

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

EXPRESSÃO GÊNICA E ATIVIDADE DE TIROSINA QUINASE DO RECEPTOR DE
INSULINA EM MIOMÉTRIO E MIOMA HUMANOS

GUILHERME KIRJNER TOSCANI

Orientador Prof. Dr. Edison Capp

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

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

Porto Alegre, Agosto de 2001

AGRADECIMENTOS

À Profa. Roselis Silveira Martins da Silva e ao Prof. Luiz Carlos Rios Kucharski por possibilitarem a utilização do laboratório de metabolismo e endocrinologia de invertebrados e vertebrados, bem como por suas constantes colaborações metodológicas e didáticas.

Ao Prof. Edison Capp, meu orientador, por sua compreensão, estímulo, aconselhamentos, amizade e convívio.

À Profa. Helena von Eye Corleta, co-orientadora deste trabalho, pela coleta de material, revisão e apoio.

À Profa. Ilma Simoni Brum da Silva, por sua incansável colaboração com este trabalho, bem como todo pessoal de seu laboratório, Adriane, Débora e Rodrigo.

À Alice, Ana, Vanessa, Paula, Humberto, Glauco, Ubirajara e demais pessoal do laboratório pela agradável convivência diária.

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

À Fabíola Cervi, por sua constante colaboração e agradável companhia.

À Eunice Chaves e ao Marcelo Tavares, pela ajuda e companhia.

À Mariana Toscani, por sua amizade e colaboração no trabalho.

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

À Profa. Norma Marroni, que possibilitou meu ingresso nesse departamento.

Ao Prof. Paulo Ivo pelo apoio e presença, e ao Prof. Álvaro Reischak, pelo incentivo.

À Míriam, Secretária do curso de Pós-Graduação, pelo auxílio e disponibilidade.

Ao meu pai, minha mãe e irmão, pelo carinho e apoio diário.

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	7
INTRODUÇÃO	8
MIOMAS	8
INSULINA	12
RECEPTOR DE INSULINA	14
TRANSDUÇÃO DO SINAL DE INSULINA	18
OBJETIVOS	24
MATERIAL E MÉTODOS	25
ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
POPULAÇÃO E AMOSTRA	25
PREPARAÇÃO DE MEMBRANAS	26
DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE INSULINA	26
AUTOFOSFORILAÇÃO DO RECEPTOR DE INSULINA	29
WESTERNBLOT	29

REVELAÇÃO DAS AUTORRADIOGRAFIAS	30
PREPARAÇÃO DO RNA TOTAL	31
SÍNTESE DO cDNA	32
OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPECÍFICOS	32
PROTOCOLO GERAL DA PCR	34
PADRONIZAÇÃO DA PCR.....	35
RESULTADOS	37
NÍVEIS DE mRNA PARA RECEPTOR DE INSULINA EM MIOMÉTRIO NORMAL E MIOMA HUMANOS.....	37
AUTOFOSFORILAÇÃO DO RECEPTOR DE INSULINA	40
DISCUSSÃO	43
CONCLUSÃO.....	48
BIBLIOGRAFIA.....	49
ANEXOS	57
ANEXO A – CONSENTIMENTO INFORMADO	58
ANEXO B – TRABALHO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICO NACIONAL	59

RESUMO

A insulina tem efeitos no metabolismo, no crescimento e na síntese de RNA/DNA das células. Seu envolvimento com a proliferação de células tumorais já foi demonstrado. Os mecanismos moleculares desta ação ainda não são bem conhecidos. O papel deste hormônio e da cadeia de transmissão do sinal de seu receptor ainda não foram estudados em miométrio e mioma humanos. O objetivo deste estudo foi estabelecer técnicas e verificar a expressão gênica e a atividade de tirosina quinase do receptor de insulina em miométrio e mioma humanos. Material e métodos: miométrio e mioma foram obtidos de histerectomias indicadas independentemente deste estudo. RNA foi extraído pelo método fenol/clorofórmio. Reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa (RT-PCR) foi realizada utilizando-se *primers* específicos para a seqüência do receptor de insulina. Membranas foram isoladas e experimentos de autofosforilação foram realizados. Resultados: a expressão de RNA para receptor de insulina foi semelhante entre miométrio ($0,634 \pm 0,038$) e mioma ($0,649 \pm 0,047$, $p = 0,813$). A autofosforilação do receptor foi semelhante entre miométrio ($1,496 \pm 0,310$) e mioma ($1,593 \pm 0,129$, $p = 0,650$). Conclusão: a expressão gênica e a atividade de tirosina quinase do receptor de insulina não foram diferentes entre miométrio e mioma.

ABSTRACT

Insulin has effects on metabolism, growth and RNA/DNA synthesis. It has been demonstrated that it is involved with tumoral cell proliferation. The molecular mechanisms of this action are still not clear, and how insulin participates in the tumorigenic process remains to be fully explained. This hormone and its signal transduction cascade have not been studied in myometrium and leiomyomas. The aims of this study were to establish methods and to evaluate insulin receptor (IR) mRNA expression and IR tyrosine kinase activity in human normal myometrium and myoma. **Material and Methods:** miometrium and myoma were obtained from hysterectomies indicated independently from this study. RNA was extracted with phenol/chloroform method. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) of myometrium and myoma mRNA was performed with *primers* specific for insulin receptor gene sequences. Plasma membranes were prepared and autophosphorilation experiments were performed. **Results:** arbitrary units (densitometry) of mRNA for miometrium was 0.634 ± 0.038 and for myoma 0.649 ± 0.047 ($p=0.813$); and for autophosphoylation miometrium was 1.496 ± 0.310 and myoma 1.593 ± 0.129 ($p = 0.650$). **Conclusion:** methods to study IR receptor expression and IR autophosphorylation in normal miometrium and leiomyoma. There was no difference in IR receptor expression and IR autophosphorylation between normal miometrium and leiomyoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo esquemático do receptor de insulina.	16
Figura 2. Modelo esquemático da transdução do sinal da insulina.	22
Figura 3. Determinação da concentração de insulina a ser utilizada.....	28
Figura 4. Padronização da PCR para determinação do número de ciclos	36
Figura 5. RT-PCR do mRNA do receptor de insulina (IR) em tecido miométrio normal (N) e mioma (T).	38
Figura 6. Representação gráfica da densitometria da RT-PCR.....	39
Figura 7. Autofosforilação de proteínas de membrana plasmática miométrio normal (N) e mioma (T)	41
Figura 8. Representação gráfica da densitometria do <i>western blot</i> anti-fosfotirosina	42

INTRODUÇÃO

Miomas

Miomas são tumores benignos que surgem de células musculares lisas do útero humano. São aparentes clinicamente em aproximadamente 25% das mulheres, entretanto, a verdadeira prevalência clínica pode chegar a 77% com novas técnicas de imagens e cuidadosos exames patológicos (Stewart, 2001).

Os sintomas atribuídos aos miomas incluem distúrbios hemorrágicos, desconforto ou dor pélvica e não raramente aborto e infertilidade (Giudice e cols., 1993). O sangramento uterino anormal pode causar anemia por deficiência de ferro, levando a problemas sociais (ausência ao trabalho). O desconforto e a dor pélvica estão associados com a localização do tumor que, quando anterior, pode trazer sintomas urinários e, quando posterior, pode causar constipação (Stewart, 2001).

A maioria dos miomas, entretanto, são assintomáticos. A etnia é um fator de risco epidemiológico importante na prevalência destes tumores benignos. Mulheres negras têm uma freqüência 3 vezes maior de miomatose uterina do que mulheres brancas (Stewart, 2001).

Estes tumores surgem no miométrio contendo quantidade variável de tecido conectivo fibroso. Nenhum gene específico foi identificado como responsável pelo surgimento dos miomas. Porém, estudos cromossômicos mostram aberrações citogenéticas heterogêneas, sendo cinco as mais freqüentes: translocação específica entre os cromossomos 12 e 14, trissomia do 12, deleção do cromossomo 7 e rearranjo envolvendo o braço longo do cromossomo 12 e o braço curto do 6 (Novak, 1997).

Os miomas têm capacidade de rápido crescimento, mas não ultrapassam a barreira de tecido conjuntivo que os separa do miométrio normal adjacente. Os miomas têm baixa atividade mitótica (similar ao miométrio adjacente), porém contêm muita matriz extracelular, a qual pode contribuir para o crescimento desses tumores (Palmer e cols., 1998).

Embora não tenha sido encontrada diferença na concentração sérica de estrogênio entre mulheres com e sem mioma, esta concentração é maior nos miomas do que no miométrio vizinho. Isto provavelmente se deva a diminuição do metabolismo do estradiol em estrona, causado por uma menor quantidade de 17 α -hidroxi-desidrogenase nesses tumores do que no miométrio. Além disto, a concentração de receptores de estradiol é maior em miomas do que em miométrio (Chaves e cols., 2001).

Estrogênio e progesterona têm sido há muito tempo implicados como fatores de crescimento para os miomas (De Leo, 2001), já que os mesmos se desenvolvem somente durante o período reprodutivo e podem aumentar de tamanho durante a gravidez ou em uso de contraceptivos orais. Em contraste, na menopausa e na

administração de agonistas de GnRH (*gonadotropin release hormone*) (que reduzem a concentração sérica de estrogênio e progesterona) ocorre uma regressão no miométrio e mioma. Sabe-se que a ação desses hormônios se dá aumentando a expressão gênica para fatores crescimento e seus respectivos receptores que agem de forma autócrina e parácrina. Isso indica o potencial crescimento do mioma dependente de esteróides ovarianos (Maruo e cols., 2000).

A expressão gênica para IGF1 (*insulin like growth factor 1*) e EGF (*epidermal growth factor*) foi mais abundante em miomas durante a fase proliferativa do ciclo menstrual e a de IGF1 foi indetectável em miomas de pacientes com hipotestosteronismo, sugerindo que IGF1 e EGF sejam mediadores da ação do estradiol no crescimento deste tumor (Giudice e cols., 1993; Woolrych, Jones e Smith, 1994).

A proteína Bcl2 (inibidor da apoptose) foi abundantemente encontrada em células de mioma comparada com miométrio normal. Progesterona quando adicionada em células de mioma e miométrio em cultura, aumentou a expressão da proteína Bcl2. Esses achados sugerem que a Bcl2 é uma das bases moleculares para o aumento no crescimento do mioma e que a progesterona pode participar desse crescimento, induzindo Bcl2 (Maruo, 2000). A análise imuno-histoquímica do receptor de progesterona em miomas mostrou que existe uma significativa correlação positiva entre esse receptor e o crescimento do mioma na fase proliferativa (Ichimura e cols., 1998).

A menarca precoce e o uso do primeiro contraceptivo oral em idade muito precoce estão associados fortemente com aumento no risco de miomas. A paridade está associada com um risco diminuído de mioma. Os dados relacionados com a

menarca e a paridade suportam a hipótese de que resposta miometrial a estrogênio pode ser importante na etiologia desse tumor (Marshall e cols., 1998).

A conduta terapêutica nesses tumores pode ser expectante, medicamentosa ou cirúrgica, dependendo dos sintomas, da idade da paciente, do tamanho e da localização do tumor (Stewart, 2001). Em um levantamento realizado entre 1988 e 1990, os miomas foram responsáveis por 1/3 das 1,7 milhões de hysterectomias realizadas nos Estados Unidos (Sharara e Nieman, 1995).

O uso de agonistas de GnRH é a principal terapia medicamentosa para miomas. Esses agonistas primeiramente aumentam a liberação de gonadotrofinas seguido por dessensibilização dos receptores, *downregulation* e posterior estado de hipogonadismo que se assemelha a menopausa. Esses agentes produzem uma significativa redução no volume uterino entre 35 a 65%, bem como amenorréia. O uso dos agonistas do GnRH por períodos longos é limitado devido aos efeitos adversos secundários ao hipoestrogenismo (calorões, dispareunia, diminuição da massa óssea). Preconiza-se a administração dos agonistas do GnRH durante períodos de 3 a 6 meses, visando a diminuição de miomas para que se possa optar por cirurgias mais conservadoras em pacientes que desejam preservar a fertilidade (Stewart, 2001).

Os moduladores seletivos de receptores de estrogênio (SERMs) são fármacos que se ligam a receptores de estrogênio podendo ter atividade tanto agonista quanto antagonista. Sua ação depende do tecido específico, podendo ser efetivo no tratamento de tumores hormônio-dependente. Entretanto, o efeito dos SERMs na musculatura uterina e nos miomas não está bem determinado. Estudos em células

miometriais (miomais) de ratas que desenvolvem miomas espontaneamente mostram inibição do crescimento, por diminuição na taxa de proliferação celular, quando expostas aos SERMs (Walker e cols., 2000).

Insulina

Os hormônios pertencentes à super-família da insulina têm uma ampla distribuição filogenética, pois são encontrados tanto em invertebrados quanto em vertebrados. Os estudos comparativos realizados dos agnatas aos mamíferos mostraram que a insulina é uma molécula filogeneticamente muito antiga e que o hormônio e suas funções sofreram poucas modificações ao longo da evolução. Em mamíferos, a insulina age estimulando os processos endergônicos de síntese. Em adição a este efeito, a insulina também é responsável por vários outros eventos celulares, incluindo: a regulação do transporte de íons, aminoácidos e glicose, a transcrição de genes e a modulação da transcrição de mRNAs específicos, além da síntese de DNA. Desta forma, a insulina é considerada o principal hormônio envolvido nos processos anabólicos e metabólicos nos vertebrados (White e Kahn, 1994; Cheatham e Kahn, 1995; Navarro e cols., 1999; Marks e cols., 1996).

Alguns tecidos não necessitam da ligação da insulina em seu receptor para a captação de glicose que entra nas células por difusão facilitada através de proteínas transportadoras de glicose (Glut 1, 2, 3, 5, 6 e 7) como é o caso do cérebro, músculo liso entre outros, ou através do cotransporte de sódio, no rim e intestino. Em tecidos sensíveis à insulina, como tecido adiposo, músculo esquelético e cardíaco, o Glut 4 fica armazenado em vesículas intracelulares. A ligação da insulina nesses tipos

celulares induz a migração dessas vesículas até a membrana, possibilitando assim a posterior captação de glicose (Shepherd e Kahn, 1999).

A insulina é um hormônio peptídico que, em mamíferos, é secretado pelas células β pancreáticas. Em alguns vertebrados e invertebrados há trabalhos demonstrando que a síntese de insulina ou substância similar ocorre em tecidos extrapancreáticos, em especial em tecido nervoso (LeRoith e cols., 1988).

A molécula de insulina de mamíferos é composta por 51 aminoácidos, correspondendo 21 à cadeia α e 30 à cadeia β , sendo essas ligadas por pontes dissulfídicas. Os aminoácidos responsáveis pela atividade do hormônio, pela ligação ao zinco e pela associação das cadeias são altamente conservados – 22 dos 51 aminoácidos não variam em todos os vertebrados. As insulinas de muitos mamíferos são similares à insulina humana, diferindo na posição de apenas alguns aminoácidos (El-Salhy e cols., 1983; Ulrich, 1990).

Vários fatores desencadeiam a liberação de insulina pelas células β , como as concentrações de glicose, aminoácidos, glucagon, noradrenalina, entre outros. O principal regulador da secreção de insulina é a glicose, que entra nas células β através do Glut 2. O aumento da concentração de glicose ativa mecanismos para movimento de grânulos secretórios ao longo dos microtúbulos que levam à fusão com a membrana plasmática e exocitose do hormônio (Bressler e Johnson, 1997).

Receptor de Insulina

O receptor de insulina é encontrado em diferentes células do corpo, incluindo aquelas nas quais a insulina não aumenta a captação de glicose (Cheatham e Kahn, 1995).

O gene para o receptor de insulina é um membro da superfamília que codifica outros receptores para fatores de crescimento os quais possuem atividade de tirosina quinase. O gene está localizado no braço curto do cromossomo 19 e contém 22 exons, codificando uma molécula de pró-receptor. Esse contém um sinal peptídico (a subunidade α), um sítio de processamento do pró-receptor e a subunidade β . Após a remoção do sinal peptídico duas moléculas de pró-receptor se associam em um dímero dissulfeto. Um aminoácido básico cliva o sítio no qual o dímero é removido. Essa clivagem produz as subunidades α e β do receptor de insulina ligadas por pontes dissulfeto. Os exons 17 e 21 codificam a atividade de tirosina quinase (White e Kahn, 1994).

O evento inicial da ação pleiotrópica da insulina é a ligação do hormônio a receptores localizados na membrana plasmática de células-alvo. Estes receptores reconhecem a insulina e com ela interagem com alto grau de seletividade e afinidade, transmitindo o sinal intracelular que resulta na resposta biológica do hormônio (Cheatham e Kanh, 1995).

O receptor para insulina em todas as espécies de vertebrados estudadas, desde o primitivo peixe bruxa, é um heterotetrâmero com duas subunidades α extracelulares e duas subunidades β transmembrana (Czech, 1985). Em mamíferos,

o receptor para insulina apresenta um peso molecular de aproximadamente 350 kDa, estimado por eletroforese de gel de poliacrilamida com sulfato dodecil de sódio (SDS-PAGE) sob condições não redutoras. Cada subunidade α tem aproximadamente 135 kDa e cada subunidade β tem 95 kDa. As subunidades α contêm domínios de ligação para insulina, enquanto as subunidades β possuem atividade tirosina quinase quando estimuladas por insulina (Cheatham e Kahn, 1995) (Figura 1).

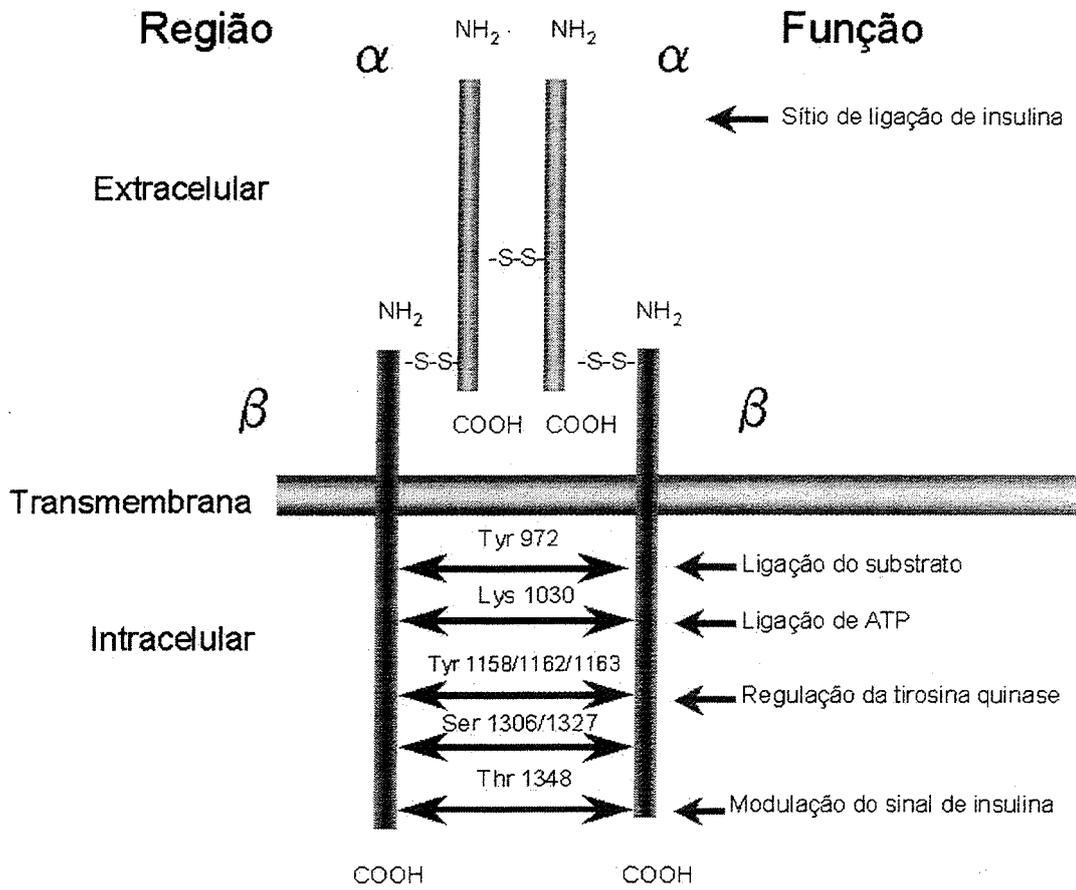


Figura 1. Modelo esquemático do receptor de insulina.

A subunidade α do receptor tem 719 ou 731 aminoácidos, dependendo se o exon 11 participa ou não do processamento do mRNA (RNA mensageiro). Essa subunidade contém um domínio rico em cisteína, que está envolvido na afinidade do receptor. A região envolvida na ligação da insulina parece estar concentrada nos primeiros 400 a 500 aminoácidos incluindo resíduos N e C-terminal desta região rica em cisteína (Accili, 2001).

A subunidade β do receptor para insulina é composta por um domínio extracelular curto que contém sítios de glicosilação, por um domínio transmembrana de 23 aminoácidos, e por um domínio intracelular com atividade de tirosina quinase, que é essencial para a ação da insulina (Hubbard e cols., 1998).

A porção extracelular da subunidade β contém 194 aminoácidos e é acoplada a subunidade α através de pontes dissulfeto (Häring e Kusser, 1990).

A parte citoplasmática possui, na sua região justamembrana, um domínio rico em glicina e um resíduo de lisina que liga o ATP. Há vários resíduos de tirosina na região justamembrana que estão envolvidos tanto na transdução do sinal quanto na internalização do receptor (Accili, 2001). Após a internalização, por endocitose, o receptor pode ser reciclado ou degradado. A meia vida do receptor fica em torno de 7 a 12 horas (Häring e Kusser, 1990). A região justamembrana também está envolvida na sinalização através da fosforilação do IRS-1 (*insulin like substrate-1*) (Cheatham e Kahn, 1995).

A porção citoplasmática contém 13 resíduos de tirosina dos quais 7 se tornam fosforilados após a ligação da insulina. Os sítios mais importantes para

autofosforilação e atividade de quinase do receptor são os resíduos de tirosina 1158, 1162, 1163 do domínio catalítico. Experimentos com células transfectadas mostram que a ausência de 1 ou 2 desses resíduos limita a atividade do receptor na sua capacidade de gerar a sinalização celular (Accili, 2001).

No estado basal, resíduos de serina estão fosforilados causando a inativação do receptor. Após a ligação da insulina, ocorre, além da rápida fosforilação dos resíduos de tirosina, um aumento subsequente na fosforilação da serina (Häring e Kusser, 1990). A fosforilação da serina também parece ser capaz de inibir a transdução do sinal da insulina via aumento nos níveis de PKC (Accili, 2001) ou em sua atividade (Cheatham e Kahn, 1995).

O domínio C-terminal do receptor contém dois resíduos de aminoácidos fosforilados: Tyr 1328 e 1334. Alguns estudos sugerem que esses resíduos servem para a ligação da PI3-quinase (Accili, 2001), que participa da translocação de Glut 4 à membrana plasmática.

Transdução do Sinal de Insulina

Quando a insulina se liga na 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 (Accili, 2001).

Após a ligação da insulina e a respectiva autofosforilação do receptor, podem ocorrer vários eventos de sinalização intracelular (figura 2). Um deles é via proteína Ras e a conseqüente ativação das MAP quinases. A Ras é uma proteína ligadora de GTP que alterna seu estado ativo (ligado a GTP) e inativo (ligado a GDP). A ligação da insulina induz a forma Ras-GTP a partir da ativação do complexo IRS1-Grb2-sos, que facilita a retirada do GTP da Ras. A alta concentração celular de GTP garante sua ligação espontânea à RAS que, então, induz uma cascata de fosforilação que culmina na ativação das MAP quinases. A MAP é uma quinase serina/treonina que, quando ativa, se desloca ao núcleo onde regula a expressão gênica de proteínas envolvidas no ciclo e proliferação celular. A cascata desencadeada pela Ras ainda não é totalmente conhecida, mas várias etapas já foram identificadas. A forma ativa da Ras se liga a Raf (uma serina/treonina quinase) que então fosforila a MEK em resíduos de tirosina e serina. A MEK por sua vez ativa a MAP (Seedorf, 1995).

A ação da Ras é mediada por uma proteína adaptadora (Grb2). Ela pode se ligar diretamente ao receptor ou a outras proteínas através do seu domínio SH2 e também ao fator de troca GTP/GDP, SOS, pelo seu domínio SH3. Isso ativa a Ras que interage com várias proteínas, entre elas, a PI3 quinase e a Raf (Accili, 2001).

O domínio SH2 de diferentes proteínas é a parte que liga resíduo de tirosina fosforilado. Uma única seqüência de aminoácidos do domínio SH2 determina a especificidade do resíduo de tirosina a que ela irá se ligar. Essa característica determina a ligação entre proteínas, como a Grb2 ao receptor ativo. Por sua vez, a

Grb2 possui um domínio SH3 que liga proteínas em resíduos de prolina. Assim como SH2, diferentes domínios SH3 ligam a diferentes seqüências ricas em prolina. SH2 e SH3 permitem a ligação proteína-proteína da via de sinalização intracelular e a conseqüente ativação da cascata que desencadeará a resposta celular (Seedorf, 1995).

Esse complexo protéico, Grb2-sos-Ras-MAP pode se formar a partir da ligação do Grb2 com a proteína SHC. Entretanto, o maior substrato para o receptor de insulina é o substrato 1 do receptor de insulina (IRS1) (Cheatham e Kahn, 1995; Whitehead e cols., 2000). O IRS1 fosforilado liga-se tanto ao domínio SH2 da Grb2, ativando a via de sinalização dependente da Ras, quanto a PI3 quinase (Seedorf, 1995).

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 IRS1 e a p110 possui o domínio SH3 que ligará outras proteínas (Cheathleam e Kahn, 1995). A PI3 quinase liga fosfoinosítídeos da membrana, catalizando sua fosforilação. Isso gera vários mediadores que estão envolvidos com a captação de glicose e síntese de glicogênio, lipídeos e proteínas bem como a modulação da expressão gênica (Shepherd e Kahn, 1999; Accili, 2001).

Vários membros da família IRS têm sido identificados, porém seus papéis não estão claros. Experimentos com ratas que sofreram ablação no gene para IRS1 tiveram retardo no crescimento, sugerindo um importante papel desse substrato na função do receptor de insulina (Accili, 2001).

Fatores de crescimento como IGF1, EGF, TGF (*tumor growth factor*) e insulina modulam a síntese de DNA e RNA e síntese protéica, estando assim envolvidos com o crescimento e diferenciação celular normal (Le Roy e cols., 1999, Gloudemans e cols., 1990, Vollenhoven, Herington e Healy, 1995; Deleu, 1999, Grimberg, 2000). Foi observado estimulação no crescimento de células tumorais humanas por IGF1 em mama, cólon e pâncreas, e em células carcinomatosas de tireóide em ratos (Gloudemans e cols., 1990). Tumor de glia e carcinoma ovariano mostraram altos níveis de receptores de IGF1 (Blakesley e cols., 1997). Em carcinoma renal há um aumento no número e atividade do receptor para IGF1 (Kellerer e cols., 1995). Esses dados sugerem um envolvimento desse fator de crescimento no desenvolvimento de tumores. O número de receptores para IGF1 em células de mioma está aumentado em comparação com miométrio normal (Tommola, Pekonen e Rutanen, 1989; Chandrasekhar e cols., 1992; Dixon, He e Haseman, 2000).

A insulina estimula a síntese de DNA e RNA, síntese protéica em geral, bem como de genes de ação rápida como c-fos, promovendo assim o crescimento e a proliferação celular (Sale e cols., 1999; Häring e cols., 1990). Há um aumento no número e afinidade do receptor de insulina em células de tumor renal quando comparadas com as normais (Kellerer e cols., 1995). A atividade de tirosina quinase do receptor de insulina, tanto basal quanto estimulada, está significativamente maior no carcinoma de cólon que o tecido de cólon normal (Corleta e cols., 1996). Esses resultados sugerem um papel para a insulina em células tumorais.

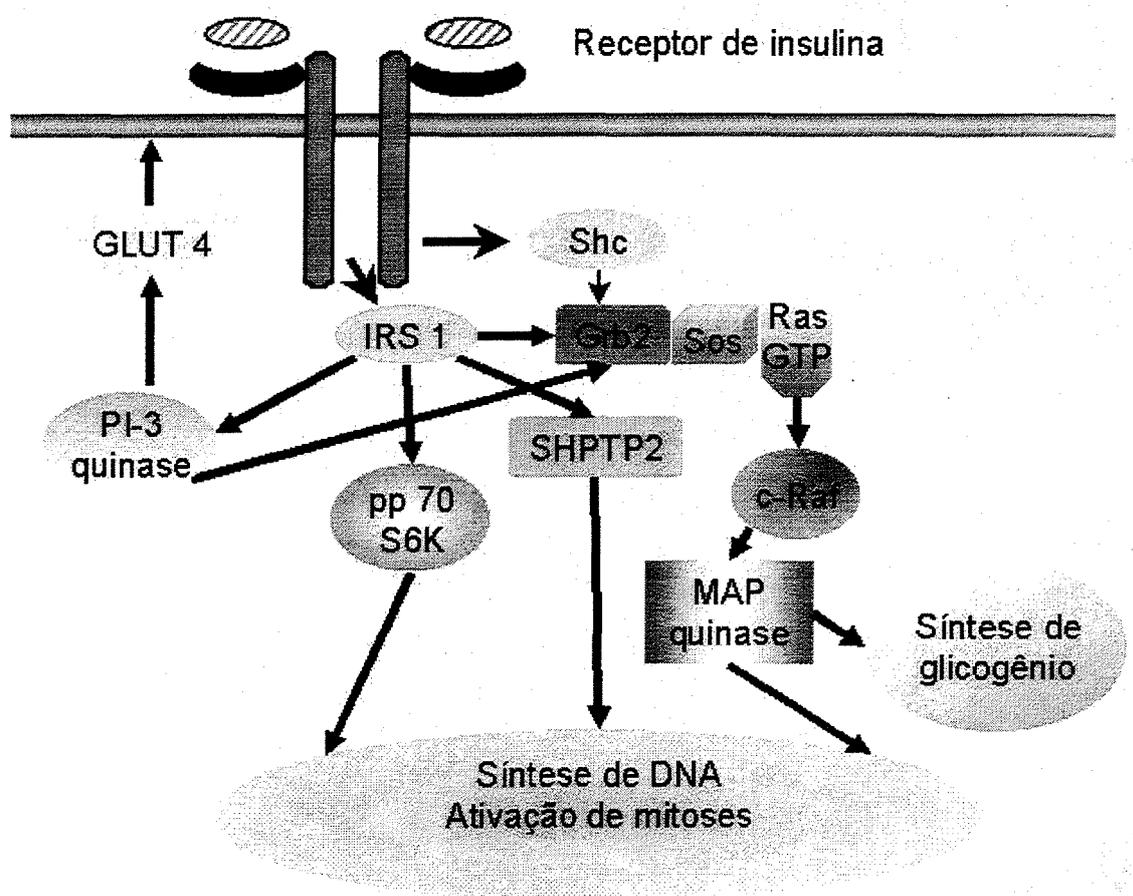


Figura 2. Modelo esquemático da transdução do sinal da insulina.

Recentes estudos têm demonstrado o papel dos fatores de crescimento, seus receptores e proteínas ligadoras em células tumorais. A insulina tem um claro papel no crescimento celular, porém, poucos trabalhos têm relacionado tumores com esse hormônio. O aumento da afinidade do receptor de insulina em células de mioma, evidencia um possível papel para essa proteína no desenvolvimento desse tumor. Estudos na via de sinalização, bem como na expressão do receptor de insulina podem contribuir para elucidar o envolvimento desse hormônio no mioma.

OBJETIVOS

Determinar a expressão gênica do receptor de insulina em miométrio e mioma humanos.

Verificar a atividade de tirosina quinase do receptor de insulina em miométrio e mioma.

MATERIAL E MÉTODOS

Análise estatística

Para comparação entre os grupos foi utilizado teste t de student. Foi considerado significativo $p < 0,05$.

População e amostra

Participaram deste estudo 5 mulheres que foram a 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 foi logo congelado em nitrogênio líquido e armazenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até ser preparado por técnicas reconhecidamente efetivas no estudo da atividade do receptor de insulina humano (Kellerer, 1995; Capp, 1996).

Preparação de Membranas

Para a preparação, as amostras de tecidos congelados foram homogeneizadas em um homogeneizador tipo Potter - Elvehem com pistilo de teflon, na presença de uma solução tampão, contendo: 40 mM Tris (hidroximetil) aminometano; 1mM PMSF; 1 mM EDTA; 250 mM sacarose, a 4°C , pH 7,4.

O homogeneizado foi centrifugado a $3000 \times g$ por 5 minutos. O sobrenadante foi centrifugado a $30000 \times g$, por 20 minutos. O precipitado, formado a partir desta centrifugação, foi ressuspenso em tampão contendo 25 mM Hepes e 1 mM PMSF com um homogeneizador de vidro tipo Dounce. Aproximadamente $50\ \mu\text{l}$ da solução foram separados e posteriormente utilizados para a dosagem de proteínas estimada através do método de Lowry (Lowry, 1951). As preparações de membranas plasmáticas foram congeladas a -20°C até sua utilização.

Determinação da concentração de insulina

Antes dos experimentos de autofosforilação foi determinada a melhor concentração de insulina que estimulasse o receptor e possibilitasse visualização

por autorradiografia. Para isso foi realizada autofosforilação do receptor de insulina em músculo de rato Wistar, utilizando-se as concentrações finais de insulina 1 μM , 10 μM e 100 μM (figura 3). Para os estudos subsequentes de autofosforilação foi utilizada a concentração de 100 μM de insulina.

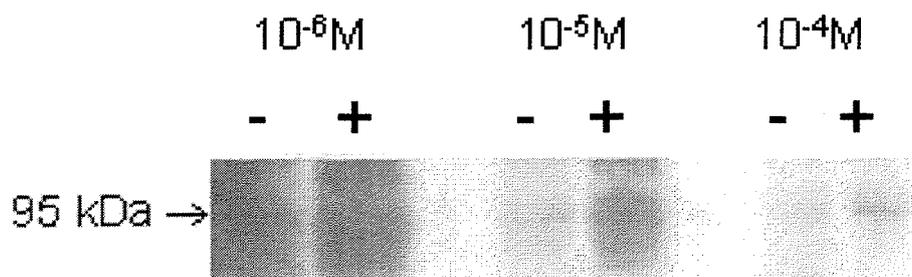


Figura 3. Determinação da concentração de insulina a ser utilizada.

Para escolha da concentração de insulina a ser usada foi realizado experimento de autofosforilação com membranas de músculo esquelético de rato Wistar. O protocolo de preparação de membrana foi o mesmo utilizado para miométrio e mioma. As três concentrações utilizadas provocaram autofosforilação. A concentração escolhida para os experimentos subsequentes foi de $10^{-4}M$.

Autofosforilação do receptor de insulina

As membranas, aproximadamente 15 μg de proteína total, foram pré-incubadas com insulina (100 μM) ou albumina (10 μM), 200 mM MnCl_2 e 10 mM vanadato de sódio por 30 minutos a 22°C. A seguir este material foi incubado com 430 μM ATP por 10 minutos a 22°C. Após, se adicionou solução de Laemmli contendo ditioneitol (100 mM) e as amostras foram fervidas a 95°C por 10 minutos.

Westernblot

Com base nos trabalhos de Beisegel (1986) e Gershoni e Palade (1983) foi realizada a técnica de *westernblot*, com algumas modificações.

Para separação das proteínas foi utilizado SDS-PAGE (eletroforese de gel de poliacrilamida com sulfato dodecil de sódio) com uma concentração de poliacrilamida de 7,5%. Aproximadamente 15 μg de proteína das amostras, já estimuladas e incubadas com solução de Laemmli (30% glicerol, 10% SDS; 62,5 mM Tris, 750 mg DTT e 0,001% azul de bromofenol, 95°C por 10 minuto), foram colocadas em cada poço. A eletroforese foi efetuada na presença de tampão contendo 192 mM glicina; 25 mM Tris e 0,1% SDS, pH 8,3. As proteínas correram no gel por aproximadamente 2 horas, 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.

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

As membranas de nitrocelulose (NC) foram então incubadas durante 1 hora em solução bloqueadora (NET), contendo 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, 0,05% Triton X-100, 0,25% gelatina, pH 7,4. Esta solução satura sítios de ligação inespecíficos da membrana de nitrocelulose.

Após o bloqueio com NET, as membranas de NC foram incubadas toda uma noite sob agitação constante a 4°C, com o anticorpo (PY20) anti-fosfotirosina. Após a incubação, as membranas foram lavadas com NET (5 vezes durante 10 minutos cada vez). A seguir, as NC foram incubadas com segundo anticorpo anti-*mouse* por 1 h e lavadas novamente com NET (5 vezes durante 10 minutos cada vez). Finalmente, as membranas foram incubadas com solução para quimio-luminescência (ECL) por 1 min.

Revelação das Autorradiografias

Após a incubação com solução para quimio-luminescência, as membranas de NC foram colocadas em contato com o filme fotográfico por aproximadamente 15 segundos. Para revelação, o filme foi colocado na solução reveladora por 1 minuto; lavado com ácido acético e colocado por mais 1 minuto na solução fixadora. Todos

os procedimentos de revelação foram realizados em uma câmara escura. Após a revelação, seguiram-se a visualização e a análise dos resultados.

Preparação do RNA total

O RNA total dos tecidos foi extraído com o reagente trizol (protocolo do fabricante Life Technologies). Os tecidos foram lisados com 1 ml de Trizol e o homogenado incubado por 5 min a 15-30°C. Foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio por ml de Trizol e as amostras agitadas vigorosamente por 15 s. Após, foram incubadas por 2-3 min a 15-30°C e centrifugadas a 12000 x g por 15 min a 4°C. A mistura foi separada em fase fenólica (fenol-clorofórmio), interface e fase aquosa (RNA). A fase aquosa foi transferida para tubos novos e numerados, onde o RNA foi precipitado com a adição de álcool isopropílico (0,5 ml/ml de Trizol). As amostras foram armazenadas a -20°C por 24 h e, a seguir, centrifugadas a 12000 x g/10min a 4°C. O RNA precipitou formando um *pellet*. O sobrenadante foi removido e o *pellet* lavado com etanol a 75 %. O RNA foi dissolvido em água autoclavada com DEPC (dietilpirocarbonato) incubado por 10 min a 55-60°C para melhor solubilização. As amostras foram quantificadas utilizando o espectrofotômetro para quantificação de ácidos nucleicos GeneQuant. O RNA isolado foi analisado pelas técnicas de RT-PCR.

Síntese do cDNA

A partir do RNA total, os níveis de mRNA específico para o receptor de insulina também foram avaliados indiretamente, pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir de transcrição reversa (RT), ou simplesmente RT-PCR. A síntese do cDNA foi realizada a partir de 2 µg de RNA total, utilizando *primers* desenhados para hibridizar na cauda poli-A característica do mRNA de β-microglobulina e receptor de insulina (tabela 1), produzindo um cDNA mais puro, exclusivamente a partir do mRNA. O RNA foi inicialmente desnaturado a 70°C por 10 min juntamente com o *primer*. Em seguida foi incubado com a transcriptase reversa na presença de tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,4 + KCl 50 mM, cloreto de magnésio 2,5 mM, mistura de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs) 0,5 mM e ditioneitol 10 mM a 42°C durante 55 min. Após nova desnaturação a 70°C, incubou-se a mistura com RNAase H de *E. coli* por 20 min a 37°C para destruir o RNA não transcrito. A reação de síntese do cDNA totaliza um volume de 20 µl armazenada a -20°C até a amplificação por PCR.

Oligonucleotídeos específicos

Os oligonucleotídeos (*primers*) utilizados para amplificação dos fragmentos de cDNA específicos para cada mRNA em estudo foram desenhados a partir da sequência publicada de cada gene., obedecendo aos seguintes critérios:

- 18 a 30 nucleotídeos;

- quando o gene possuía mais de um exon, os *primers* eram posicionados preferencialmente nas áreas de transição intron-exon para inviabilizar a amplificação indesejada de DNA genômico;
- a proporção de G-C foi mantida entre 50 e 60% e equilibrada em cada par de *primers*;
- a extremidade 3' foi preferentemente ocupada por C ou G, para fortalecer a hibridização neste ponto crítico.
- A temperatura de fusão calculada para um *primer* era semelhante à do seu par;
- Foram evitadas seqüências que resultassem em complementariedade dos *primers sense* e *antisense*, para inibir a formação de dímeros.

A tabela 1 resume a localização e a seqüência dos oligonucleotídeos utilizados neste trabalho, bem como o tamanho dos fragmentos de cDNA amplificados.

Tabela 1. Características dos *primers* sintetizados para a amplificação de fragmentos específicos de cDNA.

Gene	Seqüência sintetizada	Fragmento	Ref.
β_2 m			
<i>Sense</i>	5'ATCCAGCGTACTCCAAAGATTCAG 3'	623 bp	Taplin, 1995
<i>Antisense</i>	5'AAATTGAAAGTTAACTTATGCACGC 3'		
IR			
<i>Sense</i>	5' ACTGACCTCATGCGCATGTGCTGG 3'	318 bp	Liu, 1997
<i>Antisense</i>	5' GCCCGTTTTTCTTGCCTCCGTTTCAT 3'		

Protocolo Geral da PCR

As reações de PCR foram feitas num volume final de 50 μ l seguindo uma adaptação do protocolo sugerido pela fabricante (Gibco BRL). As amostras de cDNA (2 μ l, correspondentes a 4 ng de cDNA) foram inicialmente desnaturadas a 94°C por 3 min na presença de tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,4, 50 mM KCl e 1,5 mM MgCl₂. Esse procedimento, conhecido como *hot start*, tem por objetivo desnaturar estruturas secundárias que, submetidas à ação da polimerase, resultariam na amplificação de fragmentos indesejados. Em seguida, nos tubos, já imersos em gelo, foi colocado 10 μ l de uma solução com as mesmas concentrações de tampão e MgCl₂, acrescida dos *primers sense* e *antisense*, da mistura de dNTPs e da enzima Taq DNA polimerase e submetidos a amplificação. O número de ciclos foi adaptado para cada *primer*. Todos os reagentes foram provenientes da Gibco BRL (*SuperScript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis*).

Padronização da PCR

As reações de PCR foram padronizadas com cDNAs sintetizados a partir de 2 μ g de RNA total. Os *primers* utilizados para o estudo do mRNA do receptor de insulina foram sintetizados a partir da seqüência do gene celular humano normal (Liu e cols., 1997). O fragmento amplificado do receptor de insulina possui 318 pares de base (bp) e da β -microglobulina possui 623 bp (Taplin, 1995). Como mostra a Figura 4, com cDNA sintetizado a partir de 2 μ g de RNA total foi possível detectar a expressão gênica do receptor de insulina e de β -microglobulina. O número mínimo de ciclos necessários para amplificar este fragmento foi de 25 ciclos, sendo também testado com 30, 40 e 45 ciclos. Com base nestes dados, optou-se por amplificar as amostras com 40 ciclos.

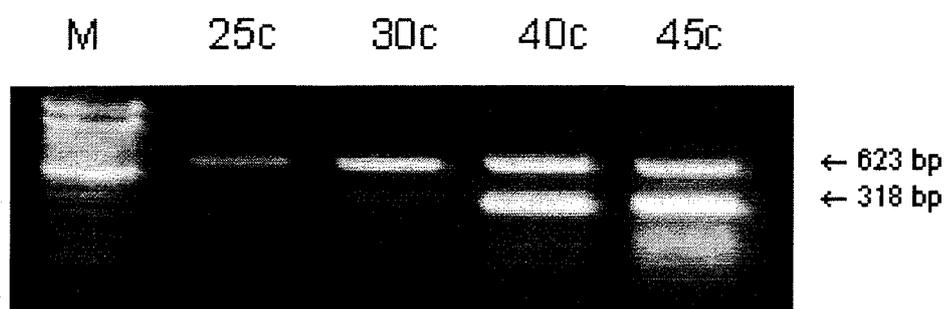


Figura 4. Padronização da PCR para determinação do número de ciclos

A curva de ciclos realizada utilizando cDNA sintetizado a partir de 2 μ g de RNA total, foi feita com 25, 30, 40 e 45 ciclos de PCR.

RESULTADOS

Níveis de mRNA para receptor de insulina em miométrio normal e mioma humanos

A expressão gênica do receptor de insulina foi avaliada por RT-PCR em miométrio normal e mioma humanos, conforme ilustrado na figura 5. Os níveis de mRNA do receptor de insulina não foram diferentes entre estes tecidos. A figura 6 representa as unidades arbitrárias densitométricas ($0,634 \pm 0,038$ e $0,649 \pm 0,047$, média \pm desvio padrão, $p = 0,813$).

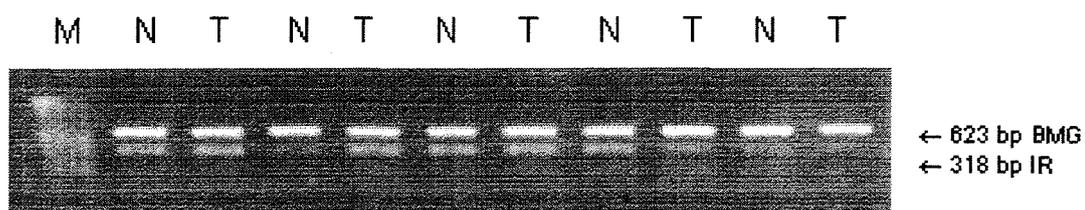


Figura 5. RT-PCR do mRNA do receptor de insulina (IR) em tecido miometrial normal (N) e mioma (T).

O fragmento de 318 pb, analisado em gel de agarose, corresponde ao mRNA do IR e o de 623 pb ao da β_2 -microglobulina. M = marcador de peso molecular.

As amostras visualizadas no gel são originárias de 5 pacientes diferentes.

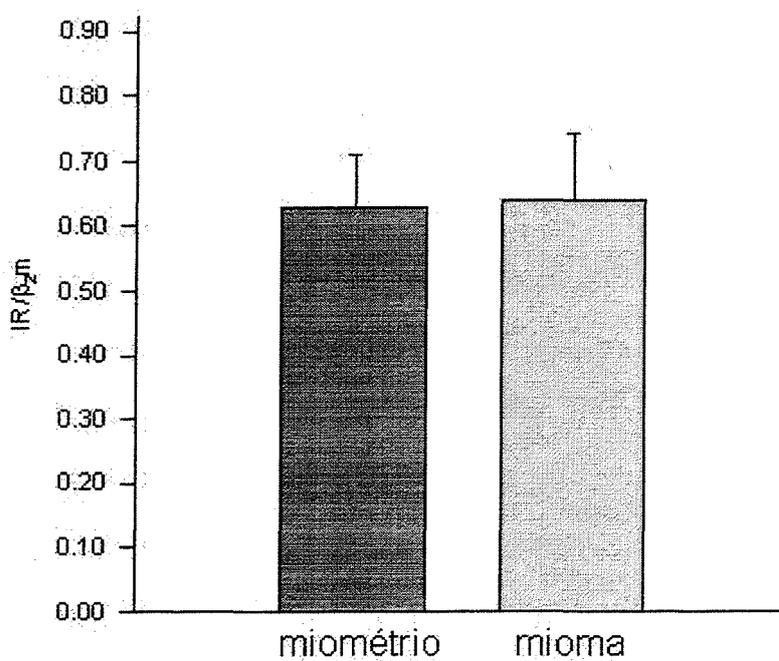


Figura 6. Representação gráfica da densitometria da RT-PCR.

A quantificação das bandas é expressa como a relação IR/β₂-microglobulina (média ± desvio padrão) (0,634 ± 0,038 e 0,649 ± 0,047, p = 0,813, respectivamente miométrio e mioma).

Autofosforilação do receptor de insulina

A figura 7 é representativa dos westernblots realizados com membranas plasmáticas de miométrio normal (N) e mioma (T) de 5 pacientes. Como controle foi utilizado músculo esquelético de rato Wistar (C). As bandas marcadas representam fosfoproteínas das membranas plasmáticas que foram identificadas pelo anticorpo para resíduos de tirosina fosforilados. O peso molecular dessas proteínas foi de aproximadamente 95 kDa e a intensidade das bandas foi analisada por densitometria.

A figura 8 apresenta as unidade arbitrárias da densitometria, mostrando que não houve diferença entre miométrios e miomas na fosforilação do receptor de insulina após estimulação ($1,496 \pm 0,310$ e $1,593 \pm 0,129$, respectivamente, $p = 0,650$).

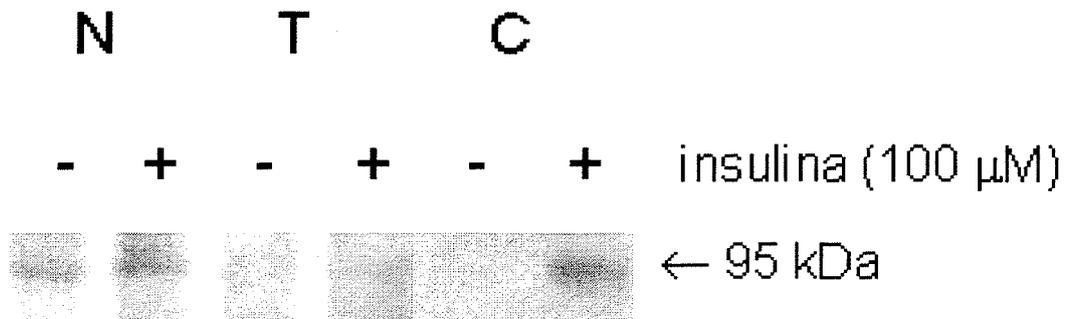


Figura 7. Autofosforilação de proteínas de membrana plasmática miométrio normal (N) e mioma (T)

Como controle foram utilizadas membranas plasmáticas de músculo esquelético de rato (C). As linhas marcadas com (+) representam a incubação com insulina bovina na dose de 100 μM e as linhas marcadas com (-) representam a incubação com albumina bovina (10 μM). As amostras foram submetidas a um SDS-PAGE (7,5%) e após incubada com anticorpo anti-fosfotirosina.

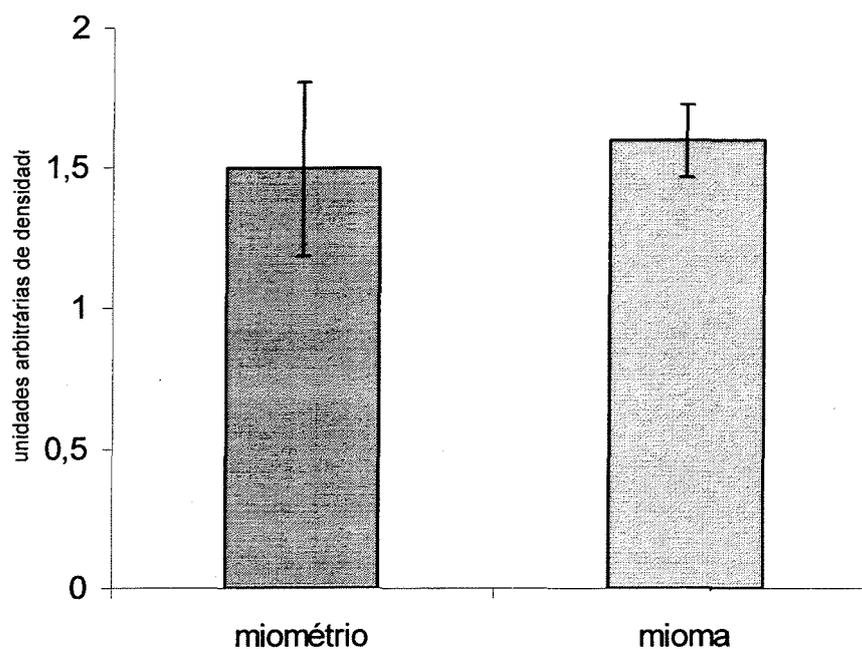


Figura 8. Representação gráfica da densitometria do *westernblot* anti-fosfotirosina

As barras representam a densitometria das bandas de 95 kDa, expressa em unidades arbitrárias. Não houve diferença entre miométrios e miomas na fosforilação do receptor de insulina após estimulação ($1,496 \pm 0,310$ e $1,593 \pm 0,129$, respectivamente, $p = 0,650$).

DISCUSSÃO

Mioma é o tumor benigno uterino mais comum e quando sintomático é uma das razões mais freqüentes para intervenção cirúrgica em mulheres (histerectomia e miomectomia). Além disso, são responsáveis por aproximadamente um terço de todas admissões hospitalares em serviços de ginecologia (Sharafi e cols., 2000). Sangramento excessivo, com conseqüente deficiência de ferro, dor pélvica e disfunção reprodutiva são os sintomas mais comuns, podendo determinar embaraço social e diminuição da produtividade, além do alto custo econômico (Stewart, 2001).

A histerectomia é indicada como tratamento cirúrgico eficaz por evitar a recidiva e eliminar os sintomas, entretanto compromete a gravidez futura (Stewart 2001; Iverson e cols., 1996). A miomectomia é utilizada quando se tem o objetivo de preservar a capacidade reprodutiva, porém há riscos de surgirem novos miomas com necessidade de novas intervenções cirúrgicas. Por sua vez, os procedimentos cirúrgicos apesar de eficazes podem ter complicações importantes (infecção, acidentes cirúrgicos, sangramento, transfusão de sangue e derivados) (Vercellini e cols., 1999).

Alguns medicamentos, como agonistas de GnRH, indutores de amenorréia, antagonistas de progesterona, moduladores seletivos do receptor de estrogênio, são

usados no tratamento (Walker e cols., 2000; Stewart, 2001). Entretanto, faz-se necessário o surgimento de novas abordagens terapêuticas que possam ampliar as possibilidades de tratamento não cirúrgico.

Os fatores de crescimento e insulina têm sido implicados como responsáveis no crescimento desses tumores (Chandrasekar, 1992; De Leo, 2001; Dixon e Haseman, 2000; Giudice e cols., 1993). Por mais que se tenha investigado sobre esse tumor uterino nos últimos anos, pouco se sabe ainda sobre a etiologia ou as bases moleculares do seu desenvolvimento e crescimento (Newbold e cols., 2000).

Os fatores de crescimento são proteínas e agem a partir de receptores de membrana que, após a ligação, geram uma cascata intracelular de ativação de proteínas citosólicas até desencadear o evento final. A disponibilidade desses fatores é determinada em parte por suas proteínas de ligação. Os estudos nessa área envolvem os receptores, suas vias de sinalização celular, os fatores em si e suas proteínas ligadoras. Sabe-se que esses fatores tem elementos comuns com a via pela qual os hormônios esteróides ovarianos transmitem seus sinais (Fayed e cols., 1989).

Neste estudo foram avaliados os níveis de mRNA e a atividade intrínseca de tirosina quinase do receptor de insulina. Os níveis de mRNA têm relação com a quantidade de receptor celular e é um excelente parâmetro para avaliar como a célula está reagindo na tentativa de formar essa proteína para que ela exerça sua função sinalizadora (Navarro e cols., 1999). O modelo utilizado para determinação do mRNA foi a reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir de transcrição reversa (RT).

A atividade de tirosina quinase do receptor de insulina depende de sua ativação e fosforilação em resíduos de tirosina. Esta atividade pode ser modulada, entre outros, pela fosforilação em resíduos de serina e treonina (Kellerer, 1996). No caso dos fatores de crescimento, a ligação do sinalizador desencadeia a sua fosforilação que dará, então, início a cascata de eventos intracelulares. O grau de fosforilação do receptor é um ótimo indicador de sua atividade de tirosina quinase. A variação no grau de fosforilação pode se dar por modificações na quantidade de receptor por célula, afinidade, cinética da proteína, atividade das fosfatases, nível de auto-inibição do receptor. O modelo utilizado para avaliação da atividade intrínseca de tirosina quinase destes receptores em miométrio e mioma foi a autofosforilação seguida da técnica de *western blot* com anticorpos específicos.

As RT-PCR realizadas neste estudo mostraram que os níveis de mRNA para o receptor de insulina não apresentaram diferença significativa entre células de miométrio normal e mioma. Esses dados sugerem que a quantidade de receptor de insulina em células de mioma seja semelhante ao miométrio. Dados semelhantes foram demonstrados por Fayed e cols. (1989), os quais não encontraram diferença significativa na quantidade de receptor de insulina nestes tecidos. Em estudos de ligação, o número de receptores para insulina entre esses dois tipos celulares não apresentou diferença significativa, mas parece haver um aumento na afinidade do receptor de insulina em mioma quando comparado a miométrio normal (Nagamani e Stuart, 1992). A insulina está envolvida no desenvolvimento e diferenciação celular (Riedel e cols., 2000) e existem evidências da participação da insulina e seu receptor em tumores de mama, de cérebro, rim e cólon (Kellerer e cols., 1995; Corleta e cols., 1996). Entre endométrio normal e neoplásico (carcinoma), a concentração de

receptor de insulina, determinada por estudos de ligação, não foi diferente. A atividade de tirosina quinase deste receptor foi também semelhante entre os dois tecidos (Capp e cols., 1996). Os níveis de EGF e TGF α também não diferem significativamente entre miométrio e mioma. O número de receptores para EGF se apresenta diminuído em miomas (Sozen e cols., 2000; Vollenhoven e cols., 1995; Dixon e cols., 2000). O IGF1 parece estar envolvido na proliferação de tecido miomatoso (Vollenhoven e cols., 1995). Vários autores encontraram um número aumentado de receptores para esse fator nesses tecidos (Tommola e cols.; Chandrasekhar e cols., 1992; Dixon e cols., 2000). Estudos prévios demonstraram a existência de híbridos de receptor IGF1/insulina. Estes híbridos consistem de uma metade $\alpha\beta$ de receptor de IGF1 e outra metade $\alpha\beta$ de receptor de insulina e parecem ser mais responsivos ao estímulo de IGF1. As propriedades funcionais destes híbridos ainda não são compreendidas em detalhe (Soos e cols., 1993). É possível que esta formação de híbridos e favorecimento da resposta a IGF1 tenha participação na formação de tumores (Kellerer, 1996), entre eles os miomas.

Analisando a atividade do receptor após estímulo com insulina, nossos experimentos de auto-fosforilação utilizando *westernblot* com anticorpo anti-tirosina fosforilada e autorradiografia mostraram não haver diferença significativa no nível de fosforilação da subunidade β do receptor em tecido miometrial normal e mioma. Esses dados sugerem que a atividade intrínseca do receptor de insulina não se apresenta diferente em mioma quando comparada com miométrio normal adjacente da mesma paciente. Fayed e cols. (1989) observaram uma ação sinérgica da insulina com EGF favorecendo o crescimento do mioma. Entretanto, isoladamente, a insulina não mostrou relacionar-se com o crescimento desse tumor (Fayed e cols.,

1989). Nagamani e Stuart (1992) sugeriram aumento na afinidade do receptor de insulina em mioma quando comparado a miométrio. Mesmo nesses trabalhos, havendo a sugestão da ação da insulina e seu receptor no desenvolvimento do mioma, os resultados não avaliaram de forma mais direta a atividade do receptor e a via de transdução intracelular.

Em miomas, os trabalhos existentes nessa área avaliaram apenas a afinidade e o número de receptores de insulina (Fayed e cols., 1989; Nagamani e Stuart, 1992). Nenhum trabalho foi encontrado mostrando a atividade de tirosina quinase do receptor de insulina nesse tipo de tumor. Nossos resultados sugerem o mesmo nível de atividade intrínseca do receptor em miométrio normal e mioma. Apesar disso, é forte a suspeita da influência da insulina nesse tumor, já que suas ações no crescimento e diferenciação de células normais são bastante conhecidas, bem como seu papel em outros tumores já terem sido identificados (tanto no número de receptores quanto na sua atividade) (Kellerer, 1996, Corleta e cols., 1996; Capp e cols., 1996).

Uma possível explicação para os nossos achados, então, é que a alteração possa estar adiante no mecanismo de sinalização intracelular, desencadeado pela ligação da insulina ao seu receptor. Nesse ponto, uma ou mais proteínas envolvidas na cascata da transdução do sinal de insulina, como IRS1, MAPK, ou oncogenes (c-fos, c-jun) podem estar com sua expressão, bem como sua atividade alteradas. Os resultados obtidos nesse trabalho contribuem para elucidar os mecanismos moleculares do crescimento desse tumor.

CONCLUSÃO

A ação da insulina ocorre após ligação ao seu receptor através de uma cascata de fosforilações, iniciada pela da autofosforilação. A metodologia para estudo da atividade de tirosina quinase (autofosforilação) do receptor de insulina foi estabelecida com sucesso.

A análise da expressão gênica do receptor de insulina não demonstrou diferença significativa quando comparados tecidos de miométrio normal e mioma.

A atividade intrínseca de tirosina quinase do receptor de insulina, avaliada por sua autofosforilação, não foi diferente comparando-se miométrio e mioma. Esses dados sugerem que esta etapa da transdução do sinal de insulina não é a responsável pela proliferação celular alterada destes tumores.

Outras etapas da via de transdução do sinal de insulina deverão ser estudadas nesses tumores. Alterações na fosforilação de substratos citoplasmáticos (IRS1), na cadeia de MAP quinases e em oncogenes, tais como c-fos e c-jun, são candidatas às próximas investigações.

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.
- Beisiegel U: Protein blotting. **Eletrophoresis** 1986;.7: 1-18.
- Blakesley VA, Stannard BS, Kalebic T, Helman LJ, LeRoith D: Role of the IGF-1 receptor in mutagenesis and tumor promotion. **Journal of Endocrinology** 1997; 152: 339-44.
- Bressler R, Johnson DG. Pharmacological regulation of blood glucose levels in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Archives of Internal Medicine** 1997, 157, 836-48.
- 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** 1996; 24: 621-23.
- Chandrasekhar Y, Heiner J, Osuamkpe C, Nagamani M: Insulin-like growth factor 1 and 2 binding in human myometrium and leiomyomas. **American Journal of Obstetrics and Gynecology** 1992; 166: 64-9.

Chaves EM, Corleta H, Toscani GK, Capp E. Miomatose uterina – papel do IGF1e seu receptor. **Femina** 2001, aceito para publicação.

Cheatham B, Kahn R: Insulin action and the insulin signaling network. **Endocrine Review**. 1995; 16: 117-41.

Corleta HE, Capp E, Corleta OC: Insulin receptor tyrosine kinase activity in colon carcinoma. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 1996; 12: 1593-7.

Czech MP: The nature and regulation of the insulin receptor: structure and function. **Annual Reviews of Physiology** 1985; 47: 357-81.

De Leo V: Administration of somatostatin analogue reduces uterine and myoma volume in women with uterine leiomyomata. **Fertility and Sterility** 2001; 75: 632-3.

Deleu S and cols.: IGF-1 or insulina, and the TSH cyclic AMP cascade separately control dog and human thyroid cell growth and DNA synthesis, and complement each other in inducing mitogenesis. **Molecular Endocrinology** 1999; 149: 41-51.

Dixon D, He H, Haseman JK: Immunohistochemical localization of growth factors and their receptors in uterine leiomyomas and matched myometrium. **Environmental Health Perspectives** 2000; 108: 795-802.

El-Salhy M, Falkmer S, Kramer K.J, Speirs R.D: Immunohistochemical investigations of neuropeptides in the brain, corpora cardiaca and corpora allata of na adult

lepidopteran insect, *Maruduca sexta* (L.). **Cell and Tissue Research** 1983; 232: 295-317.

Fayed YM, Tsibris JCM, Langenberg PW, Robertson, ALJ: Human Uterine Leiomyoma Cells: Binding and growth responses to epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin. **Laboratory Investigation** 1989; 60: 30-7.

Fernandes AM, Hamburger AW, Gerwin BI: Production of epidermal growth factor related ligands in tumorigenic and benign human lung epithelial cells. **Cancer Letters** 1999; 142: 55-63.

Gershoni JM, Palade GE: Protein blotting: principles and applications. **Annals of Biochemistry** 1983; 131: 1-13.

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** 1993; 8: 1796-806.

Gloudemans I, Prinsen I, Unnik JAMV, Lips CJM, Otter WD, Sussenbach JS: Insulin-like growth factor gene expression in human smooth muscle tumors. **Cancer Research** 1990; 50: 6689-95.

Grimberg A, Cohen P: Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis. **Journal of Cellular Physiology** 2000; 183: 1-9.

Häring H, Obermaier-Kusser B: The insulin receptor: Its role in insulin action and in the pathogenesis of insulin resistance. **The Diabetes Annual** 1990; 5: 538-67.

Ichimura T, Kawamura N, Ito F, Shibata S, Minakuchi K, Tsujimura A, Umesaki N, Ogita S: Correlation between the growth of uterine leiomyomata and estrogen and progesterone and progesterone receptor content in needle biopsy specimens. **Fertility and Sterility** 1998; 70: 967-71.

Iverson RE, Chelmow D, Strohbehn K, Waldman L, Evantash EG: Relative morbidity of abdominal hysterectomy and myomectomy for management of uterine leiomyomas. **Obstetrics and Gynecology** 1996; 88: 415-9.

Kellerer and cols.: Insulin and insulin-like growth-factor-1 receptor tyrosine-kinase activities in human renal carcinoma. **International Journal of Cancer** 1995; 62: 501-7.

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

Le Roy C, Maisnier-Patin K, Leduque P, Li JY, Saez JM, Langlois D: Overexpression of a dominant-negative type II TGF β receptor tagged with green fluorescent protein inhibits the effects of TGF β on cell growth and expression of mouse adrenal tumor cell line Y-1 and enhances cell tumorigenicity. **Molecular and Cellular Endocrinology** 1999; 158: 87-98.

Leroith D, Adamo M, Schemer J, Waldbillig R, Lesniak M.A, De Pablo F, Hart C, Roth J: Insulin-related materials in the nervous system of vertebrates and non-

vertebrates: Possible extrapancreatic production. **Hormone and Metabolic Research** 1998; 20,:411-20.

Liu, HC e cols.: Simultaneous detection of multiple gene expression in mouse and human individual preimplantation embryos. **Fertility and Sterility** 1997; 67:733-41.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Far AL., Randall RJ: Protein measurements with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry** 1951; 193: 265-75.

Marks DB, Marks AD, Smith CM. **Basic Medical Biochemistry – A Clinical Approach**. Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, USA, 1996, p. 471-90.

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** 1998; 70: 432-9.

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** 2000; 65: 585-92.

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

Novak RA: Effects of growth factors on leiomyomas. **Endometrium and Endometriosis** 1997: 301-10.

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** 1999; 122: 137-53.

Newbold RR, DiAugustine RP, Risinger JI, Everitt JI, Walmer DK, Parrott EC, Dixon D: Advances in uterin leiomyoma research: conference overview, sumary, and future research recommendations. **Environmental Health Perspectives** 2000; 108: 769-73.

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** 1998; 5: 204-9.

Rield H, Yousaf N, Zhao Y, Dend Y, Wang J: PMS, a mediator of PDGF-BB, IGF1, and insulin-stimulated mitogenesis. **Oncogene** 2000; 19: 39-59.

Sale EM, Atkinson PPG, Arnott CH, Chad JE, Sale GJ: Role of ERK1/ERK2 and p70S6K pathway in insulin signalling of protein synthesis. **Federation of European Biochemical Societies Letters** 1999; 446: 122-6.

Seedorf K: Intracellular signaling by growth factors. **Metabolism** 1995; 44: 24-32.

Sharafi K, Kunze K, Noshier JL, Bachmann GA: Symptomatic fibroids: the need to include low dose ocps as a treatment option. **Primary Care Update Ob/Gyns** 2000; 7: 46-8.

Sharara FI, Nieman LK: Growth hormone messenger ribonucleic acid expression in leiomyoma and surrounding myometrium. **Am. J. Obstet. Gynecol.** 1995; 173: 814-19.

Shepherd PR, Kahn BB: Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. **The New England Journal of Medicine** 1999; 341: 248-57.

Sozen I, Kovanci E, Arici A: Bidirectional effect of transforming growth factor- α (TGF- α) and stimulatory effect of platelet-derived growth factor (PDGF) on mitogenesis of human myometrial and leiomyoma cells. **Fertility and Sterility** 2000; 74: 246-7.

Stewart EA: Uterine Fibroids. **The Lancet** 2001; 357: 293-8.

Taplin TM e cols.: Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. **The New England Journal of Medicine** 1995; 332:1393-8.

Tommola P, Pekonen F, Rutanen EM: Binding of epidermal growth factor and insulin-like growth factor1 in human myometrium and leiomyomata. **Obstetrics and Gynecology** 1989; 74: 658-62.

Ulrich K. The structural variety and metabolism of proteins. In: **Comparative Animal Biochemistry**, Springer-Verlag: Berlin 1990; 70-110.

- Vercellini P, Maddalena S, De Giorgi O, Pesole A, Ferrari L, Crosignani PG: Determinants of reproductive outcome after abdominal myomectomy for infertility. **Fertility and Sterility** 1999; 72: 109-14.
- Vollenhoven BJ, Herington AC, Healy DL: Epidermal growth factor and transforming growth factor- β in uterine fibroids and myometrium. **Gynecologic and Obstetric Investigation** 1995; 40: 120-4.
- Walker CL, Burroughs KD, Davis B, Sowell K, Everitt JI, Fuchs-Young R: Preclinical evidence for therapeutic efficacy of selective estrogen receptor modulators for uterine leiomyoma. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation** 2000; 7: 249-56.
- White MF, Kahn CR: The insulin signaling system. **The Journal of Biological Chemistry** 1994; 269: 1-4.
- Whitehead JP, Clark SF, Urso B, James DE: Signaling through the insulin receptor. **Current Opinion in Cell Biology** 2000; 12: 222-8.
- Woolrych MLH, Jones DSC, Smith SK: Quantification of messenger ribonucleic acid for epidermal growth factor in human myometrium and leiomyomata using reverse transcriptase polymerase chain reactin. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 1994; 78: 1179-84.

ANEXOS

Anexo A – Consentimento informado**AUTORIZAÇÃO PARA PARTICIPAR DE UM PROJETO DE PESQUISA**NOME DO ESTUDO: **Transdução do sinal de insulina em miométrio e mioma**

NÚMERO DO PROTOCOLO: _____ INSTITUIÇÃO: UFRGS

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Guilherme Kirjner Toscani

TELEFONE para contato: (051) 3227 9484

NOME DO PACIENTE: _____

Solicitamos através desta sua colaboração no projeto de pesquisa “transdução do sinal de insulina 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, ficando sua indicação a critério de seu médico. 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.

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: _____

Anexo B – Trabalho aceito para publicação em periódico nacional

MIOMATOSE UTERINA – PAPEL DO IGF1E SEU RECEPTOR

UTERINE LEIOMYOMA – ROLE OF IGF1AND ITS RECEPTOR

RESUMO

Os miomas uterinos são os tumores mais comuns do trato genital feminino e acometem 20 a 30% das mulheres em idade reprodutiva, embora geralmente benignos, causam uma série de sintomas desagradáveis como: sangramento anormal, desconforto pélvico, trabalho de parto prematuro, aumento da frequência urinária e constipação. Atualmente, o único tratamento definitivo é a cirurgia, miomectomia ou histerectomia. Sabe-se que seu crescimento sofre influência hormonal, porém não está claro como o estrogênio exerce sua função, havendo possibilidade de que seja mediado por fatores de crescimento com o IGF-I. Este hormônio já foi relacionado com o crescimento de outros tumores como mama, cérebro e rins.

Palavras-chave: IGF – I, fator de crescimento da insulina - I, receptor de IGF- I, tirosina quinase, mioma.

ABSTRACT

Uterine leiomyomas are the most common tumor from women genital tract, affecting 20 %to 30% of women of reproductive age. Their symptoms are pelvic discomfort, abnormal uterine bleeding, spontaneous abortion, constipation and urinary frequency. Leiomyomas represent the most common indication for hysterectomy. Although leiomyomas represent a significant public health issue for women, the mechanisms that govern this tumor genesis are poorly understood.

Keywords: IGF – I, Insulin-like growth factor, IGF- I receptor , tyrosine kinase, leiomyoma

INTRODUÇÃO

Os miomas ou leiomiomas – tumores de células do músculo liso uterino – são os tumores mais comuns do trato genital feminino e acometem 20 a 30% das mulheres em idade reprodutiva, chegando a uma incidência de aproximadamente 50%, se considerarmos apenas as mulheres de raça negra (Sharara, 1995). Em um levantamento realizado entre 1988 e 1990, os miomas foram responsáveis por 1/3 das 1,7 milhões de histerectomias realizadas nos Estados Unidos (Sharara, 1995). Além disso, os miomas causam uma série de sintomas desagradáveis como: sangramento anormal, desconforto pélvico, abortamento espontâneo, aumento da frequência urinária e constipação.

Estes tumores são benignos e surgem no miométrio contendo quantidade variável de tecido conectivo fibroso. Nenhum gene específico foi identificado como responsável pelo surgimento dos miomas. Estudos cromossômicos, no entanto, mostram aberrações citogenéticas heterogêneas, sendo cinco as mais freqüentes: translocação específica entre os cromossomas 12 e 14, trissomia do 12, deleção do cromossoma 7 e rearranjo envolvendo o braço longo do cromossoma 12 e o braço curto do 6. Assim múltiplos locus gênicos parecem envolvidos (Nowak, 1997).

O fato dos miomas aparecerem durante a fase reprodutiva, aumentarem durante a gestação e regredirem após a menopausa sugere sua dependência dos hormônios ovarianos (Otubu, 1982; Giudice, 1993, Strawn, 1995). Os análogos do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), os quais reduzem a concentração sérica de estrogênio e progesterona, como visto na menopausa, têm sido usados como a terapia medicamentosa para diminuir os miomas pré-cirurgicamente. No

entanto, estes tratamentos não são adequados a longo prazo, devido ao grande número de efeitos colaterais, como por exemplo, diminuição da massa óssea (Stewart, 1992).

A administração exógena de progesterona com análogos do GnRH resultam em uma redução muito menor do volume dos miomas, comparado-se ao tratamento isolado com análogos. Isto sugere que a progesterona também possa exercer efeito na promoção do crescimento dos miomas (Nowak, 1997).

Embora não tenha sido encontrada diferença entre a concentração sérica de estrogênio na mulher com mioma e sem mioma, sua concentração é maior nos miomas do que no miométrio vizinho (Otubu, 1982). Isto provavelmente se deva a diminuição do metabolismo do estradiol a estrona, causado por uma menor quantidade de 17α -hidroxi-desidrogenase, nestes tumores do que no miométrio (Otubu, 1982). Além disto, a concentração de receptores de estradiol é maior em miomas do que em miométrio (Rein, 1990). Se o estradiol age diretamente sobre a proliferação celular dos miomas ou via mediadores como os fatores de crescimento não está bem determinado. Vários fatores de crescimento são potentes mitógenos e, o IGF -I (*insulin-like growth factor - I*), particularmente, tem sido apontado como mediador do estradiol em ratos e úteros humanos (Chandrasekhar, 1992).

Há crescentes evidências de que a insulina, o IGF1e seus receptores estejam envolvidos na transformação tumoral de tecidos hormônio dependentes (mama e trato gastrointestinal), e de tecidos não hormônio dependentes (cérebro, medula, rins). O fato de que muitos tumores renais contêm quantidades aumentadas de glicogênio, fosfolipídios e triglicerídios sugere o envolvimento da insulina e/ou

IGF1 no carcinoma renal (Kellerer, 1995). Estas observações indicam que os IGFs podem ter um importante papel na tumorigênese.

Embora os miomas representem um significativo problema de saúde pública para as mulheres, os mecanismos envolvidos na gênese destes tumores é pobremente entendido. Esta revisão apresenta o que se conhece da relação entre os miomas e o IGF-I.

IGF1

O IGF1 é um hormônio peptídico ou fator de crescimento que apresenta homologia na maioria de seus aminoácidos com a insulina e o IGF-II (Chandrasekhar, 1992; Roith, 1997). Seu peso molecular é de 7649 Daltons (Wang, 1999). Os IGFs são formados por 70 aminoácidos, são sintetizados no fígado, retêm o peptídeo C e, têm um carbono terminal (Chandrasekhar, 1992; Roith, 1997). Os IGFs circulam em concentrações nanomolares, largamente ligados a uma de seis proteínas de ligação que modulam as suas atividades (Roith, 1977). O gene do IGF1 humano consiste em pelo menos 5 exons, os quais são localizados dentro de uma região de 90 kilobases, no cromossoma 12. Há 2 precursores de RNA para IGF-I, os quais diferem na parte carboxi-terminal. No entanto, o IGF1 derivado de ambos precursores são idênticos (Gloude-mans, 1990).

Ambos IGFs são essenciais no desenvolvimento embrionário e mantém a concentração nanomolar na vida adulta. Após o nascimento o IGF1 parece ter um papel, predominantemente, regulador do crescimento (Roith, 1997). A interação do

hormônio do crescimento(GH) com seu receptor hepático estimula a expressão do gen de IGF1 e a liberação do IGF1I. Assim a concentração de IGF1 usualmente é semelhante a do GH durante as 24 horas do dia, por sua vez o IGF1 inibe a secreção do GH pela hipófise (Roith,1997). O GH, o hormônio da paratireóide e os esteróides sexuais regulam a produção de IGF1nos ossos, enquanto os esteróides sexuais são os principais reguladores do IGF1no sistema reprodutor.

PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO DOS IGFs

As proteínas de ligação dos IGFs (IGFBP) assim como os IGFs são sintetizados primeiramente no fígado, mas também localmente pela maioria dos tecidos, onde eles agem de maneira autócrina ou parácrina. As proteínas de ligação dos IGFs são capazes de modular a proliferação celular induzida pelo IGF tanto de uma maneira positiva quanto negativa. Assim a circulação das proteínas de ligação podem limitar ou facilitar o acesso dos IGFs a tecidos específicos e para os receptores de IGF1 e Insulina. Das seis proteínas de ligação, a proteína 3 de ligação do IGF liga mais de 95% dos IGFs séricos (Roith,1997). Como a proteína 3 de ligação do IGF1apresenta um peso molecular de 150kDa, complexos formados por ela não cruzam a barreira capilar ficando retidos na circulação (Wang,1999). Dependendo da concentração de proteína 3 de ligação do IGF seu efeito poderá ser de estímulo ou inibição do crescimento induzido pelo IGF1(Van Der Ven, 1996).

O IGF1e a proteína 3 de ligação do IGF1formam um complexo com outra subunidade protéica, a subunidade ácido-lábil. Neste complexo ternário os IGFs têm uma meia-vida de muitas horas. Uma vez liberados do complexo, os IGFs deixam a

circulação e entram nas células alvo com a ajuda de outra proteína de ligação (Roith,1997). O GH aumenta a concentração sérica de ambos, subunidade ácido-lábil e proteína 3 de ligação do IGF (Roith,1997; Rajaram,1997).

O GH, a progesterona e a insulina regulam a síntese da IGFBP-I. Na fase folicular do ciclo menstrual o crescimento endometrial é promovido pelo estradiol via IGF-I, o qual por sua vez estimula a proliferação celular do endométrio. Na fase lútea a progesterona estimula o endométrio a secretar IGFBP-I a qual promove a diferenciação endometrial e modula a ação do IGF-I. Embora a circulação de IGFBP-I diminua na fase lútea um aumento na produção local a nível de endométrio tem sido observado quando a concentração de progesterona está elevada. Wang (2000) demonstrou por RT-PCR que o RNAm da IGFBP-I se expressa na pós-menopausa somente naquelas pacientes que recebem terapia de reposição combinada (premarin 0,625mg/dia + medroxiprogesterona 5mg/dia).

Várias proteínas de ligação dos IGFs, incluindo a 1, 2, 4 e 6 inibem a ação do IGF ligando-se a ele e impedindo a sua ligação ao seu receptor. A proteína de ligação 1 quando fosforilada inibe a ação do IGF, em contraste, sua forma não fosforilada potencializa a ação do IGF1na síntese de DNA em células do músculo liso animal (Rajaram,1997). Assim a mesma proteína de ligação do IGF pode exercer diferentes efeitos sob condições diversas. Ao contrário das demais proteínas de ligação do IGF, a 5 tem efeito positivo para uma variedade de células (Rajaram,1997).

Algumas proteínas de ligação do IGF ligam-se aos fatores de crescimento com maior afinidade do que os receptores de IGF, evitando assim a ativação de

mecanismos intracelulares. A afinidade destas proteínas de ligação aos IGFs pode ser reduzida pela quebra da protease ou aumento da fosforilação da proteína de ligação, ou pela ligação das proteínas a superfície das células mais do que na matriz extracelular. Embora muitas proteínas de ligação do IGF1 sejam capazes de interagir com a superfície da membrana celular, não há evidências de que estes sítios de ligação exerçam função de transdução de sinal (Murphy, 1998). A afinidade reduzida aumenta a atividade biológica dos IGFs pelo aumento da quantidade de fatores de crescimento livres, disponíveis para os receptores de IGF – I.

RECEPTOR DE IGF1

Os receptores de IGF1 são glicoproteínas heterotetraméricas, com duas subunidades alfa (135 kD) e duas subunidades beta (90-105 kD) (Capp, 1996). A subunidade α é exclusivamente extracelular, enquanto a subunidade β apresenta uma porção extracelular glicosilada, uma transmembrana e uma região intracelular (figura 1). As subunidades α e β são ligadas por pontes dissulfeto. A atividade tirosinaquinase intrínseca deste receptor se localiza na parte citoplasmática da subunidade β . Esta parte revela-se muito semelhante, aproximadamente 80%, com o receptor de insulina. Os receptores de insulina e IGF1 têm potencial de formar um receptor híbrido heterotetramérico. Este receptor híbrido tem capacidade de se ligar a insulina e ao IGF1 com alta afinidade. (Kellerer, 1995). No entanto, vários grupos sugerem que o receptor híbrido é mais responsivo ao estímulo de IGF1 do que da insulina e assim exibiria propriedades funcionais predominantemente de um receptor de IGF-I.

TRANSDUÇÃO DO SINAL DE IGF1

A ligação dos IGFs à subunidade α do receptor estimula a atividade quinase na subunidade β (Kellerer, 1995). Esta apresenta uma atividade quinase intrínseca e através da fosforilação das proteínas celulares nos sítios de tirosina transmitem o sinal para o sistema efetor das células alvo (Capp, 1996) estimulando o crescimento.

A ativação do receptor de insulina e de IGF1 evocam respostas similares dentro da célula, no entanto, como a insulina regula a função metabólica (Capp, 1998) e os IGFs regulam o crescimento e diferentes funções a rota final que estes hormônios ativam dentro da célula devem ser separadas e distintas (Roith, 1997).

IGF1E MIOMAS

O mecanismo pelo qual o receptor de IGF1 media a formação e o crescimento tumoral permanece incerto. No entanto, há evidências de que a ativação dos receptores dos fatores de crescimento seja um mecanismo pelo qual os genes supressores tumorais e oncogenes modulam a proliferação celular e consequentemente a formação e/ou o crescimento dos tumores (Blaskeley, 1997). A expressão aumentada de receptores de IGF1 funcionais são suficientes, não somente para aumentar a proliferação celular, mas também a sua transformação (Blaskeley, 1997). Este potencial de crescimento tumoral não é conferido a células com expressão aumentada de receptores de IGF1 deficientes, nos quais específicos aminoácidos sofreram mutações. Além disto, partes específicas do C-terminal do

IGF1 têm se mostrado essenciais na mediação do sinal de transformação. Desta forma, é especulado como terapêutica futura uma alteração específica do receptor de IGF1 na transdução do sinal como agente antitumoral efetivo (Blaskeley, 1997).

Estudos recentes têm mostrado que o leiomioma mostra uma resposta proliferativa aumentada ao IGF1 *in vitro* comparado ao miométrio normal. Esta resposta é atribuída ao fato do leiomioma expressar níveis mais elevados do receptor de IGF1 (Strawn, 1995). Isto sugere que os IGFs possam exercer um importante papel no crescimento e transformação destes tumores (Van Der Ven, 1997).

A expressão do gene de IGF1 no leiomioma parece ser estrógeno-dependente. Sua expressão é maior durante a fase proliferativa e diminui durante a fase secretora, sendo indetectável em pacientes tratadas com agonistas do GnRH (Giudice, 1993). Ao contrário, a expressão do receptor de IGF1 não parece ser regulada pelo estrogênio e está aumentado nos miomas em relação ao miométrio adjacente (Giudice, 1993; Tommola, 1989). Os agonistas do GnRH podem agir através da diminuição dos níveis de estradiol e assim alterar a produção de IGF1 no local, sem mudar os níveis de receptores. Os níveis plasmáticos de GH e IGF1 diminuem significativamente após o tratamento com os agonistas do GnRH, provavelmente como resultado do estado hipoestrogênico induzido por estes agonistas. Se isto contribui para diminuição dos leiomiomas ainda não é sabido. Sharara, demonstrou que a expressão gênica do receptor do GH foi similar em ambos, miomas e miométrio, não sendo alterado pelo tratamento com agonistas do

GnRH, sugerindo que o receptor de GH não seja regulado pelo estrogênio (Sharara, 1995).

A alta afinidade dos receptores de IGF1 tem sido identificada nas membranas uterinas usando métodos com material radioativo (Chandrasekhar, 1992). Estudos mostram que a maior parte do IGF1 marcado se liga às células musculares do miométrio. Assim, estes estudos mostram que, ambos, IGF1 e seus receptores são mais abundantes no miométrio, sendo sugerido que o IGF1 aja no músculo liso do miométrio como um fator de crescimento autócrino e parácrino (Tommola, 1989; Chandrasekhar, 1992).

Estudos *in vitro* usando cultura de células miometriais e reação de polimerase em cadeia com transcriptase reversa têm confirmado que o IGF1 é um mitógeno para estas células, particularmente em combinação com o EGF -Epidermal Growth Factor-, com o PDGF - Platelet-derived growth factor- e o TGF α - Transforming growth factor - α (Vollenhoven, 1995).

Tanto o miométrio normal quanto o leiomioma expressam RNAs para o IGF1 e o IGF-II. Outros estudos sugerem que os níveis de IGF1 RNA são similares em ambos os tecidos, no entanto, estão suprimidos no leiomiossarcoma, tumor maligno (Gludemans, 1990). Ao contrário, os níveis de IGF-II RNA são consistentemente mais elevados em leiomiossarcomas do que no tecido miometrial normal. (Gludemans, 1990). Enquanto os tumores benignos contêm uma quantidade substancialmente mais elevada de tecido conectivo, os tumores malignos de músculo liso contêm quase exclusivamente células de músculo liso. A observação de que o gene de IGF1 é suprimido com o aumento da malignidade

poderia indicar que a expressão do IGF1 se desse no tecido conectivo do miométrio ao invés das células de músculo liso. Entretanto estudos imunohistoquímicos mostram que o IGF1 se apresenta exclusivamente nas células do músculo liso e não no tecido conectivo (Gloudemans, 1990).

A secreção de IGF1 e IGF-II pelos miomas obtidos de mulheres tratadas com agonista do GnRH, no estudo de Rein e colaboradores, foi significativamente menor do que dos tecidos obtidos de mulheres do grupo controle que receberam somente placebo (Rein, 1990), o mesmo acontecendo em relação a secreção de IGF1 e IGF-II a nível de miométrio, a qual se encontra diminuída nas amostras daquelas mulheres submetidas ao tratamento com agonista do GnRH em relação ao placebo. Isto sugere que a regressão dos miomas uterinos a qual esta associada com a administração crônica de agonista do GnRH poderia ser regulada em parte pela diminuição da concentração local de IGF1 e IGF-II (Rein, 1990).

CONCLUSÃO

O IGF1 parece estar envolvido com o surgimento dos miomas, no entanto, seu real papel na gênese e crescimento dos mesmos ainda não está claro. Mais estudos que avaliem a presença e a função do IGF-I, de seu receptor e das proteínas de ligação para IGF nestes tumores devem ser realizados.

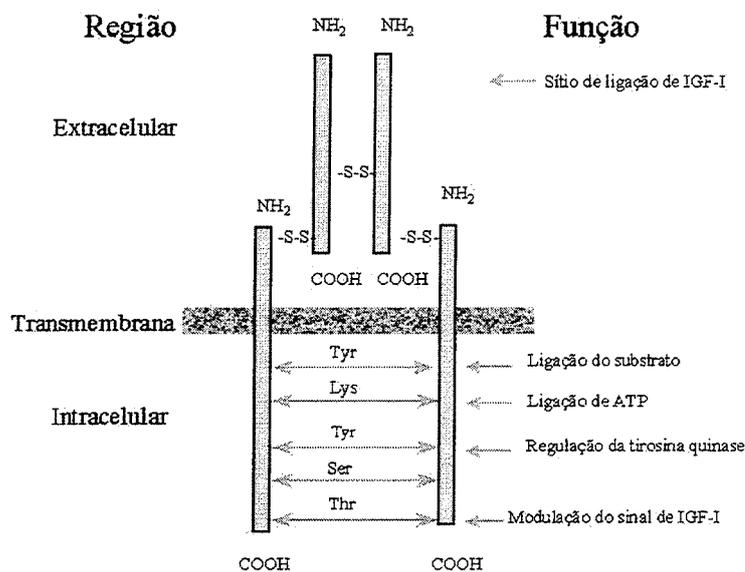
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BLAKESLEY, V.A., STANNARD, B.S., KALEBIC, T. Role of IGF1 receptor in mutagenesis and tumor promotion. *Journal of Endocrinol.* 152: 339-344, 1997.
2. CAPP, E.; BRANDELLI, A.; MONEGO, H.; RIBEIRO, M.F.; FREITAS, M.S.; PUREUR, R.; TORTORELLA, H.; CORLETA, H. Binding and tyrosine kinase activity of insulin receptor in human normal and neoplastic endometrium. *Med Scien Res*, 24: 621-623, 1996.
3. CAPP, E.; CORLETA, H. Transdução do sinal de insulina e Diabetes mellitus tipo II. *Pesquisa médica*, 32(1), 24-31, 1998.
4. CHANDRASEKHAR, Y.; HEINER, J. OSUAMKPE, M. S. and NAGAMANI, M. Insulin-like growth factor I and II binding in human myometrium and leiomyomas. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 166 (I) 64-69, Jan. 1992.
5. DAWOOD, M. Y. and DAWOOD, F.S.K. Plasma insulin-like growth factor-I, CA-125, estrogen and progesterone in women with leiomyomas. *Fertility and Sterility*, 61(4): 617-21, 1994.
6. GIUDICE, L.C.; IRWIN, J.C.; DSUPIN, B.A.; PANNIER, E.M.; JIN, I.H.; VU, T.H.; HOFFMAN, A.R. Insulin-like growth factor (IGF), IGF binding protein (IGFBP), and IGF receptor gene expression and IGFBP synthesis in human uterine leiomyomata. *Human Reproduction*, 8:1796-1806, 1993.
7. GLOUDEMANS, J. et al. Insulin-like Growth Factor Gene Expression in Human Smooth Muscle Tumors. *Cancer Research*, 50 6689-6695, 1990.

8. KELLERER, M.; CORLETA, H.; MÜHLHOFER, A.; CAPP, E.; MOSTHAF, L.; BOCK, S.; PETRIDES, P.; HÄRING, H.U. Insulin and insulin like growth factor-1 receptor tyrosine kinase activities in human renal carcinoma. *Int J Cancer*, 62: 501-507, 1995.
9. MURPHY, L.J. Insulin-like growth factor-binding proteins: functional diversity or redundancy?. *Journal of Molecular Endocrinology*, 21; 97-107, 1998.
10. NOVAK, R. A. Effects of growth factors on leiomyomas. In: Osteen K and Diamond M.(eds) *Endometrium and Endometriosis*. Malden, M.A.: Blackwell Science, 301-310, 1997.
11. RAJARAM, S. et al. Insulin-like Growth Factor-Binding Proteins in Serum and Other Biological Fluids: Regulation and Functions. *Endocrine Reviews* 18(6):801-31, 1997.
12. ROITH, D.L. Insulin-like growth Factors, *The New England J of Medicine*, 336 (9): 633-640, Feb 27, 1997.
13. SHARARA, F.I.; NIEMAN, L.K. Growth hormone messenger ribonucleic acid expression in leiomyoma and surrounding myometrium. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 173(3): 814-19, 1995.
14. STRAWN, E.Y. et al. Insulin-like growth factor I promotes leiomyoma cell growth in vitro. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 172(6): 1837-44, 1995.
15. STWEART, E.A.; FRIEDMAN, A.J. Steroidal treatment of myomas: preoperative and long term medical therapy. *Semin Reprod Endocrinol.* 10:344-357, 1992.

16. VAN DER VEM, L.T.M. et al. Modulation of insulin-like growth factor (IGF) action by IGF-binding proteins in normal, benign and malignant smooth muscle tissues. *J. Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81 (10):3629-35, 1996.
17. VOLLENHOVEN, B.J.; HERINGTON, A.C. AND HEALY, D.L. Epidermal Growth Factor and Transforming Growth Factor- α in uterine Fibroids and Myometrium. *Gynecol Obstet Invest*, 40: 120-124, 1995.
18. WANG, H.S. and CHARD, T. IGFs and IGF-binding proteins in the regulation of human ovarian and endometrial function. *Journal of Endocrinology*. 161, 1-13, 1999.
19. WANG, H.S., et al. Elevation of insulin-like growth factor-binding protein-1 mRNA expression following hormone replacement therapy. *Human Reproduction*, 15(1):50-4, 2000.

Figura 1 – Modelo do receptor de IGF-I



Legenda da figura 1. O receptor de IGF1 é uma proteína transmembrana, que mantém sua estrutura através de pontes de enxofre. A subunidade α é onde se liga o IGF-I. O sinal é então transmitido à subunidade β , que possui uma porção extracelular, transmembrana e intracelular. Alguns aminoácidos na subunidade β têm função já definida. Sítios de tirosina são necessários para ativação da tirosina quinase. Lisina é o sítio de ligação de ATP. Alguns resíduos de tirosina estão relacionados com a ligação do substrato do receptor (IRS 1). Resíduos de serina e treonina podem estar relacionados com a modulação da transmissão do sinal.