumas modificações. Para essa análise, foi utilizado material de 12 pacientes, sendo 12 miomas e 12 miométrios. Os tecidos foram coletados conforme já descrito e suas frações de membrana plasmática foram separadas.

Tecidos miometriais e miomas foram homogeneizados em um ultra-turrax por 40 segundos em velocidade 3 numa temperatura de 4°C na presença de uma solução tampão de 100 mM fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF), 10 mM de TRIS, 1 mM de EDTA e 250 mM de sacarose. O homogeneizado foi então centrifugado por 5 min a 3.000 x g, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e centrifugado por 20 min a 30.000 x g a 4°C e o precipitado ressuspendido em 500 µL HEPES 25 mM, pH 7,4. A concentração de proteínas das amostras foi quantificada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Do material preparado, 40 µg de proteína foram incubados por 30 minutos a 25°C com 100 nM de insulina bovina ou 100 nM de albumina bovina (controles). A seguir, as amostras foram incubadas por 10 minutos a 25°C com 0,5 µCi [γ ³²P] ATP (3.000 µCi/nmol) em presença de 5 µM de ATP não marcado. Após, foi adicionado às amostras de cada tratamento 1 mM do substrato sintético poly(Glu 4:Tyr 1) por 1 hora a 25°C. A reação foi interrompida ao se pipetar toda a amostra de incubação

(aproximadamente 50 µl) em um papel de fosfocelulose (Aronowski e cols., 1992). Seguiram-se uma lavagem com TCA (ácido tricloroacético) 10% e três lavagens com ácido fosfórico 75 mM. A incorporação de [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP ao substrato exógeno foi medida em um contador beta LKB[®], utilizando líquido de cintilação.

Como controle para o experimento, foi utilizado músculo esquelético de ratos Wistar normais, preparado e incubado da mesma maneira que as amostras de mioma e miométrio.

Western blots

Com base nos trabalhos de Beisiegel (1986) e Gershoni e Palade (1983), foi realizada a técnica de *western blot*, com algumas modificações. Para separação das proteínas, foi utilizado SDS-PAGE (eletroforese de gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio) com uma concentração de poliacrilamida de 7,5%. Foi utilizada uma minicuba Mini-VE (Amersham Pharmacia) para o preparo dos géis, onde a solução de poliacrilamida foi colocada para polimerização dos monômeros de acrilamida e bis-acrilamida (30:1). Foram preparados dois géis, um gel de separação - gel onde as amostras eram separadas - e um de compactação (*stacking*). Primeiramente era colocado o gel de separação e, após sua polimerização, era colocado o gel de compactação. Neste, era colocado um pente de plástico para formação de poços, onde eram posteriormente depositadas as amostras (Wilson e Walker, 1994).

Foram preparados homogeneizados teciduais totais de mioma e de miométrio que continham as proteínas IRS-1 para verificar sua expressão nesses tecidos. A proteína constitutiva β -actina foi utilizada para normalização e comparação dos resultados.

Para preparação dos homogeneizados celulares, aproximadamente 0,5 g de mioma e 0,5 g miométrio foram homogeneizados separadamente em 500 μ l de um tampão contendo HEPES 50 mM, pH 7,5, PMSF 1 mM, 10 μ g/mL aprotinina, Fluoreto de sódio (NaF) 100 mM, pirofosfato de sódio ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) 10mM, ortovanadato de sódio (NaVO_4) 2 mM, Triton X-100 1%. Após homogeneização, foram solubilizados por agitação por 16 h a 4°C. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 30 min a 4°C e coletado o sobrenadante para separação em SDS-PAGE 7,5%. A concentração de proteínas das amostras foi quantificada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Aproximadamente 50 μ g de proteína total de cada amostra foram desnaturadas em solução de Laemmli (glicerol 30%, SDS 10%, Tris 62,5 mM, DTT 750 mg e 0,001 % azul de bromofenol) a 95°C por 10 min, e colocadas em cada poço do gel de compactação. A eletroforese foi efetuada na presença de tampão contendo glicina 192 mM, Tris 25 mM e SDS 0,1%, pH 8,3. As proteínas correram no gel por aproximadamente 3 h, submetidas a uma voltagem de 100 v. A corrida das proteínas foi monitorada pelo azul de bromofenol, presente no tampão de amostra e pelo marcador de peso molecular.

Depois de efetuada a eletroforese, o gel de poliacrilamida foi retirado das placas de vidro e colocado no aparato de eletrotransferência em contato com a

membrana de nitrocelulose, coberto com tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol 10%, pH 8,3). A transferência foi efetuada por 1 h e 30 min, com voltagem de 25V.

As membranas de nitrocelulose foram então incubadas durante 1 hora em solução bloqueadora (NET), contendo NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Tris 50 mM, Triton X-100 0,05%, leite em pó desnatado 5%, pH 7,4. Esta solução foi utilizada para saturar sítios de ligação inespecíficos da membrana de nitrocelulose.

Após o bloqueio com NET, as membranas de NC foram incubadas por 16 h sob agitação constante a 4°C, com o anticorpo anti-IRS-1 (Upstate Biotechnology). Após a incubação, as membranas foram lavadas com NET (5 vezes durante 10 min cada vez). A seguir, as membranas foram incubadas com o segundo anticorpo anti-rabbit por 1 hora e lavadas novamente com NET (5 vezes durante 10 min cada vez). Finalmente, as membranas foram incubadas com solução para quimio-luminescência (ECL) por 1 minutos.

Para detecção da proteína β -actina (45 kDa), usada para normalizar os resultados do IRS-1, foi realizada uma eletroforese em gel de acrilamida 10 % sendo, em seguida, corado com *coomassie blue* para visualização e quantificação.

Revelação das Autorradiografias

Após a incubação com solução para quimio-luminescência, as membranas de NC foram colocadas em contato com o filme autorradiográfico por aproximadamente 15 segundos. Para revelação, o filme foi colocado na solução reveladora por 1

minutos lavado com ácido acético e colocado por mais 1 min na solução fixadora. Todos os procedimentos de revelação foram realizados em uma câmara escura.

Após a revelação, seguiram-se a visualização por densitometria no equipamento Image Master VDS, *Amershan Pharmacia Biosciences*, para identificar as bandas e quantificar a densidade, permitindo a comparação e a análise dos resultados.

Análise Estatística

Para análise estatística foi realizado um teste t de Student para comparação de médias de amostras pareadas. Foram comparadas as médias do grupo teste (mioma) contra o controle (miométrio normal), tanto para os resultados com o substrato sintético, como para a proteína IRS-1. Foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$.

RESULTADOS

Fosforilação do Substrato Sintético Poly (Glu 4: Tyr 1) em miométrio normal e mioma humanos.

A capacidade dos receptores de insulina de miomas e miométrios humanos fosforilarem o substrato sintético poly(Glu 4: Tyr 1) foi avaliada após a incubação com a insulina e ATP marcado e comparada com controle (albumina). A incorporação de ATP marcado foi quantificada em contador beta. A figura 5 mostra a fosforilação do substrato estimulado por insulina nos tecidos, músculo esquelético de ratos Wistar, miométrio normal e mioma humanos.

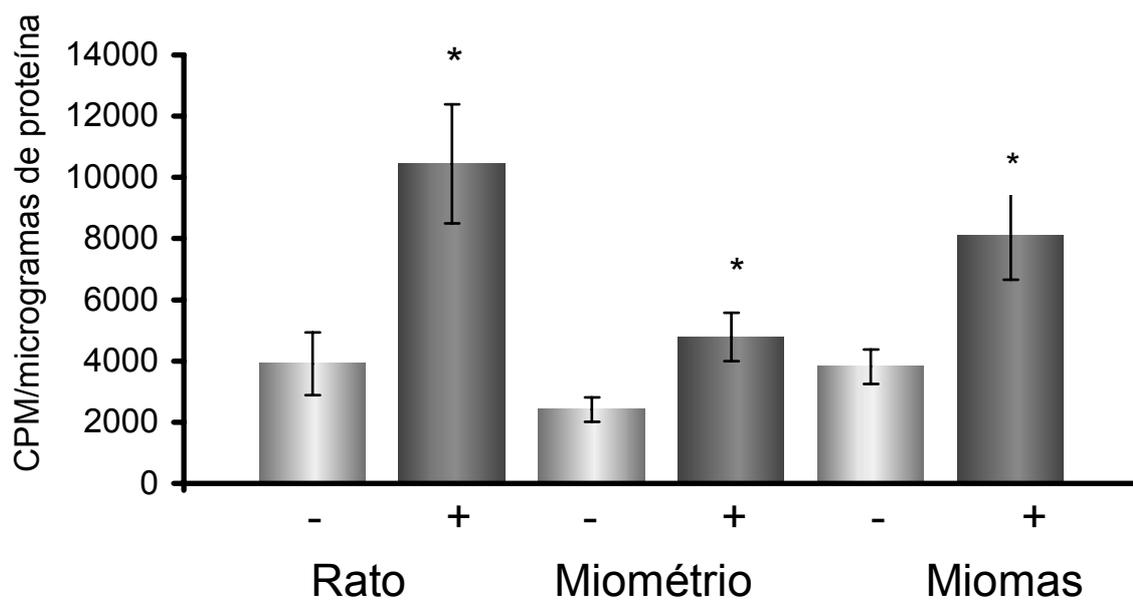


Figura 5. Fosforilação do polipeptídeo sintético poly(Glu 4:Tyr 1), (-) incubado com albumina e (+) com insulina

(*P < 0,05 em relação ao controle sem insulina).

A incorporação de fosfato radioativo ao substrato sintético, demonstrada no gráfico em cpm/microgramas de proteína, foi significativamente maior nas amostras incubadas com insulina (estimulada) quando comparadas com as incubadas com albumina (basal) (tabela 1).

Tabela 1: Fosforilação do substrato sintético poly (GLU 4: TYR 1) (em cpm/ μ g de proteína).

	Rato (n = 4)		Normal (n = 12)		Tumor (n = 12)	
	-	+	-	+	-	+
Insulina						
Média	3909,89	10439,6	2419,2	4780,5	3814,81	8071,757
EPM	1019,82	1938,71	398,02	789,29	562,55	1413,104
	*p < 0,001		*p < 0,001		*p < 0,001	

Teste t de Student para amostras pareadas

EPM- erro padrão da média

Para a comparação entre a capacidade de fosforilação de substratos (atividade de tirosina quinase) do receptor de insulina de miométrios e miomas foi calculada a relação estimulada/basal de cada amostra, como mostrado na figura 6.

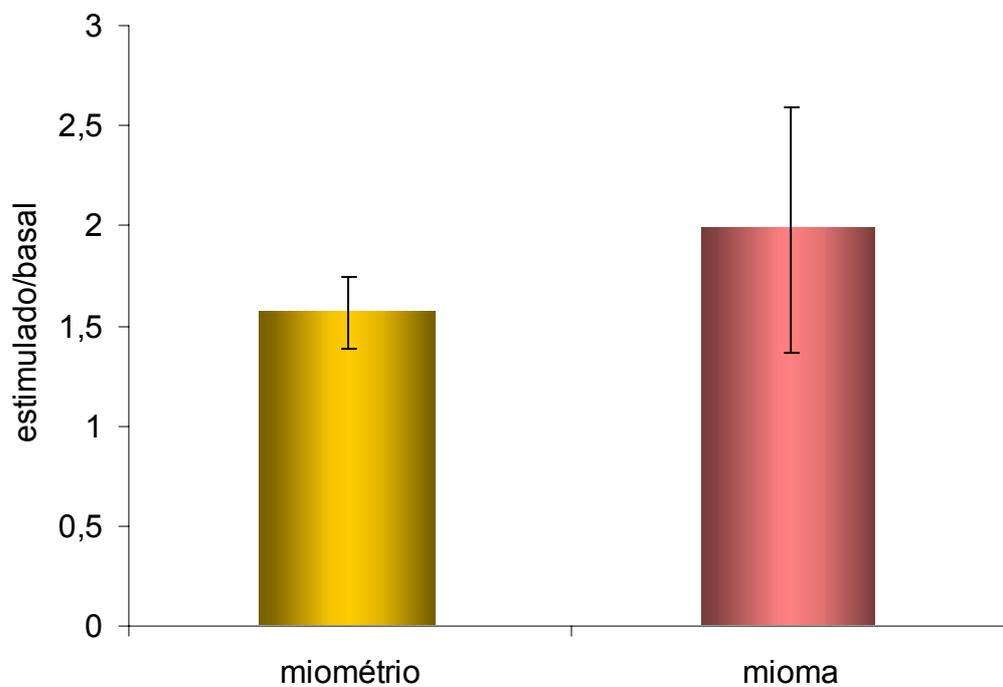


Figura 6. Número de vezes que o tecido estimulado (incubado com insulina) fosforilou mais do que o basal (incubado com albumina)

Não houve diferença estatística entre a relação estimulado/basal no miométrio e no mioma ($p > 0,05$).

O quanto a insulina estimulou a fosforilação do substrato sintético poly(Glu 4:Tyr 1), expresso pela relação estimulado/basal, não apresentou diferença entre miométrio ($1,566 \pm 0,177$) e mioma ($1,98 \pm 0,612$). O miométrio e o mioma apresentaram capacidades de fosforilar o substrato polipeptídico sintético semelhantes. O poder estatístico calculado desta amostra foi de 80 %.

Expressão do substrato do receptor de insulina-1 em miométrios e miomas

Para verificar a expressão da proteína IRS-1, foi utilizada a técnica de *western blot*. A figura 7 mostra uma autorradiografia representativa dos tecidos, na qual foi utilizado anticorpo para a proteína IRS-1.

Um método confiável e fácil para quantificação de proteínas em amostras, principalmente não purificadas, a coloração de um SDS-PAGE com *coomasie blue* foi utilizado como proposto por Nemetz e cols. (2001). Esse método foi utilizado para identificação da proteína β -actina, que é constitutiva e amplamente utilizada para normalizar as quantidades de proteínas em SDS-PAGE géis de agarose para *polimerase chain reaction* (PCR) (Sigalet e Martin, 1998; Khanna e cols., 2000) (figura 8).

A figura 9 mostra um resultado da proteína β -actina que foi corada com *comassie blue*. As bandas de 45 kDa, correspondentes a tiveram as densidades analisadas e utilizadas para normalização dos *western blots*.

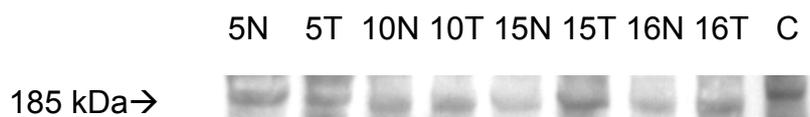


Figura 7. *Western blot* com anticorpo anti-IRS-1

Autoradiografia representativa de *western blot* utilizando anticorpo anti-IRS-1 em miométrios (N) e miomas (T). Quantidades iguais de proteínas das amostras foram separadas em um SDS-PAGE 7,5 %, e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Amostras de músculo de ratos Wistar preparadas da mesma maneira foram utilizadas como controle (C).



Figura 8. Expressão de β -actina

As proteínas foram separadas em SDS-PAGE 10 %, e, após, a membrana de nitrocelulose foi corada com comassie blue. As bandas de 45 kDa, correspondentes à β -actina, tiveram as densidades analisadas e utilizadas para normalização dos *western blots*.

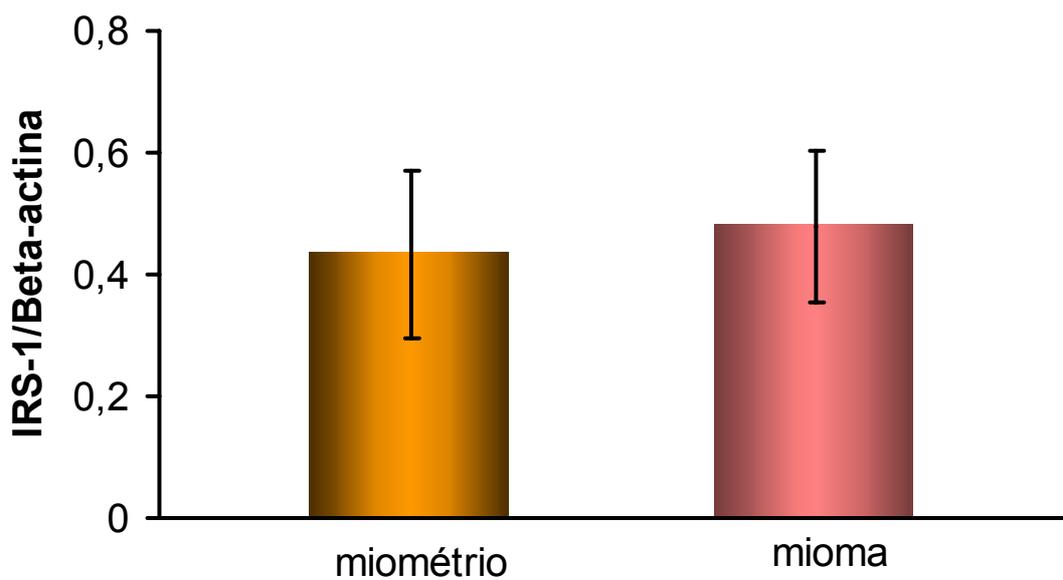


Figura 9. Expressão de IRS-1 em miométrio e mioma

A expressão de IRS-1 foi analisada após a normalização com a proteína constitutiva β -actina. Não houve diferença entre miométrio ($0,190 \pm 0,022$) e mioma ($0,226 \pm 0,022$) ($p > 0,05$).

DISCUSSÃO

Miomas uterinos representam um grande problema de saúde pública. Esses tumores provavelmente se desenvolvem na maioria das mulheres e tornam-se sintomáticos em um terço delas (Flake e cols., 2003). Miomas são os maiores responsáveis por histerectomias, aproximadamente 290 mil por ano nos Estados Unidos (Chaves e cols., 2002).

Sua etiologia não é clara, sendo descritos fatores predisponentes como, idade (mulheres peri-menopáusicas), etnia (mulheres negras têm 3-9 vezes maior freqüência de miomas do que mulheres caucasianas), nuliparidade e obesidade. Anormalidades citogenéticas têm sido também encontradas em aproximadamente 40% dos tumores examinados. Estrogênio e progesterona são reconhecidamente apontados como promotores de crescimento para esse tumor (Flake 2002; Stewart, 2001; Marshall e cols., 1998).

A insulina tem sido descrita como fator carcinogênico. A hiperinsulinemia está associada com aumento do risco de carcinoma endometrial, renal, colorretal e mamário (Corleta e cols., 1996; Kelerrer e cols., 1995). Há evidências de que a insulina atue como fator de crescimento para formação de tumores (Gupta e cols., 2002; Corpet e cols., 1997). O mecanismo de desenvolvimento neoplásico mediado por insulina pode incluir aumento da síntese de DNA, resultando no crescimento do

tumor, inibição da apoptose celular e alteração do ambiente hormonal induzidos pelos esteróides sexuais.

A redução dos níveis de insulina com exercício físico, baixo peso, e dieta rica em fibras pode diminuir os riscos de câncer. O papel de novos fármacos que recuperam a sensibilidade para insulina, reduzido assim a hiperinsulinemia, é um potencial sítio de ação para prevenção de câncer (Gupta e cols., 2002).

Heuson e cols. (1967) descreveram a proliferação de carcinoma mamário induzidos por insulina em ratos. Subseqüentemente, Osborne e cols. (1978) demonstraram a regulação do crescimento do câncer de mama humano por insulina. Nos carcinomas de cólon, estômago e mama, foram detectados aumentos dos níveis de insulina quando comparados com os grupos controle (Yan e cols., 1996). A insulina aumenta a proliferação celular de linhagens de células tumorais pancreáticas humanas (Fisher e cols., 1996), e é também um promotor de crescimento em cultura de células cancerígenas do intestino humano (Cezard e cols., 1981). Esses efeitos de crescimento da insulina parecem ser mediados através de seus receptores (Nagarajan e Anderson, 1982). Tran e cols. (1996) demonstraram um aumento no crescimento de tumores de cólon em ratos que receberam insulina. A insulina parece exercer um efeito direto no crescimento do epitélio do cólon resultando em neoplasia (Giovannucci, 1995).

No presente trabalho, foi avaliada a atividade de tirosina quinase do receptor de insulina através de sua capacidade de fosforilar o substrato sintético poly (Glu 4: Tyr 1). Através dessa técnica, foi possível verificar que os receptores de insulina de miométrios normais e miomas, quando estimulados por insulina, têm suas tirosinas

quinases atuando com capacidades semelhantes. Esses dados somam-se aos encontrados por Toscani e cols. (2003), em um estudo no qual foi avaliada a capacidade de autofosforilação do receptor de insulina em miométrio e miomas humanos. A atividade de tirosina quinase do receptor de insulina de miomas e miométrios normais foi semelhante.

Entretanto, as atividades de tirosina quinase basal e estimulada por insulina são maiores em carcinoma de cólon quando comparadas com tecidos normais de cólon, sendo o número de receptores de insulina no tumor 3 a 4 vezes maior que no tecido normal. Para o receptor de IGF-1, o número de receptores é duas vezes maior no tumor, comparado com o normal (Corleta e cols., 1996). Achados similares foram relatados em carcinomas de células renais (Kellerer e cols., 1995b). Nossos achados sugerem que os miomas têm receptores de insulina com a mesma capacidade de fosforilar seus substratos quando comparados com o tecido normal adjacente, diferentemente de carcinomas de cólon e de células renais que possuem a atividade dos receptores aumentada.

A expressão da proteína IRS-1, quantificada através de *western blots*, não mostrou diferença entre miométrios normais e miomas, sugerindo que há a mesma quantidade dessa proteína citoplasmática nas células tumorais e normais.

Aumento na expressão de IRS-1 está presente em câncer de pâncreas humano (Bergmann e cols., 1996). A expressão protéica é um ótimo parâmetro para avaliar o aumento na utilização de uma via, sendo o IRS-1 o principal substrato do receptor de insulina, encontrou-se uma atividade muito semelhante até esse ponto da sinalização da insulina. Aumento na fosforilação da tirosina do substrato do

receptor de insulina por insulina está associado com o aumento da ativação de mitoses facilitando o crescimento celular (Jackson e cols., 1998). É provável, então, que essa não seja a via de crescimento dos miomas.

Neste estudo, não foi avaliado o grau de fosforilação do IRS-1. Para avaliação da capacidade do receptor de insulina de fosforilar seus substratos foi utilizado o experimento de fosforilação do substrato exógeno poly (Glu 4: Tyr 1) acima mencionado.

A transdução do sinal de insulina envolve uma complexa cascata de fosforilações, inicialmente em resíduos de tirosina e posteriormente em resíduos de serina (Pederson e cols., 2001). Outras vias que utilizam quinases podem também ser envolvidas. Achados demonstraram que a insulina aumenta a proliferação celular de células pancreáticas e a utilização de glicose por ativar a via da MAP-quinase, da PI3-quinase e aumentar a expressão de GLUT 1 (Ding e cols., 2000).

A insulina tem sido apontada como um fator de crescimento para vários tipos de tumores, sendo encontradas evidências para um potencial aumento de sua ação via seu receptor ou seus substratos. Outros possíveis mecanismos pelos quais a insulina pode promover câncer incluem alterações da cinética do ciclo celular, como é visto em linhagens de células de câncer de mama. Também tem sido mostrado que a insulina pode inibir a morte celular induzida por ciclo-heximida (Geier e cols., 1992).

A inibição da apoptose celular através da família de proteínas do bcl-2 pode ser um dos fatores responsáveis pelo maior crescimento dos miomas. Porém, os fatores que influenciam no aumento das proteínas inibidoras da apoptose celular

devem ser ainda analisados. Embora os hormônios sexuais pareçam exercer pouca influência sobre os níveis de expressão da família do Bcl-2, proteína inibidora da apoptose celular nos miomas (Wu e cols., 2002), Maruo e cols. descreveram o aumento de Bcl-2 em miomas, comparados com miométrios normais, e sua regulação por progesterona.

Os substratos do receptor de insulina podem também influenciar na apoptose. Quando induzida por anti-EGFr, anticorpo monoclonal em linhagens de células de carcinoma colorretal, a apoptose pode ser retardada por insulina (Wu e cols., 1995). O retardamento da apoptose por insulina pode ser causado por estabilização dos componentes intracelulares e alteração da expressão de IRS-1 (Tanaka e Wands, 1996). Este retardo na morte celular pode facilitar o crescimento tumoral.

Os miomas apresentam grandes quantidades de matriz extracelular que inclui colágeno, fibronectina, proteoglicanos e tecidos inibidores de metaloproteínas, compostos que parecem ter papel chave para o crescimento dos miomas (Sozen e Arici, 2002). Vários fatores de crescimento ou hormônios podem influenciar o aumento e surgimento dos miomas através das vias de seus receptores aumentando a transcrição para novas proteínas da matriz extracelular ou DNA para divisão celular ou, ainda, alterando a expressão para inibidores da apoptose. Além disso, é possível que outras proteínas da cascata de sinalização da insulina possam estar aumentadas.

CONCLUSÕES

A capacidade de fosforilar substratos exógenos com resíduos de tirosina (poly Glu 4: Tyr 1) foi semelhante em miomas e miométrios estimulados com insulina, o que sustenta a proposta de que a atividade de tirosina quinase nesses tumores não está aumentada em relação ao tecido normal. Esta etapa da transdução do sinal de insulina parece não ser a responsável pela proliferação celular alterada desses tumores.

A expressão protéica de IRS-1, substrato chave na transdução do sinal da insulina, não foi diferente entre miométrios e miomas. Este achado também leva a concluir que estes tumores, diferentemente de outros, como o câncer de pâncreas, não utilizam esse substrato para ativar seu crescimento através dessa via de sinalização.

Estudos em etapas posteriores da via de transdução do sinal da insulina em miométrio e miomas permanecem ainda sem serem avaliados, sendo pertinente sua análise, como a via das MAP quinases e dos oncogenes, tais como c-fos, c-myc e c-jun.

BIBLIOGRAFIA

ACCILI D. Receptor tyrosine kinases. In: Leskiw SM, ed. **MCR Syllabus 2001: Introduction to molecular and cellular research**. Endocrine Society: Miami, FL, USA, 2001.

ARONOWSKI J, GIOTTA JC, WAXHAM MN. Ischemia induced translocation of Ca²⁺/calmodulin dependent protein Kinase II potential role in neural damage. **Jounal Neurochemistry**; 58: 1743- 1753, 1992.

BEISIEGEL U. Protein blotting. **Electrophoresis**. 7: 1-18, 1986.

BERGMANN U, FUNATOMI H, KORNMANN M, BEGER HG, KORC M. Increased expression of insulin receptor substrate-1 in human pancreatic cancer. **Biochemical and Biophysycal Research Communictions**. 27;220(3):886-90,1996.

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantites of protein utilizing the principle of protein – dye binding **Annals Biochemistry**. 72: 248- 254, 1976.

- BRAUN S, RAYMOND WE, RACKER E. Synthetic tyrosine polymeres as substrates and inhibitors of tyrosine-specific tyrosine kinase. **Journal Biology Chemistry.** 259: 2051- 2054, 1984.
- BRESSLER R, JOHNSON DG. Pharmacological regulation of blood glucose levels in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Archival Intern Medicine.** 157: 836-48, 1997.
- CAPP E, BRANDELLI A, MONEGO H, RIBEIRO MF, DE FREITAS MS, PUREUR R, TORTORELLA H, CORLETA H. Binding and tyrosine activity of insulin receptor in human normal and neoplastic endometrium. **Medical Science Research** 24: 621-23, 1996.
- CEZARD JP, FORGUE-LAFITTE ME, CHAMBLIER MC, ROSSELIN GE. Growth-promoting effect, biological activity, and binding of insulin in human intestinal cancer cells in culture. **Cancer Research.** 41:1148–53. 1981.
- CHAVES EM, CORLETA H, TOSCANI GK, CAPP E. Mimatose uterina – papel do IGF1e seu receptor. **Femina.** 30 (4): 255-259, 2002.
- CHEATHAM B, KAHN R. Insulin action and the insulin signaling network. **Endocrine Review.** 16: 117-41, 1995.
- CORLETA HE, CAPP E, CORLETA OC. Insulin receptor tyrosine kinase activity in colon carcinoma. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** 12: 1593-7, 1996.

- CORPET DE, JACQUINET C, PEIFFER G, TACHE S. Insulin injection promote the growth of aberrant crypt foci in the colon of rats. **Nutrition Cancer**. 27:316–20, 1997.
- DE FEA K, ROTH RA. Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation and function by mitogen-activated protein kinase. **The Journal of Biological Chemistry**. 272: 31400- 31406, 1997.
- DE LEO V. Administration of somatostatin analogue reduces uterine and myoma volume in women with uterine leiomyomata. **Fertility and Sterility**. 75: 632-3, 2001.
- DING XZ, FEHSENFELD DM, MURPHY LO, PERMERT J, ADRIAN TE. Physiological concentrations of insulin augment pancreatic cancer cell proliferation and glucose utilization by activating MAP kinase, PI3 kinase and enhancing GLUT-1 expression. **Pancreas**. 21(3):310-20, 2000.
- EBINA Y, ELLIS L, JARNAGIN K, EDERY M, GRAF L, CLAUSER E, OU JH, MASIAR F, KAN YW, GOLDFINE ID, ROTH RA, RUTTER WJ. The human insulin receptor cDNA: the structural basis for hormone activated transmembrane signalling. **Cell**. 40: 747-758, 1985.
- EL-SALHY M, FALKMER S, KRAMER KJ, SPEIRS RD. Immunohistochemical investigations of neuropeptides in the brain, corpora cardiaca and corpora allata of adult lepidopteran insect, *Maruduca sexta* (L.). **Cell and Tissue Research**. 232: 295-317, 1983.

- FISHER WE, BOROS LG, SHIRMER WJ. Insulin promotes pancreatic cancer: evidence for endocrine influence on exocrine pancreatic tumors. **Journal Surgery Research**. 63: 310-3, 1996.
- FLAKE GP, ANDERSEN A, DIXON D. Etiology and Pathogenesis of Uterine Leiomyomas: A Review. **Environmental Health Perspectives**. 111(8): 1037-1054, 2002.
- GEIER A, HAIMSHON M, BEERY R, HEMI R, LUNENFELD B. Insulinlike growth factor-1 inhibits cell death induced by cycloheximide in MCF-7 cells: a model system for analyzing control of cell death. **In Vitro Cell Development Biology** 28A(11-12):725-9, 1992.
- GERSHONI JM, PALADE GE. Protein blotting: principles and applications. **Annals of Biochemistry**. 131: 1-13, 1983.
- GIOVANNUCCI E. Insulin and colon cancer. **Cancer Causes Control**. 6:164-79. 1995.
- GIUDICE LC, IRWIN JC, DSUPIN BA, PANNIER EM, JIN IH, HOFFMAN AR. Insulin-like growth factor (IGF), IGF binding protein (IGFBP), and IGF receptor gene expression and IGFBP synthesis in human uterine leiomyomata. **Human Reproduction**. 8: 1796-806, 1993.
- GUPTA K, KRISHNASWAMY G, KARNAD A, PEIRIS N. Insulin: A Novel Factor in Carcinogenesis. **The American Journal of The Medical Science**. 323: 140-145, 2002.

HEUSON JC, COUNE A, HEIMANN R, Cell proliferation induced by insulin in organ culture of rat mammary carcinoma. **Experimental Cell Research**. 45: 351- 60, 1967.

JACKSON JG, WHITE MF, YEE D. Insulin Receptor Substrate-1 is the Predominant Signaling Molecule Activated by Insulin-like Growth Factor-I, Insulin, and Interleukin-4 in Estrogen Receptor-positive Human Breast Cancer Cells **The Journal of Biological Chemistry**. 273: 9994–10003, 1998.

KHANNA A, ROSSMAN JE, FUNG HL, CATY MG. Attenuated nitric oxide synthase activity and protein expression accompany intestinal ischemia /reperfusion injury in rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 269: 160-164, 2000.

KELLERER M, COGHLAN M, CAPP E, MUHLHOFER A, KRODER G, MOSTHAF L, GALANTE P, SIDDLE K, HÄRING HU. Mechanism of insulin receptor kinase inhibition in non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. Phosphorylation of serine 1327 or threonine 1348 is unaltered. **Journal Clinical Investigation**. 96(1):6-11, 1995a.

KELLERER M, CORLETA HVE, MÜHLHÖFER A, CAPP E, MOSTHAF L. BOCK S, PETRIDES PE, HÄRING HU. Insulin and insulin-like growth-factor-1 receptor tyrosine-kinase activities in human renal carcinoma. **International Journal of Cancer**. 62: 501-7, 1995b.

KELLERER M, SESTI G, SEFFER E, OBERMAIER-KUSSER B, PONGRATZ DE, MOSTHAF L, HÄRING HU. Altered pattern of insulin receptor isotypes in

skeletal muscle membranes of type 2 (non-insulin-dependent) diabetic subjects. **Diabetologia**. 36(7):628-32, 1993.

KIDO Y, NAHAE J, ACCILI D. The insulin receptor and its cellular targets. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 86: 972- 979, 2001.

LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 227: 680-5, 1970.

LE ROITH D, Insulin-like growth factors- Seminars in Medicine of the Beth Israel Deaconees Medical Center. **The New England Journal of Medicine**. 336: 633-9, 1997.

MARSHALL LM, SPIEGELMAN D, GOLDMAN MB, MANSON JE, COLDITZ GA, BARBIERI RL, STAMPFER MJ, HUNTER DJ: A prospective study of reproductive factors and oral contraceptive use in relation to the risk of uterine leiomyomata. **Fertility and Sterility**. 70: 432-9, 1998.

MARUO T, MATSUO H, SAMOTO T, SHIMOMURA Y, KURACHI O, GAO Z, WANG Y, SPITZ IM, JOHANSSON E. Effects of progesterone on uterine leiomyoma growth and apoptosis. **Steroids**. 65: 585-92, 2000.

NAGAMANI M, STUART CA.: Specific binding sites for insulin in the human myometrium. **Fertility and Sterility**. 58: 120-3, 1992.

NAGARAJAN L, ANDERSON WB. Insulin promotes the growth of F9 embryonal carcinoma cells apparently by acting through its own receptor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 106:974–80, 1982.

NAVARRO I, LEIBUSH B, MOON TW, PLISETSKAYA EM, BAÑOS N, MÉNDEZ E, PLANAS JV, GUTIÉRREZ J. Insulin, insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and glucagon: the evolution of their receptors. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 122: 137-53, 1999.

NEMETZ C, REICHHUBER R, SCHWEIZER R, HLOCH P, WATZELE M. Reliable quantification of in vitro synthesized green fluorescent protein: comparison of fluorescence activity and total protein levels. **Electrophoresis**. 22(5):v966-9, 2001.

NYSTROM HF, QUON MJ. Insulin Signalling: Metabolic Pathways and Mechanisms for Specificity. **Cell Signalling**. 11: 563- 574, 1999.

OSBORNE CK, MONACO ME, LIPPMAN ME, e cols. Correlation among insulin binding , degradation, and biological activity in human breast cancer cells in long-term tissue culture. **Cancer Research**. 38: 94- 102, 1978.

PALMER SS, HAYNES-JOHNSON D, DIHEL T, NOWAK R. Increased expression of stromelysin 3 mRNA in leiomyomas (uterine fibroids) compared with myometrium. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**. 5: 204-9, 1998.

PEDERSON TM, KRAMER DL, RONDINONE CM. Serine/threonine phosphorylation of IRS-1 triggers its degradation: possible regulation by tyrosine phosphorylation. **Diabetes**.50(1):24-31, 2001.

PESSIN JE, SALTIEL AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**. 160: 165-9, 2000.

- SEEDORF K. Intracellular signaling by growth factors. **Metabolism**. 44: 24-32, 1995.
- SHEPHERD PR, KAHN BB. Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine**. 341: 248-57, 1999.
- SIGALET DL, MARTIN GR. Mechanisms underlying intestinal adaptation after massive intestinal resection in the rat. **Journal Pediatric Surgery**. 33: 889-892, 1998.
- SKOROKHOD A, GAMULIN V, GUNDAKER D, KAVSAN V, MÜLLER IM, MÜLLER W EG. Origin of insulin receptor – like tyrosine kinase in marine Sponges. **Biology Bull**. 197: 198- 206, 1999.
- SOZEN I, ARICI A. Interactions of cytokines, growth factors, and the extracellular matrix in the cellular biology of uterine leiomyomata. **Fertility Sterility**. Jul;78(1):1-12, 2002.
- STEWART EA. Uterine Fibroids. **The Lancet**. 357: 293-8, 2001.
- TANAKA S, WANDS JR. A Carboxy-terminal Truncated Insulin Receptor Substrate-1 Dominant Negative Protein Reverses the Human Hepatocellular Carcinoma Malignant Phenotype. **Journal Clinical Investigation** 98; 2100–2108, 1996.
- TOSCANI GK, CHAVES EBM, CERV FL, TAVARES MB, DA SILVA ISB, CORLETA VEH, CAPP E. Gene expression and tyrosine kinase activity of insulin receptor (IR) in uterine leiomyoma and matched myometrium. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, aceito para publicação, 2003

TRAN TT, MEDLINE A, BRUCE WR. Insulin promotion of colon tumors in rats.

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 5:1013–5, 1996.

ULLRICH A, BELL JR, CHEN EY, HERRERA R, PETRUZZELLI LM, DULL TJ,

GRAY A, COUSSENS L, LIAO YC, TSUBOKAWA M, MANSON A, SEEBURG

PH, GURNFELD C, ROSEN OM, RAMACHANDRAN J. Human insulin receptor

and its relationship to the tyrosine Kinase family of oncogenes. **Nature.** 313:

756- 761, 1985.

ULRICH K. The structural variety and metabolism of proteins. **Comparative Animal**

Biochemistry, Springer-Verlag: Berlin. 70-110, 1990.

VAN OBERGHEN E, BARON V, DELAHAYE L, EMANUELLI B, FILIPPA N,

GIORGETTI-PERALDI S, LEBRUN P, MOTHE-SATNEY I, PERALDI P,

ROCCHI S, SAWKA-VERHELLE D, TARTARE-DECKERT S, GIUDICELLI J.

Surfing the insulin signaling web. **European Journal of Clinical Investigation.**

31: 966- 977, 2001.

WHITE MF, KAHN CR. The insulin signaling system. **The Journal of Biological**

Chemistry. 269: 1-4, 1994

WHITEHEAD JP, CLARK SF, URSO B, JAMES DE. Signaling through the insulin

receptor. **Current Opinion in Cell Biology.** 12: 222-8, 2000.

WILSON K, WALKER JM. **Principles and techniques of practical biochemistry.**

New York: Cambridge University Press, 4.a ed. 1994.

WU X, BLANCK A, OLOVSSON M, HENRIKSEN R, LINDBLOM B. Expression of Bcl-2, Bcl-x, Mcl-1, Bax and Bak in human uterine leiomyomas and myometrium during the menstrual cycle and after menopause. **Journal Steroid Biochemistry Molecular Biology**. 80(1): 77-83, 2002.

WU X, FAN Z, MASUI H, ROSEN N, MENDELSON J. Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin. **Journal Clinical Investigation**. 95(4):1897-905, 1995.

YAN D, FINK A, MASHIAH A, et cols. Hyperinsulinemia in colon, stomach and breast cancer patients. **Cancer Letter**. 104: 129- 32, 1996.

ANEXO A – Consentimento informado

NOME DO ESTUDO: TRANSDUÇÃO DO SINAL DE INSULINA EM MIOMÉTRIO E MIOMA HUMANOS: ATIVIDADE DE TIROSINA QUINASE E EXPRESSÃO DO SUBSTRATO 1 DO RECEPTOR DE INSULINA (IRS-1) EM MIOMÉTRIO E MIOMA HUMANOS

NÚMERO DO PROTOCOLO: _____ INSTITUIÇÃO: UFRGS

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Rafael Orcy, Edison Capp

TELEFONE para contato: (051) 910 639 48

NOME DO PACIENTE: _____

Solicitamos através desta sua colaboração no projeto de pesquisa “TRANSDUÇÃO DO SINAL DE INSULINA EM MIOMÉTRIO E MIOMA HUMANOS: ATIVIDADE DE TIROSINA QUINASE E EXPRESSÃO DO SUBSTRATO 1 DO RECEPTOR DE INSULINA (IRS-1) EM MIOMÉTRIO E MIOMA HUMANOS “. Para tanto precisamos de sua autorização para utilizar as sobras do material biológico que já foi utilizado para realização de exames e que for retirado na cirurgia por indicação de seu médico assistente. A sua cirurgia não terá influência deste protocolo de pesquisa, sendo que, nenhum procedimento além daquele indicado por seu médico será feito.

Durante a realização do projeto e a publicação dos resultados será mantido sigilo quanto a sua identificação. Todas as informações obtidas deste estudo, bem como do prontuário hospitalar podem ser publicadas com finalidade científica, mantendo-se o sigilo pessoal, ou seja, os nomes das pessoas envolvidas não serão divulgados em qualquer momento.

Este estudo trará benefícios científicos com informações importantes sobre o papel da insulina, permitindo identificação de possíveis marcadores biológicos em miométrio normal e mioma.

Declaro ter lido as informações acima antes de assinar este formulário. Foi-me dada ampla oportunidade de fazer perguntas, esclarecendo plenamente minhas dúvidas. Por este instrumento, tomo parte voluntariamente no presente estudo.

Assinatura do paciente

Data: _____

Assinatura do pesquisador responsável

Data: _____