

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CLÍNICA MÉDICA**

**EXPRESSÃO DE mRNA E AUTOFOSFORILAÇÃO DO RECEPTOR DE IGF-I
(INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR I) EM MIOMÉTRIO E MIOMA HUMANO**

EUNICE BEATRIZ MARTIN CHAVES

**Orientadora: Profa. Dra. Helena von Eye Corleta
Co-orientador: Prof. Dr. Edison Capp**

Dissertação de Mestrado

2002

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, louvo e agradeço a Deus fonte de minha vida, de minha paciência e perseverança; e ao Espírito Santo, por ser luz de minha inteligência.

Aos meus orientadores, Professora Helena von Eye Corleta e Professor Edison Capp, pelos conselhos e pelo estímulo, meu profundo agradecimento.

À professora Ilma Simoni Brum da Silva agradeço por sua disponibilidade e incansável dedicação durante todo tempo que estive em seu laboratório.

Na pessoa destes três professores, quero homenagear a todos que conseguem se dedicar à pesquisa em nosso país.

Aos professores Paulo Naud, Luiz Kucharscki e Roselis Silveira Martins da Silva pelo interesse e apoio demonstrados.

A todos os parceiros de trabalho do laboratório de Fisiologia, mesmo sem poder citar a todos, gostaria de agradecer, à Débora Martinho Morsch, à Adriane Pozzobon, à Mariana Toscani, à Fabíola Cervi, ao Guilherme Toscani, ao Rafael Orcy, ao Eduardo Weiler, à Júlia Stoll, pela compreensão e companheirismo.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul onde fiz minha formação acadêmica e ao Pós-Graduação em Clínica Médica onde concluo este mestrado.

Ao auxílio financeiro recebido pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE).

Aos colegas do Serviço de Medicina Ocupacional (SMO) pelo apoio e carinho recebidos.

Às pacientes que colaboraram com este estudo, o meu profundo agradecimento.

DEDICATÓRIAS

A minha família:

ao Gerson, meu esposo, pelo amor, compreensão e apoio; e a meus filhos Pedro, Tiago e André de quem privei minha companhia muitas vezes durante a realização do mestrado;

aos meus pais, sempre muito presentes em minha vida, pelo estímulo e dedicação, pelo exemplo de garra e perseverança;

aos meus irmãos, Elaine , Ana Lúcia e Luciano pelo exemplo de fé e doação, aos meus sogros, cunhados, sobrinhos;

dedico o êxito deste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	2
ABREVIATURAS	6
INTRODUÇÃO	7
REVISÃO DE LITERATURA	9
1 MIOMAS	9
1.1 Dados epidemiológicos	10
1.2 Fatores etiológicos	11
1.3 Diagnóstico	12
1.4 Tratamento	12
2 IGF-I	16
3 PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO DOS FATORES DE CRESCIMENTO SEMELHANTES À INSULINA - IGFBP	18
4 IGFBP PROTEASES	23
5 RECEPTORES DE IGF-I	23
5.1 Diferenças entre os receptores de Insulina e IGF-I	27
5.2 Transdução do sinal de IGF-I	27
6 IGF- I E MIOMA	29
OBJETIVOS	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ARTIGO EM PORTUGUÊS	46
Expressão de mRNA e autofosforilação do receptor de IGF-I (Insulin-like Growth Factor I) em miométrio e mioma humanos	46
INTRODUÇÃO	49
MATERIAL E MÉTODOS	51
RESULTADOS	55
DISCUSSÃO	56

REFERÊNCIAS	59
ARTIGO EM INGLÊS.....	68
Insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor mRNA expression and autophosphorylation in human myometrium and leiomyoma.....	68
INTRODUCTION	70
MATERIALS AND METHODS	71
RESULTS	75
DISCUSSION	76
REFERENCES	78
ARTIGO DE REVISÃO	87
Miomatose uterina – papel do IGF- I e seu receptor.....	87
ANEXO 1.....	104

ABREVIATURAS

IGF-I: Insulin-Like Growth Factor I

IGF-II: Insulin-Like Growth Factor II

IGF-IR: Insulin-Like Growth Factor I Receptor

IGFBPs: Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins

EGF: Epidermal Growth Factor

PDGF: Platelet-Derived Growth Factor

HDL: High-Density Lipoprotein

GnRH: Gonadotropin-Releasing Hormone

GH: Growth Hormone

TGF α :Transforming growth factor- α

IRS: Insulin receptor substrate

MAPKinase: mitogen activated protein kinase

SH2: Src homology 2

SOS: Son of Sevenless

PCR: Reação da Polimerase em Cadeia

RT: Transcriptase Reversa

INTRODUÇÃO

Os miomas ou leiomiomas são tumores de células do músculo liso uterino, sendo os mais comuns do trato genital feminino, acometendo 20 a 30% das mulheres em idade reprodutiva, chegando a uma incidência de aproximadamente 50%, se consideradas apenas as mulheres de raça negra (Sharara & Nieman, 1995; Nowak, 1997). 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 & Nieman, 1995). Segundo Cramer e Patel, após cuidadoso exame anatomopatológico de espécimes cirúrgicas, a prevalência pode ser tão alta quanto 77% (Cramer & Patel, 1990).

Além disso, os miomas causam uma série de sintomas desagradáveis, como: sangramento anormal, desconforto pélvico, abortamento espontâneo, aumento da frequência urinária e constipação (Stewart & Friedman, 1992; Schwartz, 2001; Stewart, 2001).

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 e cols., 1993; Dawood & Dawood, 1994; Strawn e cols., 1995; Sharara & Nieman, 1995; Nowak, 1997; De Leo e cols., 2001; Maruo e cols., 2001; Schwartz, 2001). 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 & Friedman, 1992; Christman & McCarthy, 2001; Guarnaccia & Rein, 2001).

Há crescentes evidências de que a insulina, o IGF-I e seus receptores estejam envolvidos na transformação tumoral de tecidos hormônio dependentes como: mama e trato gastrointestinal, e de tecidos não hormônio dependentes como: cérebro, medula e rins (Kellerer e cols., 1995; Corleta e cols., 1996). O fato de muitos tumores renais conterem quantidades aumentadas de glicogênio, fosfolipídios e triglicerídios sugere o envolvimento da insulina e/ou IGF-I no carcinoma renal (Kellerer e cols., 1995). Estudo em cultura de fibroblastos normais e de quelóides mostrou que apenas a expressão do receptor de IGF-I estava aumentada nos fibroblastos dos quelóides entre oito receptores tirosina quinase testados (Yoshimoto e cols., 1999). Estas observações indicam que os IGFs podem ter um importante papel na tumorigênese.

Embora os miomas representem um significativo problema de saúde pública, os mecanismos envolvidos na gênese destes tumores é pobremente entendido (Nowak, 2001).

REVISÃO DE LITERATURA

1 MIOMAS

Os miomas são os tumores mais comuns no trato genital feminino. Estes tumores são benignos e surgem no miométrio, sendo compostos por células do músculo liso, quantidade variável de tecido conectivo fibroso e colágeno. A grande quantidade de colágeno e de tecido fibroso é responsável por sua designação incorreta como fibróide. Os leiomiomas podem ocorrer em qualquer parte da parede uterina, podendo ser intramurais, submucosos, subserosos ou pedunculados (Benda, 2001).

Embora freqüente, é estimado que apenas 20-50% das mulheres com um ou mais miomas experimentarão sintomas diretamente ligados aos miomas (Vollenhoven e cols.,1990; Stovall, 2001). Os sintomas relacionados aos miomas dependerão do tamanho, posição e número dos miomas presentes (Vollenhoven e cols., 1990).

1.1 Dados epidemiológicos

Considerando-se que a miomatose uterina é responsável pela indicação de 200.000 a 300.000 histerectomias realizadas anualmente nos Estados Unidos em mulheres em idade reprodutiva, isto representa, sem dúvida, um grande problema de saúde pública (Schwartz, 2001).

Avaliar os aspectos epidemiológicos é um grande desafio pois estes tumores atingem um grande número de mulheres, em geral sem se tornarem clinicamente evidentes até a 5ª década de vida (Baird e cols., 1998). Desta forma, torna-se difícil avaliar os fatores de risco e em que momento eles operam.

No entanto, cabe ressaltar alguns aspectos já estabelecidos: o diagnóstico de miomas aumenta com a idade, durante a fase reprodutiva. A incidência parece diminuir após a menopausa, considerando-se apenas os casos tratados por histerectomia. A prevalência de miomas entre mulheres negras é 2-3 vezes maior que entre as brancas, em todas as idades (Marshall e cols., 1997). O risco de surgimento de miomas é tanto maior quanto mais cedo ocorrer a menarca. Muitos estudos também mostram que o risco de miomas diminui em 20-50% entre mulheres que tiveram gestações a termo, sendo inversamente proporcional ao número de gestações. O risco também aumenta conforme aumenta o tempo em que ocorreu o último parto (Marshall e cols., 1998).

Estudo recente mostrou associação entre infertilidade e nuliparidade somente naquelas pacientes com miomas submucosos, sendo estes a causa e não consequência das situações acima (Faerstein e cols., 2001).

Quanto ao uso de anticoncepcionais orais, existem estudos que mostram que a incidência de miomas é diminuída somente durante o seu uso, enquanto outros mostram que não se altera (Marshall e cols., 1998).

1.2 Fatores etiológicos

Os miomas surgem das células do músculo liso do miométrio. Um estudo com a isoenzima glicose-6-fosfato desidrogenase mostrou que cada mioma surge de uma única linhagem celular monoclonal (Townsend e cols., 1970).

Nenhum gene específico foi identificado como responsável pelo surgimento dos miomas (Nowak, 1997). Estudos cromossômicos, no entanto, mostram alterações citogenéticas heterogêneas em 40%, sendo cinco as mais frequentes: translocação específica entre os cromossomas 12 e 14, trissomia do 12, deleção do cromossoma 7 e rearranjos envolvendo o braço longo do cromossoma 12 e o braço curto do 6. Assim, múltiplos locus gênicos parecem envolvidos (Nowak, 1997). Brosens e colaboradores demonstraram que os miomas submucosos (12%) apresentam menos rearranjos que os intramurais (35%) e os subserosos (29%) (Brosens e cols., 1998). Embora estes resultados impliquem que os miomas submucosos sejam menores, sua localização faz com que sejam bastante sintomáticos (Gross & Morton, 2001).

Outros fatores parecem influenciar o crescimento dos miomas, incluindo estrógeno, progesterona, fatores de crescimento semelhantes à insulina I e II (IGF- I e II), fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento transformador β

(TGF- β) e até mesmo a própria insulina (Tommola e cols., 1989; Fayed e cols., 1989; Rein e cols., 1990; Nagamani & Stuart, 1992; Harrison-Woolrych e cols., 1994; Vollenhoven, 1995). Sendo o IGF-I alvo do nosso estudo, será abordado especialmente.

1.3 Diagnóstico

O diagnóstico de miomas uterinos pode ser feito através do exame ginecológico e confirmado através da ultra-sonografia transvaginal. Métodos mais sofisticados para auxiliar na escolha terapêutica poderão ser utilizados. A ressonância magnética é útil para determinar o número, a localização e o tamanho dos miomas, bem como para diferenciar a miomatose uterina da adenomiose. A histerossalpingografia, a sono-histerografia e a histeroscopia avaliam a cavidade uterina. A utilização destes métodos diagnósticos deve levar em conta o custo-benefício (Guarnaccia & Rein, 2001).

1.4 Tratamento

A maioria dos miomas são tumores assintomáticos. Assim, quando estes forem pequenos, requerem apenas a observação através do exame clínico e/ou ultra-sonografia transvaginal a cada 12 meses (Guarnaccia & Rein, 2001). Atualmente, a intervenção cirúrgica de miomas, baseada somente no tamanho uterino (especialmente > 12 semanas), na ausência de sintomas não se justifica

mais (Guarnaccia & Rein, 2001). Não há dados que mostrem que a velocidade de crescimento esteja relacionada com a incidência de leiomiossarcoma, com um pico de incidência de menos de 2% em mulheres na pós-menopausa e 0,23% em mulheres pré-menopausa (Parker e cols., 1994).

O risco de transformação maligna destes tumores tem sido relatado como entre 0.29 a 1% (Guarnaccia & Rein, 2001). Para outros autores, a transformação maligna do leiomioma é um evento extremamente raro (< 0,1%) ou talvez não ocorra (Gross & Morton, 2001).

A taxa de mortalidade por histerectomia por indicações benignas encontra-se em 1-1,6 por 1000, enquanto a incidência de leiomiossarcoma descoberto acidentalmente no exame anatomo-patológico é aproximadamente 1 para 2000 (Anderson e cols., 1993). O diagnóstico de sarcoma uterino deve ser considerado naquelas pacientes pós-menopáusicas com massa pélvica, sangramento anormal e dor pélvica (Guarnaccia & Rein, 2001).

A outra justificativa para se realizar histerectomia por miomatose, relacionada à dificuldade da palpação dos anexos, não é mais válida, pois o ultra-som permite o diagnóstico das doenças ovarianas (Guarnaccia & Rein, 2001).

Quanto ao tratamento dos miomas sintomáticos que acometem cerca de 50% das mulheres com este diagnóstico, deve-se avaliar qual a intervenção mais apropriada. A miomectomia versus histerectomia dependerá do desejo da paciente quanto a manter seu útero e sua fertilidade. Quando a opção for a miomectomia, a paciente deverá sempre ser advertida quanto à possibilidade de histerectomia (Guarnaccia & Rein, 2001). Também é importante ressaltar que a recorrência de

miomas é estimada entre 15-30%, sendo que 10% das mulheres necessitam uma nova intervenção (Guarnaccia & Rein, 2001; Stewart, 2001).

Há uma tendência recente de realizar-se a histerectomia por laparoscopia, a qual deve basear-se em diversos fatores, incluindo: características clínicas das pacientes, habilidade e experiência do cirurgião, técnica de maceração dos miomas, morbidade e custo associados com o procedimento (Stewart, 2001).

O uso de análogos do GnRH, por reduzirem o tamanho dos miomas e o sangramento decorrente da presença dos mesmos, melhora os parâmetros hematológicos antes da cirurgia, diminui a perda sangüínea intra-operatória e o tempo cirúrgico, quando são administrados pelo menos 3 meses antes da cirurgia (Guarnaccia & Rein, 2001; Stewart, 2001). Quando administrados a pacientes com úteros entre 14-18 semanas, os análogos do GnRH permitem converter a cirurgia abdominal em histerectomia vaginal. No entanto, quando os úteros são maiores do que 18 semanas, apenas em 10% dos casos foi possível a histerectomia vaginal, sendo questionável a validade do uso dos análogos nesta situação. É importante lembrar que, após a parada do uso dos análogos do GnRH, os miomas retornam rapidamente ao seu tamanho prévio e que estes apresentam efeitos colaterais, como: fogachos, ressecamento vaginal, desconforto nas articulações, risco de osteoporose, redução do HDL (high-density lipoprotein) colesterol, complicações cardiovasculares e neurológicas, não devendo ser utilizados a longo prazo (Christman & McCarthy, 2001; Guarnaccia & Rein, 2001; Stewart & Friedman, 1992).

Outras terapias medicamentosas incluem o uso de esteróides androgênicos como o danazol e a gestrinona, comumente usados no tratamento da endometriose,

que induzem a amenorréia possibilitando, assim, o tratamento da anemia decorrente das perdas sangüíneas causadas pelos miomas. A grande vantagem destas drogas é a manutenção do volume uterino reduzido após o término do tratamento por cerca de 18 meses (Coutinho & Gonçalves, 1989).

Outra droga também testada foi o Mifepristone, que, como antagonista da progesterona, promove redução do tamanho uterino mantendo a concentração de estradiol (Murphy e cols., 1993).

A tibolona tem sido associada com as mais altas taxas de amenorréia em pacientes pós-menopausa com miomas, mostrando também bons resultados para aquelas que fizeram uso de agonistas do GnRH, prevenindo a osteoporose (Palomba e cols., 1998).

A embolização da artéria uterina tem sido utilizada para tratar uma série de problemas hemorrágicos em ginecologia e obstetrícia, sendo uma nova opção para o tratamento de miomas sintomáticos, com melhora da menorragia e diminuição de volume (Goodwin & Wong, 2001). No entanto, mais estudos são necessários para definir quais as indicações deste procedimento, qual o melhor agente, a dose a ser utilizada, duração da resposta clínica, efeito sobre a fertilidade e complicações (Goodwin & Wong, 2001). Estudos recentes também ressaltam a possibilidade da terapia gênica citotóxica ser efetiva na redução do tamanho dos miomas uterinos (Christman & McCarthy, 2001).

A histeroscopia diagnóstica na investigação de sangramentos irregulares é muito útil na diferenciação de miomas submucosos e pólipos que podem permanecer indetectáveis através da dilatação e curetagem (Vollenhoven e cols.,

1990). O desenvolvimento da histeroscopia cirúrgica permite o diagnóstico e tratamento destas lesões (Vollenhoven e cols., 1990).

Assim, a histerectomia abdominal e a vaginal permanecem os tratamentos tradicionais para os miomas grandes e sintomáticos.

Para uma melhor compreensão das relações entre o IGF-I e a miomatose uterina, é importante entender-se o eixo dos fatores de crescimento semelhantes à insulina, o qual é composto por uma rede de moléculas envolvidas no controle da proliferação celular, incluindo quatro classes maiores de proteínas: os fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-I e II), as proteínas ligadoras de IGF ou IGF-binding proteins (IGFBP), as IGF proteases e os receptores do IGF I (IGF-IR) (Rajaram e cols., 1997). A seguir, será abordado cada um, individualmente.

2 IGF-I

O fator de crescimento semelhante a insulina - I (IGF-I) é um hormônio peptídico que apresenta homologia, na maioria de seus aminoácidos, com a pró-insulina e o IGF-II, com potente efeito mitogênico, sendo encontrado na maioria dos tecidos dos mamíferos (Daughaday & Rotwein, 1989; Chandrasekhar e cols., 1992; LeRoith, 1997). Originalmente, os IGFs foram chamados de somatomedinas, em função de sua potente ação no crescimento de cartilagens e tecidos ósseos. No entanto, atualmente se sabe que esta ação ocorre numa série de outras células e tecidos não esqueléticos (Daughaday & Rotwein, 1989; Chandrasekhar e cols., 1992).

Seu peso molecular é de 7649 Daltons (Wang & Chard, 1999). Os IGFs são formados por 70 aminoácidos, são sintetizados no fígado, retêm o peptídeo C e têm um carbono terminal (Chandrasekhar e cols., 1992; LeRoith, 1997). Os IGFs circulam em concentrações nanomolares, largamente ligados a uma de seis proteínas de ligação que modulam as suas atividades (LeRoith, 1997). A maior parte dos IGFs (75-80%) circula no soro humano em complexos de 150-200 kDa, formados pela IGFBP-3 e pela subunidade α ácido-lábil. Menor percentagem, 20-25%, dos IGFs estão associados com IGFBPs com menor peso molecular e menos de 1% circula na forma livre (Hasegawa e cols., 1996).

O gene do IGF-I humano consiste em, pelo menos, 5 exons, os quais são localizados dentro de uma região de 90 kilobases, no braço longo do cromossoma 12. Há 2 precursores de mRNA para IGF-I, os quais diferem na parte carboxi-terminal. No entanto, o IGF-I derivado de ambos os precursores são idênticos (Gloude-mans e cols., 1990).

Ambos os IGFs são essenciais no desenvolvimento embrionário e mantêm a concentração nanomolar na vida adulta. Após o nascimento, o IGF-I parece ter um papel predominantemente regulador do crescimento (LeRoith, 1997). A interação do hormônio do crescimento (GH) com seu receptor hepático estimula a expressão do gene de IGF-I e a liberação do IGF-I. Assim, a concentração de IGF-I usualmente é semelhante à do GH durante as 24 horas do dia. Por sua vez, o IGF-I inibe a secreção do GH pela hipófise (LeRoith, 1997). O GH, o hormônio da paratireóide e os esteróides sexuais regulam a produção de IGF-I nos ossos, enquanto os esteróides sexuais são os principais reguladores do IGF-I no sistema reprodutor.

Os IGFs são secretados em múltiplos tecidos, incluindo fígado, cartilagem e o coração. Têm ação autócrina, parácrina e de mediadores endócrinos do crescimento e da diferenciação celular induzidos pelos estrogênios (Rein e cols., 1990; Howe e cols., 1996).

O IGF-I exerce potente ação mitogênica. É mediador de muitos efeitos do hormônio do crescimento nos tecidos periféricos e divide com a insulina o mesmo espectro de ações metabólicas, sendo, porém, menos potente do que esta. Os efeitos hipoglicemiantes induzidos pelo IGF-I são mediados via receptor de insulina, uma vez que, em altas concentrações, o IGF-I pode se ligar a este receptor.

3 PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO DOS FATORES DE CRESCIMENTO SEMELHANTES À INSULINA - IGFBP

Ao contrário da insulina, que circula na sua forma livre e em baixas concentrações nanomolares, os IGFs são encontrados no soro em altas concentrações nanomolares, ligados a proteínas em complexos binários ou ternários. O IGF-I se liga com alta afinidade a uma família de seis proteínas extracelulares conhecidas como: IGFBP 1- 6, proteínas ligadoras do IGF (Rajaram e cols., 1997; Murphy, 1998; Wang & Chard, 1999).

Embora a existência das IGFBPs tivesse sido suspeitada há mais de três décadas, somente na metade dos anos 80 e início dos 90 elas foram seqüenciadas.

Recentemente, mais quatro membros da família das IGFBP foram identificadas. No quarto Simpósio Internacional sobre IGF, o consenso decidiu

caracterizá-las como proteínas relacionadas às IGFBP (IGFBP-RPs 1 a 4). As IGFBP-RPs apresentam reduzida afinidade pelos IGFs (Murphy, 1998).

As proteínas de ligação dos IGFs (IGFBP), assim como os IGFs, são sintetizadas primeiramente no fígado, mas também localmente pela maioria dos tecidos, onde elas 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 pode limitar ou facilitar o acesso dos IGFs a tecidos específicos e para os receptores de IGF-I e Insulina (Murphy, 1998; Rajaram e cols., 1997). Os níveis de IGFBP intactas na circulação e certos tecidos são determinados também pela atividade de um grupo de enzimas que funcionam como proteases de IGFBP, partindo-as e alternando sua afinidade pelos IGFs, modulando desta maneira a ação dos IGFs (Rajaram e cols., 1997).

Embora as seis IGFBPs pertençam à mesma família de genes, várias características as distinguem entre si. A IGFBP-1 é uma proteína não glicosilada, de 30 kDa. Está presente no líquido amniótico em concentrações 100 a 500 vezes maiores do que as séricas. A IGFBP-2 também é uma proteína não glicosilada, com 31-36 kDa, e é encontrada em quantidades significativas no plasma e fluido cérebro-espinhal. A maior proteína de ligação presente na circulação é a IGFBP-3, cuja massa molecular varia de 38 a 43 kDa, dependendo do número de sítios glicosilados. Na circulação, esta glicoproteína está associada com uma molécula de IGF e uma subunidade ácido-lábil de 80 kDa, formando um complexo de 150 a 200

kDa. A IGFBP-4 é uma proteína não glicosilada que varia de 25 a 36 kDa. Na tabela 1 são apresentadas características gerais das seis IGFBPs humanas.

Embora as IGFBPs difiram em suas estruturas e especificidade de ligação, não está claro se estas diferenças contribuem para suas distintas funções. Nenhuma das IGFBPs apresenta afinidade preferencial pelo IGF-I. Recentemente, vários estudos estão sugerindo que as IGFBPs poderiam ter ações independentes do IGF em certos tipos de células. No entanto, mais experimentos são necessários para esclarecer estes achados (Rajaram e cols., 1997).

Das seis proteínas de ligação, a proteína 3 de ligação do IGF liga mais de 95% dos IGFs séricos (LeRoith, 1997). Como a proteína 3 de ligação do IGF-I, quando ligada a este, forma um complexo que apresenta um peso molecular de 150 kDa, complexos formados por ela não cruzam a barreira capilar, ficando retidos na circulação (Wang & Chard, 1999). Dependendo da concentração da proteína 3 de ligação do IGF, seu efeito poderá ser de estímulo ou inibição do crescimento induzido pelo IGF-I (Van der Ven e cols., 1996).

O IGF-I e a IGFBP 3 formam um complexo com outra subunidade protéica ácido-lábil. Neste complexo terciário, os IGFs têm uma meia-vida de 12 a 15 horas. Uma vez liberados do complexo, os IGFs deixam a circulação e entram nas células-alvo (LeRoith, 1997). O GH aumenta a concentração sérica de ambos, subunidade ácido-lábil e proteína 3 de ligação do IGF (LeRoith, 1997; Rajaram e cols., 1997).

O IGF-I, formando um complexo binário com outras IGFBPs, com peso molecular menor, de aproximadamente 40kDa, apresenta uma meia-vida de 20 a 30 minutos (Rajaram e cols., 1997). Na sua forma livre, o IGF-I apresenta meia-vida de

10-12 minutos. Assim, a distribuição do IGF-I em complexos de 40 kDa ou 150 kDa é um fator determinante da sua biodisponibilidade (Rajaram e cols., 1997).

Pequena porção de IGF-I se liga às demais IGFBP (2, 4, 5 e 6) e apenas cerca de 1% do IGF-I plasmático circula livre (Hasegawa e cols., 1996).

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 durante a fase lútea, um aumento na produção endometrial tem sido observado quando a concentração de progesterona está elevada (Wang e cols., 2000). Estudo de Wang e cols. em endométrio obtido de pacientes pós-menopáusicas com sangramento uterino e sem terapia de reposição hormonal demonstrou, por RT-PCR, que o mRNA da IGFBP-I se expressa na pós-menopausa somente naquelas pacientes que recebem terapia de reposição combinada (estrógenos conjugados 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 sua ligação ao seu receptor. A IGFBP – 1, quando fosforilada, inibe a ação do IGF; em contraste, sua forma não fosforilada potencializa a ação do IGF-I na síntese de DNA em células do músculo liso animal (Rajaram e cols., 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 e cols., 1997).

Algumas proteínas de ligação do IGF ligam-se aos fatores de crescimento com maior afinidade do que os IGFs aos seus receptores, evitando, assim, a ativação de mecanismos intracelulares. A afinidade destas proteínas de ligação aos IGFs pode ser reduzida pela quebra da protease, aumento da fosforilação da proteína de ligação ou pela ligação das proteínas à superfície das células mais do que na matriz extracelular. Embora muitas IGFBPs 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 das IGFBPs aumenta a atividade biológica dos IGFs pelo aumento da quantidade de fatores de crescimento livres, disponíveis para os receptores de IGF-I.

Tabela 1: Proteínas ligação do IGF-I

	Nº de aminoácidos	Massa Molecular KDa	Afinidade ao IGF	Modulação da Ação do IGF	Locais de Síntese
IGFBP-1	234	25,3	I=II	Inibição e/ou poten.	Plas.,plac.,leite, urina,end.,líq.sin., int.,amn., seminal
IGFBP-2	289	31,4	II> I	Inibição	Os acima mais líq. fol. e lin.
IGFBP-3	264	28,7	I=II	Inibição e/ou poten.	Todos acima
IGFBP-4	237	25,9	I=II	Inibição	Fluido fol., int., sin., seminal
IGFBP-5	252	28,5	II>I	Poten.	Fce. e plas.
IGFBP-6	216	22,8	II>I	Inibição	Fce, plas. e líq. amn.

Adaptado de Rajaram e cols. 1997. Abreviaturas: plas.=plasma; plac.=placenta; end.= endométrio; líq.= líquido; sin.=sinovial; int.=intersticial; amn.=amniótico; lin.=linfóide; sem.= seminal; Fce.= fluido cérebro-espinhal; poten.= potencialização.

Vários mecanismos regulam a produção das IGFBPs, os quais podem sofrer variações fisiológicas ou patológicas em diversas situações, como: exercício, cirurgia, gestação, idade, ambiente hormonal (Rajaram e cols., 1997).

4 IGFBP PROTEASES

Em uma variedade de condições fisiológicas a relação entre IGFs e IGFBPs pode variar, facilitando os efeitos dos IGFs nos tecidos. As IGFBPs proteases que degradam os complexos, IGFBP-3 + IGF-I , aumentam, desta forma, o IGF-I livre, contribuindo para o estímulo do crescimento (Rajaram e cols., 1997). Além dos fluidos teciduais, várias células são capazes de secretar IGFBP proteases (Rajaram e cols., 1997).

5 RECEPTORES DE IGF-I

Os receptores de IGF I, bem como os receptores de insulina, pertencem à subclasse 2 dos receptores tirosina quinase (Seedorf, 1995).

Os receptores de IGF I são glicoproteínas heterotetraméricas, com duas subunidades alfa (135 kDa) e duas subunidades beta (90-105 kDa) (Capp e cols., 1996; Nystrom & Quon, 1999). A subunidade α é exclusivamente extracelular, enquanto a subunidade β apresenta uma porção extracelular glicosilada, uma porção transmembrana e uma região intracelular (figura 1). As subunidades α e β são

ligadas por pontes dissulfeto. A atividade tirosina quinase intrínseca deste receptor se localiza na parte citoplasmática da subunidade β , estando envolvida na maioria, se não em todas, as ações biológicas deste receptor (White, 1994; Seedorf, 1995; Bossemeyer, 1995; Nystrom & Quon, 1999; Accili, 2001). A subunidade β é semelhante ao receptor de insulina em aproximadamente 80%.

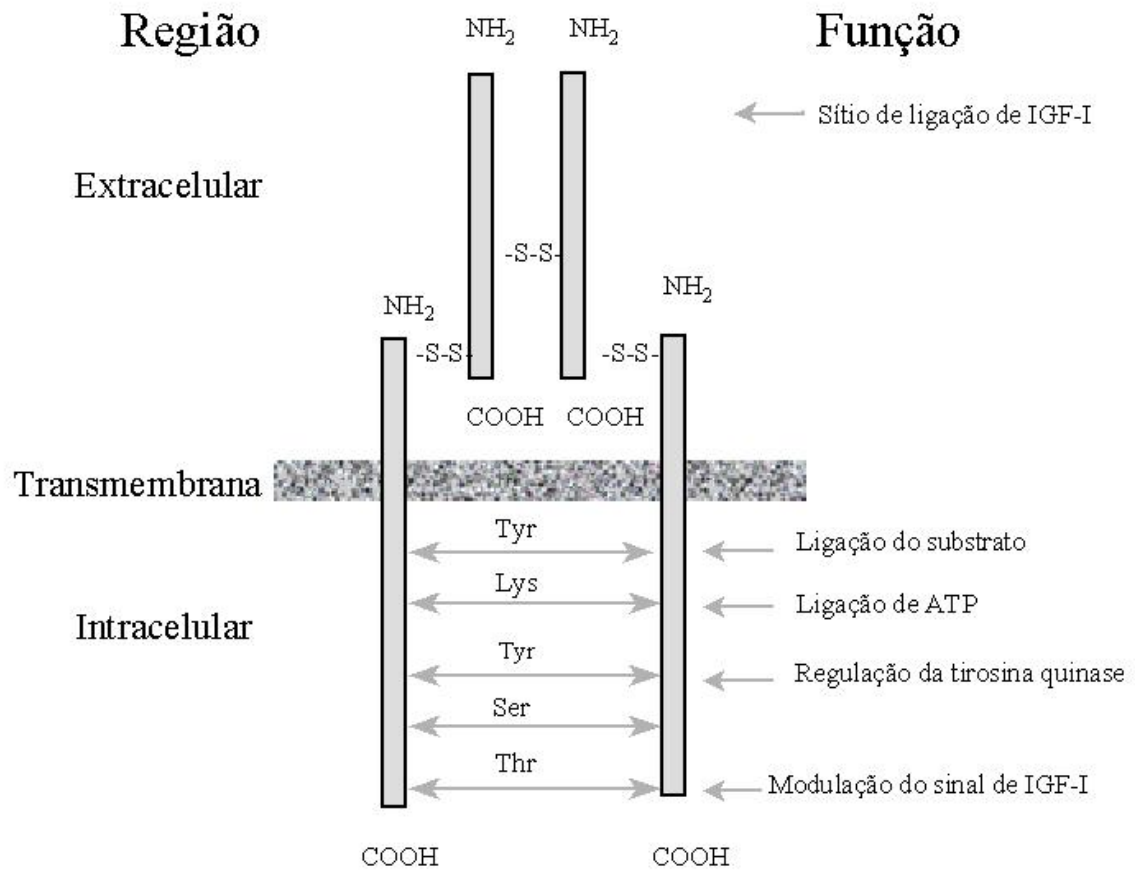


Figura 1 - O receptor de IGF-I é uma proteína transmembrana, que mantém sua estrutura através de pontes de enxofre. A subunidade α é onde se liga o IGF-I. O sinal é então transmitido à subunidade β , que possui uma porção extracelular, transmembrana e intracelular. Alguns aminoácidos na subunidade β 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.

Os receptores de insulina e IGF I têm potencial para formar um receptor híbrido heterotetramérico. Este receptor híbrido tem capacidade de se ligar à insulina e ao IGF-I com alta afinidade (Belfiore e cols., 1999; Kellerer e cols., 1995). No entanto, vários autores sugerem que o receptor híbrido é mais responsivo ao estímulo de IGF-I do que ao da insulina e, assim, exibiria propriedades funcionais predominantemente de um receptor de IGF-I (Belfiore e cols., 1999).

Em concentrações fisiológicas, IGF-I e IGF-II estimulam os receptores IGF-I, sendo também capazes de ativar os receptores de insulina em altas concentrações. A insulina se liga aos receptores de IGF-I com baixa afinidade e não se liga aos receptores de IGF-II (Chandrasekhar e cols., 1992).

Ambos os receptores existem na forma dimérica mesmo na ausência do ligante. Na ausência da insulina ou do IGF-I, a subunidade α exerce efeito inibitório sobre a porção tirosina quinase da subunidade β intracelular. Quando ocorre a ligação do IGF-I ou da insulina aos receptores, ocorre uma rápida mudança conformacional, ativando os domínios tirosina quinase (Håring & Obermaier-Kusser, 1990; Nystrom & Quon, 1999). A metade do dímero citoplasmático ativa os resíduos tirosina da outra metade do receptor. Esta mútua transforilação é conhecida como a autofosforilação do receptor e resulta num aumento da atividade catalítica do receptor (Håring & Obermaier-Kusser, 1990; Nystrom & Quon, 1999). No estado não fosforilado, os sítios catalíticos distais da subunidade β ficam ocultos e o acesso do ATP e de demais substratos fica bloqueado (Håring & Obermaier-Kusser, 1990; Nystrom & Quon, 1999). Quando ocorre a autofosforilação nos resíduos tirosina

1158,1162 e 1163, há um impulso nos sítios catalíticos, levando a uma mudança conformacional que dá acesso irrestrito ao ATP e a outros substratos.

5.1 Diferenças entre os receptores de Insulina e IGF-I

Altos níveis de receptor de insulina são encontrados no fígado e no tecido adiposo, enquanto os receptores de IGF-I estão quase ausentes no fígado e apresentam baixos níveis no tecido adiposo. Isto explica, de certa forma, alguns efeitos preferenciais da insulina no metabolismo (Dupont & LeRoith, 2001). O receptor de IGF-I induz a expressão de genes principalmente envolvidos com a mitose e a diferenciação celular, mas a insulina não (Dupont & Le Roith, 2001). O receptor de IGF-I está estruturalmente relacionado com o receptor de insulina e divide com este vários substratos, tais como IRS-1 e Shc. A convergência parcial da sinalização de ambos os receptores é demonstrada pela observação de que a ablação genética do IRS-1 afeta tanto o crescimento quanto o metabolismo da glicose (Najjar e cols., 1997). O receptor de IGF-I apresenta 3 resíduos de tirosina no domínio C terminal, 1250 e 1251, os quais não estão presentes no receptor de insulina (Blakesley e cols.,1997). Estudos de Najjar e colaboradores demonstraram que pp120 é um substrato exclusivo do receptor de insulina, o que poderia explicar parte dos efeitos celulares diferentes destes receptores (Najjar e cols.,1997).

5.2 Transdução do sinal de IGF-I

A ligação dos IGFs à subunidade α do receptor estimula a atividade quinase na subunidade β (Kellerer e cols., 1995). Esta apresenta uma atividade quinase

intrínseca e, através da fosforilação das proteínas celulares nos sítios de tirosina, transmite o sinal para o sistema efetor das células-alvo, estimulando o crescimento (Capp e cols., 1996).

A ativação do receptor de insulina e de IGF-I evoca respostas similares dentro da célula. No entanto, como a insulina regula a função metabólica (Capp e cols., 1998) e os IGFs regulam o crescimento e diferentes funções, as rotas finais que estes hormônios ativam dentro da célula devem ser separadas e distintas (LeRoith, 1997).

Ao se ligarem às subunidades α dos receptores, a insulina e o IGF-I desencadeiam a atividade tirosina quinase dos respectivos receptores, resultando na autofosforilação nos seus resíduos tirosina. Estes resíduos de fosfotirosina são locais que servem para o aporte dos substratos que tem homologia Src 2 – domínios SH2. Domínios SH-2 são seqüências de aproximadamente 100 aminoácidos que têm a capacidade de se ligar a proteínas fosforiladas em sítios de tirosina.

Os primeiros substratos que se ligam a ambos os receptores, IR e IGF-IR, são os substratos do receptor de Insulina (IRS1-4), Shc e GAB-1 (Nystrom & Quon, 1999; Myers e cols., 1993). O local da ligação dos IRSs e do Shc são os domínios justa-membrana, via uma fosfotirosina formada por Asn-Pro-Glu-Tyr. Esta interação permite às quinases dos receptores fosforilarem estas proteínas em resíduos tirosina, os quais servirão como locais de ancoragem para outras proteínas, como a fosfatidil-inositol-3-quinase e Grb2. Estas transmitem o sinal adiante através da SOS, RAS e ativação da proteína quinase c-raf, que finalmente ativa a cascata MAP-

quinase (*mitogen activated protein kinase*) (Dupont & Le Roith, 2001; Capp e cols., 1998).

6 IGF- I E MIOMA

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 e cols., 1982). Isto provavelmente se deva à diminuição do metabolismo do estradiol a estrona, causado por uma menor quantidade de 17α -hidroxi-desidrogenase nestes tumores do que no miométrio (Otubu e cols., 1982). Além disto, a concentração de receptores de estradiol é maior em miomas do que em miométrio (Rein e cols., 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, particularmente, tem sido apontado como mediador do estradiol em úteros de ratos e humanos (Chandrasekhar e cols. 1992).

Ghahary e Murphy demonstraram que o estrogênio parece regular o receptor de IGF-I em útero de ratos imaturos, assim como as alterações cíclicas o fazem nos ratos maduros. Isto sugere que o estrogênio exerça um papel regulador deste receptor *in vivo* (Ghahary & Murphy, 1989). Estudo semelhante em miométrio e miomas humanos mostrou que o estradiol eleva os níveis de IGF-I mRNA (Boehm e cols., 1990).

Segundo Englund e colaboradores os níveis de IGF-I mRNA nos miomas de gestantes são superiores aos encontrados no miométrio das mesmas, bem como em relação aos níveis de IGF-I mRNA nos miomas das mulheres não grávidas. Assim, altos níveis de hormônios esteróides parecem estar associados com a expressão aumentada de IGF-I nos miomas em relação ao miométrio, sugerindo que o IGF-I contribua para o crescimento destes tumores (Englund e cols.,2000).

O mecanismo pelo qual o receptor de IGF-I 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 modulem a proliferação celular e conseqüentemente a formação e/ou o crescimento dos tumores (Blaskeley e cols., 1997). A expressão aumentada de receptores de IGF-I funcionais é suficiente não somente para aumentar a proliferação celular, mas também a sua transformação (Blaskeley e cols., 1997). Este potencial de crescimento tumoral não é conferido a células com expressão aumentada de receptores de IGF-I deficientes, nos quais específicos aminoácidos sofreram mutações. Além disto, partes específicas do C-terminal do IGF-I têm se mostrado essenciais na mediação do sinal de transformação. Desta forma, é especulado como terapêutica futura uma alteração específica do receptor de IGF-I na transdução do sinal como agente antitumoral efetivo (Blaskeley e cols., 1997).

Estudos recentes têm mostrado que o leiomioma mostra uma resposta proliferativa aumentada ao IGF-I *in vitro*, comparado ao miométrio normal. Esta resposta é atribuída ao fato de o leiomioma expressar níveis mais elevados do

receptor de IGF-I (Strawn e cols., 1995). Isto sugere que os IGFs possam exercer um importante papel no crescimento e na transformação destes tumores (Van der Ven e cols., 1997).

A expressão do gene de IGF-I 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 e cols., 1993). Ao contrário, a expressão do receptor de IGF-I não parece ser regulada pelo estrogênio e está aumentada nos miomas, em relação ao miométrio adjacente (Giudice e cols., 1993; Tommola e cols., 1989). Os agonistas do GnRH podem agir através da diminuição dos níveis de estradiol e, assim, alterar a produção de IGF-I no local, sem mudar os níveis de receptores. Os níveis plasmáticos de GH e IGF-I 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 e Nieman demonstraram que a expressão do mRNA do receptor do GH foi similar em ambos, miomas e miométrio, não sendo alterada pelo tratamento com agonistas do GnRH, sugerindo que o receptor de GH não seja regulado pelo estrogênio (Sharara & Nieman, 1995).

A secreção de IGF-I 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 e cols., 1990). O mesmo acontece em relação à secreção de IGF-I e IGF-II em 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 associada à administração crônica de agonista do GnRH poderia ser regulada, em parte, pela diminuição da concentração local de IGF-I e IGF-II (Rein e cols., 1990).

Estudo de Friedman e colaboradores mostrou que a administração exógena de progesterona com análogos do GnRH resultou na redução significativamente menor do volume dos miomas, quando comparada ao tratamento com análogos mais placebo. Isto sugere que a progesterona também possa exercer efeito na promoção do crescimento dos miomas (Friedman e cols., 1988). Outro estudo destes autores também demonstrou que o uso de acetato de leuprolide leva a uma diminuição significativa dos níveis circulantes de GH e IGF-I, quando comparado ao placebo, sugerindo que estas alterações estejam relacionados ao hipoestrogenismo (Friedman e cols., 1990).

A afinidade dos receptores de IGF-I aumentada tem sido identificada nas membranas uterinas usando-se o método de Scatchard com material radioativo (Chandrasekhar e cols., 1992). Estudos mostraram um maior número de sítios de ligação específicos para o IGF-I no mioma, em relação ao miométrio adjacente, sugerindo que o IGF-I aja no músculo liso do miométrio como um fator de crescimento autócrino e parácrino (Tommola e cols., 1989; Chandrasekhar e cols., 1992).

O número de sítios de ligação específicos para o IGF-I no miométrio de mulheres com e sem miomas não difere (Chandrasekhar e cols., 1992).

Estudos *in vitro* usando cultura de células miometriais e reação de polimerase em cadeia com transcriptase reversa têm confirmado que o IGF-I 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*) (Chegini e cols., 1986; Tommola e cols., 1989; Fayed e cols., 1989; Rein e cols., 1990; HarrisonWoolrych e cols., 1994; Strawn e cols., 1995;Vollenhoven e cols., 1995).

Tanto o miométrio normal quanto o leiomioma expressam mRNAs para o IGF-I e o IGF-II. Outros estudos sugerem que os níveis de mRNA para o IGF-I são similares em ambos os tecidos, no entanto, estão suprimidos no leiomiossarcoma, tumor maligno (Gludemans e cols, 1990). Ao contrário, os níveis de mRNA para o IGF-II são consistentemente mais elevados em leiomiossarcomas do que no tecido miometrial normal. (Gludemans e cols., 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 IGF-I é suprimido com o aumento da malignidade poderia indicar que a expressão do IGF-I se desse no tecido conectivo do miométrio ao invés das células de músculo liso. Entretanto, estudos imunohistoquímicos mostram que o IGF-I se apresenta exclusivamente nas células do músculo liso e não no tecido conectivo (Gludemans e cols., 1990).

Há dois estudos que relatam que os níveis de expressão de mRNA do IGF-I e de sua proteína são semelhantes entre miomas e miométrios (Vollenhoven e cols., 1993; Gludemans e cols., 1990), enquanto outros mostram que a expressão do

mRNA do IGF-I e de sua proteína estão significativamente aumentadas nos miomas em relação ao miométrio correspondente (Englund e cols., 2000; Boehm, e cols., 1990). Este mesmo estudo de Vollenhoven que mostrou semelhantes níveis de expressão de IGF-I entre mioma e miométrio, mostrou que a expressão do mRNA da IGFBP-3 estava aumentada em duas vezes no miométrio em relação ao mioma (Vollenhoven e cols., 1993).

Burroughs e colaboradores estudaram o papel da transdução do IGF-I no crescimento dos miomas em um modelo animal (ratas Eker) com os seguintes achados: a expressão do mRNA do IGF-I está aumentada 7,5 vezes em relação ao miométrio, enquanto os níveis de mRNA do IGF-IR em ambos está inversamente relacionado aos níveis de IGF-I, concluindo que o estímulo autócrino para o IGF-IR poderia exercer um papel regulador no crescimento normal do miométrio e que uma alteração neste papel poderia levar ao surgimento dos miomas (Burroughs e cols., 2002).

Estudos recentes chamam a atenção para a função dos proto-oncogenes na proliferação ou inibição celular (Wallis & Macdonald, 1999). O Bcl-2 é uma proteína inibidora da apoptose que poderia estar aumentada nos miomas. Gao e colaboradores sugerem que o IGF-I tem um papel crucial no crescimento celular dos miomas, não só promovendo a proliferação, mas também por impedir a apoptose através da regulação do Bcl-2 nas células miomatosas (Gao e cols., 2001).

A fim de possibilitar novas estratégias não invasivas no tratamento de miomas, tornam-se essenciais maiores conhecimentos a respeito dos mecanismos que envolvem a regulação do crescimento dos miomas.

OBJETIVOS

Determinar a expressão do receptor de IGF I (*Insulin-like Growth-Factor – I*) em tecidos de miomas e miométrio humanos.

Determinar a atividade do receptor de IGF-I em miomas e miométrios humanos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sharara FI, Nieman LK. Growth hormone messenger ribonucleic acid expression in leiomyoma and surrounding myometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173(3):814-19.
2. Nowak RA. Effects of growth factors on leiomiomas. In: Osteen K and Diamond M. (Eds) *Endometrium and Endometriosis*. Malden, MA: Blackwell Science 1997;301-310.
3. Cramer SF, Patel A. The frequency of uterine leiomyomas. *Am J Clin Pathol* 1990;94:435-38.
4. Stewart EA, Friedman AJ. Steroidal treatment of myomas: preoperative and long-term medical therapy. *Semin Reprod Endocrinol* 1992;10:344-357.
5. Schwartz SM. Epidemiology of uterine leiomyomata. *Clin Obstet Gynecol* 2001; 44(2) 316-26.
6. Stewart EA. Uterine fibroids. *Lancet* 2001;357:293-8.
7. Otubu JA, Buttram VC, Besch NF, et al. Unconjugated steroids in leiomyomas and tumor-bearing myometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1982;143:130-133.

8. Giudice LC, Irwin JC, Dsupin BA, et al. Insulin-like growth factor (IGF), IGF binding protein (IGFBP), and IGF receptor gene expression and IGFBP synthesis in human uterine leiomyomata. *Hum Reprod* 1993;8:1796-1806.
9. Dawood MY, Dawood FSK. Plasma insulin-like growth factor-I, CA-125, estrogen and progesterone in women with leiomyomas. *Fertil Steril* 1994;61(4): 617-21.
10. Strawn EY, Novy MJ, Burry KA, Bethea CL. Insulin-like growth factor I promotes leiomyoma cell growth in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172(6):1837-44.
11. De Leo V, La Marca A, Morgante G, Severi FM, Petraglia F. Administration of somatostatin analogue reduces uterine and myoma volume in women with uterine leiomyomata. *Fertil Steril* 2001;75:632-3.
12. Maruo T, Matsuo H, Samoto T, Shimomura Y, Kurachi O, Gao Z, et al. Effects of progesterone on uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Steroids* 2001;65:585-92.
13. Christman GM, McCarthy JD. Gene therapy and uterine leiomyomas. *Clin Obstet Gynecol* 2001;44(2): 425-435.
14. Guarnaccia MM, Rein M. Traditional surgical approaches to uterine fibroids: abdominal myomectomy and hysterectomy. *Clin Obstet Gynecol* 2001;44(2): 385-399.
15. Kellerer M, Corleta HvE, Mühlhofer A, et al. Insulin and insulin like growth factor-I receptor tyrosine kinase activities in human renal carcinoma. *Int J Cancer* 1995;62:501-507.

16. Corleta HvE, Capp E, Corleta OC. Insulin receptor tyrosine kinase activity in colon carcinoma. *Braz J Med Biol Res* 1996;29:1593-7.
17. Yoshimoto H, Ishihara H, Ohtsuru A, et al. Overexpression of insulin-like growth factor-1 (IGF-I) receptor and the invasiveness of cultured keloid fibroblasts. *Am J Pathol* 1999;54(3):883-889.
18. Nowak RA. Identification of new therapies for leiomyomas: what in vitro studies can tell us. *Clin. Obstet. Gynecol* 2001;44(2) 327-334.
19. Benda JA. Pathology of smooth muscle tumors of the uterine corpus. *Clin Obstet Gynecol* 2001;44(2): 350-363.
20. Vollenhoven BJ, Lawrence AS, Healy DL. Uterine fibroids: a clinical review. *Br J Obstet Gynecol* 1990 Apr;97:285-98.
21. Stovall DW. Clinical symptomatology of uterine leiomyomas. *Clin Obstet Gynecol* 2001;44(2): 364-384.
22. Baird DD, Schectman JM, Dixon D, et al. African Americans at higher risk than whites for uterine fibroids: ultrasound evidence (abstract). *Am J Epidemiol* 1998;147(11):S90.
23. Marshall LM, Spiegelman D, Barbieri RL, et al. Variation in the incidence of uterine leiomyoma among premenopausal women by age and race. *Obstet Gynecol* 1997;90:967-73.

24. Marshall LM, Spiegelman D, Goldman MB et al. A prospective study of reproductive factors and oral contraceptive use in relation to the risk of uterine leiomyoma. *Fertil Steril* 1998;70(3):432-439.
25. Faerstein E, Szklo M, Rosenshein NB. Risk factors for uterine leiomyoma: a practice-based case-control study. I. African-American heritage, reproductive history, body size and smoking. *Am J Epidemiol* 2001;153: 1-10.
26. Townsend DE, Sparkes RS, Beludo MC, et al. Unicellular histogenesis of uterine leiomyomas as determined by eletrophoresis of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Am J Obstet Gynecol* 1970;170:1168.
27. Brosens I, Deprest J, Dal Cin P, et al. Clinical significance of cytogenetic abnormalities in uterine myomas. *Fertil Steril* 1998;69:232-235.
28. Gross KL, Morton CC. Genetics and the development of fibroids. *Clin Obstet Gynecol* 2001;44(2):335-349.
29. Tommola P, Pekonen F, Rutanen EM. Binding of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I in human myometrium and leiomyoma. *Obstet Gynecol* 1989;74(4):658-62.
30. Fayed YM, Tsibris JC, Langenberg PW, Robertson AL. Human uterine leiomyoma cells: binding and growth responses to epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin. *Lab Invest* 1989;60:30-7.
31. Rein MS, Friedman AJ, Pandian MR, et al. The secretion of insulin-like growth factors I and II by explant cultures of fibroids and myometrium from women

- treated with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Obstet Gynecol* 1990;76:388-93.
32. Nagamani M, Stuart CA. Specific binding sites for insulin in the human myometrium and leiomyomas of the uterus. *Fertil Steril* 1992;58(1):120-3.
33. Harrison-Woolrych ML, Charnock-Jones DS, Smith SK. Quantification of messenger ribonucleic acid for epidermal growth factor in human myometrium and leiomyomata using reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:1179-84.
34. Vollenhoven BJ, Herington AC, Healy DL. Epidermal growth factor and transforming growth factor- α in uterine fibroids and myometrium. *Gynecol Obstet Invest* 1995;40:120-4.
35. Parker WH, FuY S, Berek JS. Uterine sarcoma in-patients operated on for presumed leiomyoma and rapidly growing leiomyoma. *Obstet Gynecol* 1994;83:414-418.
36. Anderson TF, Looft A, Bronnum-Hansen H, et al., Complications after Hysterectomy. A Danish population-based study 1978-1983. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1993;72:570-577.
37. Coutinho EM, Gonçalves MT. Long-term treatment of leiomyomas with gestrinone. *Fertil Steril* 1989;51:939-46.

38. Murphy AA, Kettel LM, Morales AJ, Roberts VJ, Yen SS. Regression of uterine leiomyomata in response to the antiprogesterone RU 486. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:513-17.
39. Palomba S, Affinito P, Tommaselli GA, Nappi C. A clinical trial of effects of tibolone administered with gonadotropin-releasing hormone analogues for the treatment of uterine leiomyomata. *Fertil Steril* 1998;70:111-18.
40. Goodwin SC, Wong GCH. Uterine artery embolization for uterine fibroids: a radiologist's perspective. *Clin Obstet Gynecol* 2001; 44(2): 412-24.
41. Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S. Insulin-like Growth Factor-Binding Proteins in Serum and Other Biological Fluids: Regulation and Functions. *Endocrine* 1997;18(6):801-31.
42. Daughaday WH, Rotwein P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocr Rev* 1989;10(1):68-91.
43. Chandrasekhar Y, Heiner J, Osuamkpe MS, Nagamani M. Insulin-like growth factor I and II binding in human myometrium and leiomyomas. *Am J Obstet Gynecol* 1992 Jan;166(1):64-9.
44. LeRoith, D. Insulin-like growth Factors. *N Engl J Med* 1997 Feb 27;336(9):633-40.
45. Wang HS, Chard T. IGFs and IGF-binding proteins in the regulation of human ovarian and endometrial function. *J Endocrinol* 1999;161:1-13.

46. Hasegawa Y, Hasegawa T, Takada M, et al. Plasma free insulin-like growth factor I concentrations in growth hormone deficiency in children and adolescents. *Eur J Endocrinol* 1996;134:184-9.
47. Gludemans T, Prinsen I, Unnik JAMV, et al. Insulin-like Growth Factor Gene Expression in Human Smooth Muscle Tumors. *Cancer Res* 1990;50:6689-95.
48. Howe SR, Pass HI, Ethier SP et al. Presence of insulin-like growth factor I autocrine loop predicts uterine fibroid responsiveness to tamoxifen. *Cancer Res* 1996 Sep 1;56:4049-55.
49. Murphy LJ. Insulin-like growth factor-binding proteins: functional diversity or redundancy? *J. Mol. Endocrinol* 1998;21:97-107.
50. Van der Ven LTM, Van Buul-Offers SC, Gludemans T, et al. Modulation of insulin-like growth factor (IGF) action by IGF-binding proteins in normal, benign and malignant smooth muscle tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(10):3629-35.
51. Wang HS, Wang TH, Soong YK. Elevation of insulin-like growth factor-binding protein-1 mRNA expression following hormone replacement therapy. *Hum Reprod* 2000;15(1):50-4.
52. Seedorf K. Intracellular signaling by growth factors. *Metabolism* 1995;44:24-32.
53. Capp E, Brandelli A, Monego H, Ribeiro MF, Freitas MS, Pureur R, Tortorella H, Corleta H. Binding and tyrosine kinase activity of insulin receptor in human normal and neoplastic endometrium. *Med Scien Res* 1996;24:621-23.

54. Nystrom FH, Quon MJ. Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity. *Cell. Signal* 1999;11(8):563-74.
55. White MF, Kahn CR. The insulin signaling system. *J Biol Chem* 1994 Jan 7;269(1):1-4.
56. Bossemeyer D. Protein kinases – structure and function. *FEBS Letters* 1995;369,57-61.
57. Accili D. Receptor Tyrosine Kinase. In: *Introduction to Molecular & Cellular Research* 2001 Sep; Miami, Endocrine Society, 57-71.
58. Belfiore A, Pandini G, Vella V, et al. Insulin/IGF-I hybrid receptors play a major role in IGF-I signaling in thyroid cancer. *Biochem* 1999;81:403-7.
59. Häring H, Obermaier-Kusser B. The insulin receptor: Its role in insulin action and in the pathogenesis of insulin resistance. *Diabetes Annual* 1990;5:537-66.
60. Dupont J, LeRoith D. Insulin and Insulin-like growth factor I receptors: similarities and differences in signal transduction. *Horm Res* 2001;55(supl): 22-26.
61. Najjar SM, Blaskeley VA, Calzi SL et al. Differential phosphorylation of pp120 by Insulin and Insulin-like growth factor-I receptors: role for the C-terminal domain of the β -subunit. *Biochem* 1997;36:6827-34.
62. Capp E, Corleta HvE. Transdução do sinal de insulina e Diabetes mellitus tipo II. *Pesq. Med* 1998;32(1):24-31.

63. Myers Jr MC, Sun XJ, Cheatham B, et al. IRS-1 is a common element in insulin and insulin-like growth factor-I signaling to the phosphatidylinositol. *Endocrinology* 1993;132(4):1421-30.
64. Ghahary A, Murphy LJ. Uterine insulin-like growth factor – I receptors: regulation by estrogen and variation throughout the estrous cycle. *Endocrin* 1989;125(2):597-604.
65. Boehm KD, Daimon M, Gorodeski IG, et al. Expression of the Insulin-like and platelet-derived growth factor genes in human uterine tissues. *Mol Reprod Develop* 1990;27:93-101.
66. Blakesley VA, Stannard BS, Kalebic T. Role of IGF I receptor in mutagenesis and tumor promotion. *J Endocrinol* 1997;152:339-44.
67. Englund K, Lindblom B, Cariström K, et al. Gene expression and tissue concentrations of IGF-I in human myometrium and fibroids under different hormonal conditions. *Mol Hum Reprod* 2000;6(10):915-20.
68. Van der Ven LTM, Roholl PJM, Gloudemans T, et al. Expression of Insulin-like Growth Factors (IGFs), their receptors and IGF binding protein –3 in normal, benign and malignant smooth muscle tissues. *Br J Cancer* 1997;75(11):1631-40.
69. Friedman AJ, Barbieri RL, Doubilet PM, et al. A randomized, doubled-blind trial of a gonadotropin releasing-hormone agonist (leuprolide) with ou without medroxyprogesterone acetate in the treatment of leiomyomata uteri. *Fertil Steril* 1988;49(3):404-9.

70. Friedman AJ, Rein MS, Pandian Mr, et al. Fasting serum growth hormone and insulin-like growth factor I and II concentrations in women with leiomyomata uteri treated with leuprolide acetate or placebo. *Fertil Steril* 1990;53(2):250-3.
71. Chegini N, Rao ChV, Wakin N, et al. Binding of ¹²⁵I-epidermal growth factor in human uterus. *Cell Tissue Res* 1986;246:543-8.
72. Vollenhoven BJ, Herington AC, Healy DL. Messenger ribonucleic acid expression of the Insulin-Like growth factors and their binding proteins in uterine fibroids and myometrium. *J Clin Endocrinol and Metabol* 1993;76(5):1106-10.
73. Burroughs KD, Howe SR, Okubo Y, et al. Dysregulation of IGF-I signaling in uterine leiomyoma. *J Endocrinol* 2002 Jan;172(1):83-93.
74. Wallis YL, Macdonald F. Demystified...Oncogenes. *Br Med J* 1999;52(2):55-63.
75. Gao Z, Matsuo H, Wang Y, et al. Up regulation by IGF-I of proliferating cell nuclear antigen and Bcl-2 protein expression in human uterine leiomyoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(11):5593-99.

ARTIGO EM PORTUGUÊS

Expressão de mRNA e autofosforilação do receptor de IGF-I (Insulin-like Growth Factor I) em miométrio e mioma humanos

Chaves, Eunice Beatriz Martin +

Silva, Ilma Simoni Brum da MSc, PhD*

Corleta, Helena von Eye MD, PhD‡§

Capp, Edison MD, PhD*‡§

+ Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Mestranda do Curso de Pós-graduação em Clínica Médica – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

* Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

‡ Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

§Clínica Gerar de Fertilização Assistida, Porto Alegre, Brasil

Correspondência para:

Eunice Beatriz Martin Chaves
Rua Francisco Ferrer, 133/202
90 420 140 – Porto Alegre, RS - Brasil
e-mail: glchaves@cpovo.net
Fax: 055 51 33300491
Apoio: FIPE/HCPA.

ABSTRACT

Objective: to determine the insulin-like growth factor I receptor (IR) mRNA levels and IGF-IR tyrosine kinase activity in normal myometrium and leiomyoma.

Design: Experimental study.

Setting: Academic research center

Patients: fourteen women with leiomyoma submitted to hysterectomy.

Intervention: plasma membrane fraction of myometrium and leiomyoma from five patients were prepared and samples were incubated with and without IGF-I recombinant. In second experiment mRNA was isolated and RT-PCR with specific primers was performed with material from eleven patients.

Main outcome measure: Western blots of plasma membranes incubated with and without IGF-I recombinant were performed. Chemoluminescent methods followed by densitometry were used to assess the tyrosine kinase activity of IGF-IR by autophosphorylation. RT-PCR with specific primers for IGF-I gene sequences was used to determine IGF-IR mRNA levels.

Results: IGF-I mRNA levels in myometrium (0.8216 ± 0.096) and in leiomyoma (0.7905 ± 0.136) ($p=0.648$) were not different. The degree of IGF-I recombinant stimulated IGF-IR autophosphorylation (relative optical density of the 95 kDa band) was also not different between myometrium ($1,020 \pm 0,120$) and leiomyoma ($1,620 \pm 0,656$) ($p=0,075$).

Conclusion: There was no difference in IGF-I receptor expression and IGF-I autophosphorylation between normal myometrium and leiomyoma. Other steps of IGF-I signaling chain may participate in the altered proliferation of leiomyomas.

Key Words: leiomyoma, myometrium, IGF-I receptor, tyrosine kinase.

Resumo

Objetivo: determinar os níveis mRNA do receptor de IGF-I (insulin-like growth factor I receptor) e a sua atividade tirosina quinase em miométrio e mioma humano.

Delineamento: Estudo experimental.

Amostra : catorze mulheres submetidas a histerectomia por miomatose.

Intervenção: parte da membrana plasmática dos miométrios e miomas foram preparadas e posteriormente incubadas com ou sem IGF-I recombinante. A seguir foram realizados Western-blots e as bandas imuno-marcadas foram visualizadas através de autoradiograma após a adição de um reagente quimoluminescente. A atividade tirosina quinase foi quantificada por densitometria. No segundo experimento, o mRNA foi isolado sendo realizado RT-PCR com *primers* específicos para a seqüência dos genes do IGF-IR, sendo determinado seus níveis.

Resultados: Os níveis de mRNA para o IGF-IR no miométrio (0.8216 ± 0.096) e no mioma (0.7905 ± 0.136) ($p=0.648$) não foram significativamente diferentes. A autofosforilação do IGF-IR após a estimulação com IGF-I recombinante na banda de 95 kDa (correspondente a subunidade β do receptor) também não apresentou diferença estatisticamente significativa entre miométrio ($1,020 \pm 0,120$) e mioma ($1,620 \pm 0,656$) ($p=0,075$).

INTRODUÇÃO

Os miomas uterinos são os tumores mais comuns do trato genital feminino atingindo cerca de 20 a 30% das mulheres em idade reprodutiva (1, 2). Seus sintomas mais comuns são desconforto pélvico, sangramento uterino anormal, aborto espontâneo, constipação e aumento da frequência urinária (3, 4). Os miomas representam a indicação mais comum das histerectomias (3). Embora os miomas representem um importante problema de saúde pública, os mecanismos responsáveis pelo seu aparecimento são pouco entendidos. Sabe-se que os hormônios esteróides podem estar relacionados com o seu aparecimento, uma vez que eles aparecem durante os anos férteis, aumentam durante a gestação e estabilizam ou até mesmo regredem após a menopausa (1, 2, 3, 5, 6, 7). Isto sugere que o estrogênio possa estar envolvido na sua patogênese e crescimento. Concentrações mais altas dos receptores de estrogênio já foram observadas em miomas em relação ao miométrio adjacente. O IGF-I poderia estar relacionado com a transdução do sinal de estrogênio resultando num sinergismo que leve ao estímulo do crescimento (2, 8).

Fatores de crescimento como o EGF (*Epidermal Growth Factor*), o derivado de plaquetas, a insulina e o IGF-I parecem estar relacionados com o desenvolvimento de miomas (2, 9, 10, 11, 21).

Os receptores de IGF I são glicoproteínas heterotetraméricas, com duas subunidades alfa (135 kD) e duas subunidades beta (90-105 kD). 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 tirosina quinase intrínseca deste receptor se localiza na parte citoplasmática da subunidade β . Esta parte revela-se muito semelhante, aproximadamente 80%, com o receptor de insulina. A ligação do IGF-I à subunidade α do receptor desencadeia a atividade tirosina quinase através da fosforilação de proteínas celulares nos resíduos tirosina, transmitindo o sinal do IGF-I para o sistema metabólico da célula alvo (10, 12, 13, 14, 15, 16).

O receptor de IGF-I existe em pelo menos 2 isoformas, caracterizadas pela subunidade β migrando entre 95 e 105 kDa no gel de eletroforese (SDS-PAGE). As conseqüências funcionais desta diferença ainda não foram identificadas (14).

O IGF-I é produzido no fígado e numa variedade de tecidos. Os IGF-I são polipeptídeos com ações autócrinas e parácrinas de crescimento semelhantes às da insulina, sendo que as funções do IGF-I são moduladas pelas suas proteínas de ligação, as IGFBPs, das quais 6 variantes já foram identificadas. Elas podem facilitar ou inibir a ligação do IGF-I com seus receptores (7, 17, 18).

O IGF-I tem efeito na promoção do crescimento através da estimulação da síntese de RNA e DNA (15). O IGF-I tem sido envolvido no crescimento de vários tumores tais como: câncer de mama, carcinoma de cólon, lipossarcoma, carcinoma medular da tireóide de rato, tumor de Wilms, neuroblastoma e outros. Estas observações indicam que os IGFs podem ter um papel importante na tumorigênese (19, 20).

O estudo de Gloudemans e cols. mostrou que os níveis de expressão do mRNA para o IGF-I em miométrio e mioma são similares em ambos tecidos mas estavam suprimidos no leiomiossarcoma (19).

Outro estudo mostrou que a expressão do gene de IGF-I estava aumentada no leiomioma obtido durante a fase proliferativa do ciclo menstrual e era indetectável em pacientes com hipoestrogenismo (7). Estes autores também relataram que o mRNA para os receptores de IGF-I e IGF-II era detectado em leiomiomas independente da fase do ciclo menstrual ou dos níveis de estrogênio (7).

Chandrasekhar e cols. mostraram que as ligações do IGF-I as membranas derivadas do miométrio de mulheres com ou sem miomas não são significativamente diferentes (8). Eles demonstraram que ambos miométrio e miomas têm alta afinidade ao IGF-I, mas que o número de sítios de ligação específicos para o IGF-I em miomas eram significativamente maior que o número de sítios no miométrio.

Considerando o acima exposto nos avaliamos os níveis de mRNA e a atividade de autofosforilação do receptor de IGF-I em miomas e miométrios humanos, a fim de determinar se há diferença na expressão do gene do receptor do IGF-I e sua atividade tirosina quinase entre miomas e miométrios humanos.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes

As amostras foram obtidas de 14 pacientes hysterectomizadas por indicação de seus médicos assistentes, independente do protocolo desta pesquisa.

Pacientes diabéticas, em uso de anticoncepcionais orais ou terapia de reposição hormonal não foram incluídas neste estudo. Os miomas menores de 1cm ou maiores de 5 cm não foram utilizados. As amostras de miomas eram obtidas do centro dos miomas a fim de evitar contaminação com o miométrio adjacente. A fase do ciclo foi histologicamente comprovada. Os miomas e miométrios foram congelados imediatamente em nitrogênio líquido e armazenados a - 70°C. Este estudo foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Preparação da Membrana Plasmática

Os tecidos, normal e tumor, foram homogeneizados num ultra-turrax por 45-60 segundos a 4°C, na presença de um inibidor de protease PMSF (1mM), Tris (40mM), EDTA (1mM), sacarose (250mM), pH 7,4. O homogeneizado foi centrifugado a 3.000g por 5 min a 4°C para separar as membranas de mitocôndrias, restos celulares e núcleo. O sobrenadante foi centrifugado a 30.000g por 20 min a 4°C. O *pellet* resultante foi ressuscitado com um homogeneizador tipo Dounce em Hapes (25mM) e PMSF (1mM). A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (22). Esta suspensão com uma concentração de proteínas de cerca de 10mg/ml foi mantida a -70°C até o uso.

Fosforilação do Receptor

Vinte µg de proteínas foram incubadas com IGF-I recombinante (100µM) ou albumina sérica bovina (BSA) (10µM) na presença de vanadato dissódico (10mM) e $MnCl_2$ (200mM) por 30min a 22°C. Após a incubação com ATP (430µM) a 22°C por 10min, a reação foi interrompida pela adição da solução de Laemmli. Após as amostras foram aquecidas por 10min a 95°C.

Western blotting

As amostras foram separadas em um SDS-PAGE a 7,5% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi lavada com uma solução tampão (NET), contendo NaCl (150mM), EDTA (5mM), TRIS (50mM), Triton X-100 (0,025%) e gelatina (0,25%), pH 7,4 e incubadas com o anticorpo monoclonal anti-fosfotirosina específicos (Upstate Biotechnology, PY 20), e após com anti-mouse IgG conjugado (Bio-Rad Laboratories). As bandas foram detectadas por Western Blotting (chemoluminescence reaction; ECL, Amersham), com filme (Kodak X-Omat) exposto por 15 a 60 sec. A densidade óptica da banda (OD) foi obtida por quimoluminescência e analisada por um densitômetro, utilizando um sistema processador de imagens. (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

Extração do RNA e Síntese do cDNA

A extração do RNA e a síntese do cDNA foram realizadas como previamente descrito (23). Amostras de miométrio e mioma foram homogeneizadas com fenol-guanidina isocianato (Trizol, Gibco BRL, Gaithersburg, MD). O RNA total foi extraído com clorofórmio e precipitado com isopropanol por centrifugação a 12.000 g a 4°C. O *pellet* do RNA foi lavado duas vezes com etanol e ressuspenso em dietilpirocabonato tratado com água e quantificado por luz de absorvância a 260 nm. O primeiro molde de cDNA foi sintetizado a partir de 2 µg do total de RNA, usando o Sistema de Pré-amplificação SuperScript (Gibco BRL, Gaithersburg, MD).

Transcriptase Reversa e Reação de Polimerase em Cadeia (RT-PCR)

RT-PCR foi realizada com um volume final de 50 µl. Dois µl da primeira reação de síntese da fita (com aproximadamente 4 ng de cDNA) foi desnaturado a 94°C por 1 min em presença de 20 mM Tris-HCl pH 8.4 , 50 mM KCl e 1.5 mM MgCl₂. Depois do aquecimento inicial, adicionou-se 1.25 U de Taq DNA polymerase a mesma solução tampão Tris-HCl , 1.5 mM MgCl₂, 0.4 µM de *primers sense* e *antisense* e 0.2 mM dNTP mix. Um fragmento de 350 pb da seqüência do cDNA do receptor de IGF-I (24) foi amplificado utilizando-se *primers* específicos para determinar os limites intron-exon a serem complementados, a fim de evitar a amplificação de qualquer DNA genômico contaminante. Também foi realizada a amplificação de um fragmento de 623 pb do cDNA da β₂-microglobulina (23) a fim de ajustar a quantidade de cDNA em cada amostra. A seqüência dos *primers* e o tamanho do fragmento de cDNA estão listados na tabela 2. As condições da reação da polimerase em cadeia foram 40 ciclos (figura 1) de desnaturação a 94°C, por 1

min; *annealing* a 62°C por 1 min; extensão a 72°C por 1 min. O molde decorrente da primeira reação sem a transcriptase reversa também foi amplificado para servir como controle negativo. Uma amostra da mistura do PCR (15 µl) foi fracionada num gel de agarose a 1,5 % corado com brometo de etídio, e corrida a 120 V e visualizada sob luz UV. As bandas esperadas foram quantificadas por análise densitométrica utilizando-se um sistema processador de imagem (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

Análise Estatística

Os resultados dos níveis de mRNA para o IGF-IR foram analisados em relação a β_2 -microglobulina. O grau de autofosforilação tirosina quinase nos miomas e miométrio foram calculados pela diferença das bandas na densidade óptica de 95 kDa com e sem o estímulo do IGF-I recombinante. Os resultados foram comparados pelo teste T de Student, sendo considerado estatisticamente significativo, $p < 0.05$.

RESULTADOS

A tabela 1 mostra os dados clínicos das pacientes cujos úteros foram estudados. Para os experimentos de RT-PCR, material de 11 pacientes foram preparados e analisados. Para os experimentos de autofosforilação do receptor de IGF-I, membranas de cinco pacientes preparadas, estimuladas e separadas em SDS-PAGE e os autoradiogramas foram analisados por densitometria.

Para a análise da expressão do gene do receptor de IGF-I no miométrio e no mioma, determinamos o mRNA do IGF-IR em ambos os tecidos por RT-PCR. A eletroforese dos produtos da RT-PCR são mostrados na figura 2 evidenciando-se aproximadamente a mesma quantidade de IGF-IR em mioma e miométrio (níveis de mRNA IGF-IR em miométrios (0.8216 ± 0.096) e em miomas (0.7905 ± 0.136) ($p = 0,648$).

Após a incubação das membranas plasmáticas com e sem o IGF-I recombinante, a banda correspondente à subunidade β do receptor de IGF-I, com 95 kDa pode ser identificada no miométrio e no leiomioma. A autofosforilação da subunidade β do IGF-IR foi similar entre o miométrio ($1,020 \pm 0,120$) e o mioma ($1,620 \pm 0,656$) ($p = 0,075$). (figura 2).

DISCUSSÃO

Nosso estudo demonstrou que a expressão mRNA do IGF-IR e sua autofosforilação são semelhantes no miométrio e mioma humanos. A ligação do IGF-I ao miométrio e mioma humanos já havia sido demonstrada em estudos prévios (8). A existência de uma maior afinidade do IGF-I ao respectivo receptor nos miomas sugere que o IGF-I possa ter um papel na patogênese destes tumores (8). Também foi observado que não há uma correlação entre a ligação do IGF-I e o tamanho dos miomas (8). Embora não tenhamos observado diferenças significativas na expressão gênica do IGF-IR e sua atividade, entre miomas e miométrios, acreditamos que

outras etapas da transdução do sinal de IGF-I podem estar envolvidas na etiologia dos miomas.

Embora os IGFs sejam designados como proto-oncogenes, há inúmeras evidências do seus efeitos em induzir a transformação celular. Uma expressão aumentada dos IGFs e seus receptores já foi observada em muitos tumores humanos (25, 26).

Van der Ven e cols. demonstraram que maiores concentrações de IGF-I nos miomas do que nos miométrios poderiam ser resultado de um maior nível de receptores de IGF-I nos miomas (27). No entanto, a transformação maligna no músculo liso está associada com uma diminuição da expressão do IGF-I e aumento da expressão do IGF-II (19).

Em um modelo animal foi demonstrado que a expressão do IGF-I estava aumentada 7,5 vezes comparada com o tecido normal de ratas da mesma idade, porém o nível do mRNA do IGF-IR em ambos, tumor e tecido normal se correlacionava inversamente com os níveis de IGF-I (28).

É sabido que o IGF-I e a insulina, assim como outros receptores tirosina quinase, compartilham várias etapas na transdução do seus sinais (29). Desta forma, a ação conjunta com outros fatores peptídicos poderia explicar como o IGF-I estaria envolvido no crescimento dos miomas (30). A formação de receptores híbridos IGF-I/insulina nos miomas permanece como algo que necessita ser elucidado (29).

Nossos dados sugerem que a expressão do mRNA do receptor de IGF-I e sua atividade tirosina quinase sejam semelhantes em miomas e miométrios. Novos experimentos são necessários para se elucidar o papel da transdução do sinal de IGF-I através do seu receptor no surgimento dos miomas. Outras etapas deverão ser investigadas como a quantidade de IGF-I e de suas seis proteínas de ligação, a transdução do sinal de IGF nas diferentes etapas: nos substratos do receptor de insulina (IRS) e MAP kinases, assim como nos proto-oncogenes (tais como: sos, ras, fos, e myc) os quais participam em diferentes etapas nesta cascata.

Estudos recentes chamam a atenção para a função do proto-oncogene Bcl-2, um gene inibidor da apoptose que poderia estar aumentado nos miomas (3, 30). Contradições existem na literatura o que nos deve levar a realizar mais estudos sobre a cascata do IGF-I e seu papel na proliferação dos leiomiomas.

REFERÊNCIAS

1. Sharara FI, Nieman LK. Growth hormone messenger ribonucleic acid expression in leiomyoma and surrounding myometrium. *Am. J. Obstet. Gynecol* 1995;173(3): 814-19.
2. Novak RA. Effects of growth factors on leiomyomas. In: Osteen K and Diamond M. (Eds) *Endometrium and Endometriosis*. Malden, M.A.: Blackwell Science 1997;301-310.
3. Schwartz SM. Epidemiology of uterine leiomyomata. *Clin Obstet Gynecol* 2001; 44(2) 316-26.
4. Stewart EA. Uterine fibroids. *Lancet* 2001;357:293-8.
5. De Leo V, la Marca A, Morgante G, et al. Administration of somatostatin analogue reduces uterine and myoma volume in women with uterine leiomyomata. *Fertil Steril* 2001;75:632-3.
6. Maruo T, Matsuo H, Samoto T, et al. Effects of progesterone on uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Steroids* 2001;65:585-92.
7. Giudice LC, Irwin JC, Dsupin BA, et al. Insulin-like growth factor (IGF), IGF binding protein (IGFBP), and IGF receptor gene expression and IGFBP synthesis in human uterine leiomyomata. *Hum Reprod* 1993;8:1796-1806.

8. Chandrasekhar Y, Heiner J, Osuamkpe C, et al. Insulin-like growth factor I and II binding in human myometrium and leiomyomas. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166:64-9.
9. Harrison-Woolrych ML, Charnock-Jones DS, Smith SK. Quantification of messenger ribonucleic acid for epidermal growth factor in human myometrium and leiomyomata using reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:1179-84.
10. Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev* 1995;16:117-42.
11. Fayed YM, Tsibris JC, Langenberg PW, et al. Human uterine leiomyoma cells: binding and growth responses to epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin. *Lab Invest* 1989; 60:30-7.
12. Seedorf K. Intracellular signaling by growth factors. *Metabolism*.44: 24-32, 1995.
13. Capp E, Brandelli A, Monego H, et al. Binding and tyrosine kinase activity of insulin receptor in human normal and neoplastic endometrium. *Med Sci Res* 1996;24:621-3.
14. Kellerer M, Corleta HvE, Muhlhofer A, et al. Insulin- and insulin-like growth-factor-I receptor tyrosine-kinase activities in human renal carcinoma. *Int J Cancer* 1995;62:501-7.
15. Häring H. and Obermaier-Kusser B. The insulin receptor: Its role in insulin action and in the pathogenesis of insulin resistance. *The Diabetes Annual* 1995;5:537-66.

16. Accili, D. Receptor Tyrosine Kinase. In: Introduction to Molecular & Cellular Research. Endocrine Society, 2001;Miami, 57-71.
17. Murphy LJ Insulin-like growth factor-binding proteins: functional diversity or redundancy? J. Mol. Endocrin 1998;21:97-107.
18. Wang HS , Chard T. IGFs and IGF-binding proteins in the regulation of human ovarian and endometrial function. J Endocrin 1999;161,1-13,
19. Gloudemans J, Prinsen I, Unnik JAMV, et .al. Insulin-like growth factor gene expression in human smooth muscle tumors. Cancer Res 1990;50:6689-6695.
20. Blakesley VA, Stannard BS, Kalebic T. Role of IGF I receptor in mutagenesis and tumor promotion. J. Endocrinol. 1997;152: 339-344.
21. Strawn EY, Novy MJ, Burry KA, Bethea CL. Insulin-like growth factor I promotes leiomyoma cell growth in vitro. Am. J. Obstet. Gynecol 1995;172(6):1837-44.
22. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folic phenol reagent. J biol chem. 1951;193:265-75,.
23. Silva IS, Morsch DM, Urnauer L, Spritzer PM. Androgen-induced cell growth and c-myc expression in human non-transformed epithelial prostatic cells in primary culture. Endocr Res 2001; 27:153-69.
24. Liu HC, He ZY, Tang YX. Simultaneous detection of multiple gene expression in mouse and human individual preimplantation embryos. Fertil Steril 1997;67:733-41.

25. Corleta HE, Capp E, Corleta OC. Insulin receptor tyrosine kinase activity in colon carcinoma. *Braz J Med Biol Res* 1996;29:1593-7.
26. Tommola P, Pekonen F. and Rutanen E.M. Binding of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I in human myometrium and leiomyoma. *Obstet Gynecol.* 1989;74 (4):658-62,;
27. Van der Ven, 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. Clin. Endocrinol Metab.* 1996;81(10):3629-35.
28. Vollenhoven BJ, Herington AC, Healy DL. Epidermal growth factor and transforming growth factor-beta in uterine fibroids and myometrium. *Gynecol Obstet Invest* 1995;.40:120-4.
29. Burroughs, K.D., Howe, S.R., Okubo, Y., Fuchs-Young, R., LeRoith, D., Walker, C.L. Dysregulation of IGF-I signaling in uterine leiomyoma. *J. Endocrinol.* 2002 Jan; 172(1):83-93.
30. Gao, Z., Matsuo, H. Wang, Y., Nakago, S., Maruo, T. Up regulation by IGF-I of Proliferating Cell Nuclear Antigen and Bcl-2 Protein Expression in human uterine leiomyoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(11):5593-99.

Figura 1

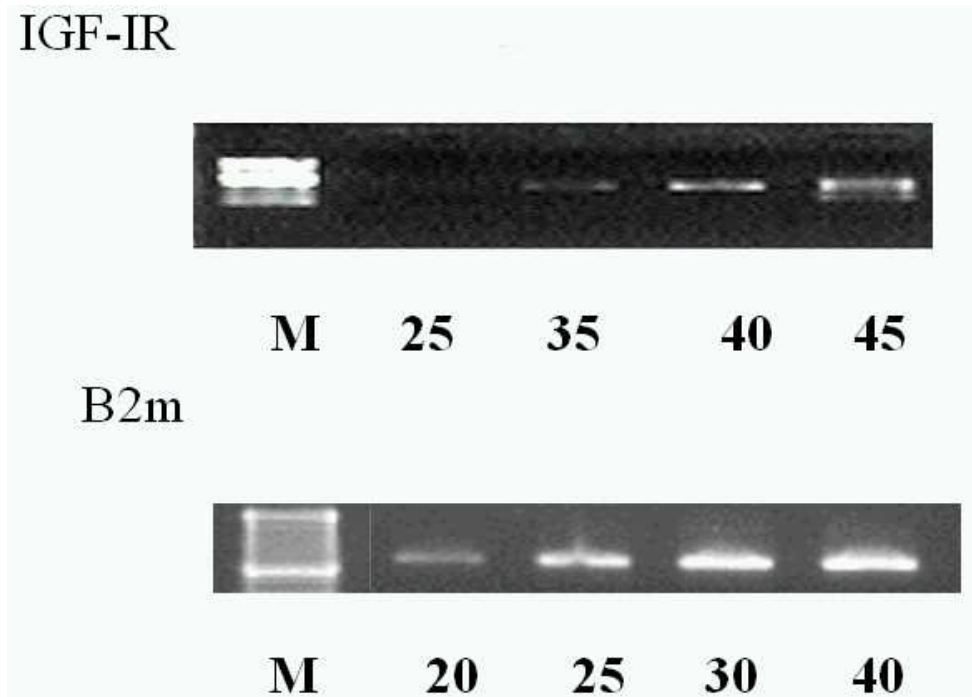


Figura 1. Padronização das curvas para o RT-PCR. A primeira curva de ciclos pertence ao IGF-IR, tendo sido testados: 25, 35, 40 e 45 ciclos. A segunda curva de ciclos pertence a β_2 -microglobulina com 20, 25, 30 e 40 ciclos. Observa-se que o número de ciclos ideais para o IGF-IR foi de 40 e para a β_2 -microglobulina foi de 30 ciclos.

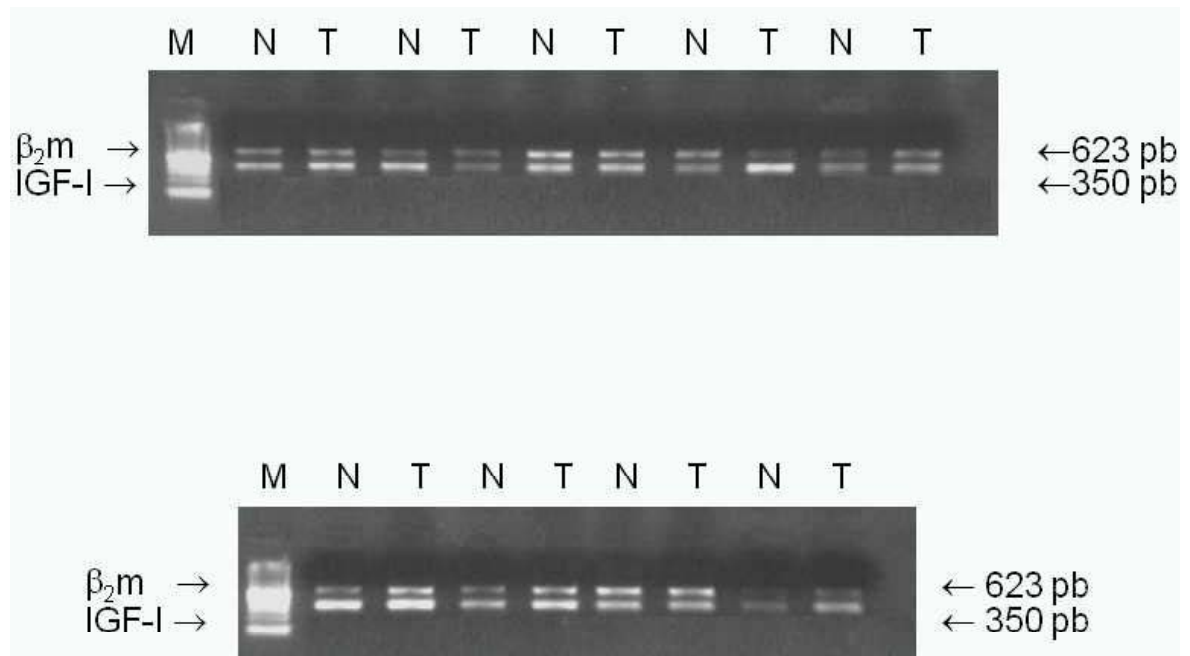
Figura 2

Figura 2. Gel de agarose representativo do total de resultados obtidos com o RT-PCR. O fragmento de 350 pb corresponde ao receptor de IGF-I, e o fragmento de 623 pb correspondente a β_2 -microglobulina resultantes do RT-PCR, visualizados em gel de agarose corado com brometo de etídio. O (M) representa o marcador de peso molecular, (N) o miométrio e (T) o mioma.

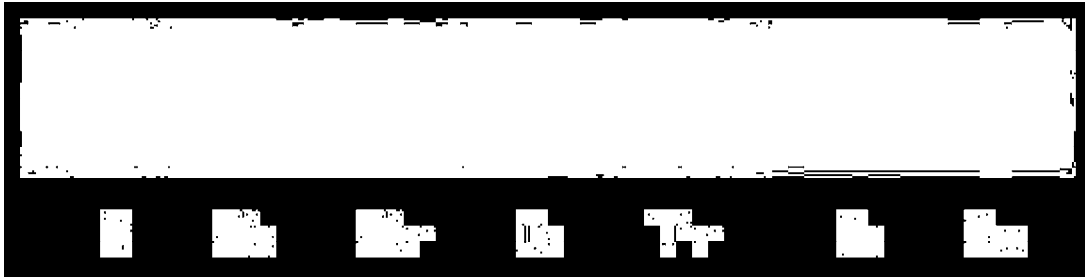
Figura 3

Figura 3. Autoradiografia da autofosforilação do receptor de IGF-I, subunidade β , de miométrio (N), de mioma (T) e de membranas plasmáticas de músculo de ratas Wistar, utilizadas como controle (C). Iguais quantidades de membranas plasmáticas foram incubadas com albumina (-) e IGF-I recombinante (+). As amostras foram analisadas por eletroforese num gel de poliacrilamida, SDS-PAGE a 7,5%, transferidas para uma membrana de nitrocelulose e incubadas com um anticorpo antifosfotirosina. A autofosforilação foi quantificada através de um densitômetro.

Tabela 1. Pacientes submetidas à cirurgia por leiomiomas com quadro clínico de menometrorragia.

Paciente	Idade(a)	Raça	IMC	Diagnóstico Patológico
1	47	B	21,15	end. prolif.
2	47	P	28,95	end. prolif.
3	44	P	22,83	end. secr.
4	32	B	27,05	end. secr.
5	53	B	29,01	end. prolif.
6	50	B	31,33	end. secr.
7	51	B	24,69	end. atrófi.
8	50	B	25,53	end. prolif.
9	42	B	25,46	end. atrófi.
10	48	B	33,35	end. secr.
11	51	B	40,58	end. prolif.
12	53	B	26,77	end. prolif.
13	47	B	30,66	end. secr.
14	44	P	40,39	end. secr.

B= branca; P= preta; End= endométrio; Prolif.= proliferativo; secr.= secretor; atrófi= atrófico.

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados como iniciadores para o RT-PCR do IGF-IR e β -microglobulina (β_2m)

Gene	Seqüência dos <i>Primers</i> (5'-3')	Tamanho
IGF-IR (19)		
Sense	5'- ATGCTGTTTGAAGTGAAGCGCAT- 3'	350 bp
Antisense	5'- CTCGTTCTTGCGGCCCGTTC-3'	
$\beta_2 m$ (18)		
Sense	5' ATCCAGCGTACTCCAAAGATTCAG 3'	623 bp
Antisense	5' AAATTGAAAGTTAACTTATGCACGC 3'	

ARTIGO EM INGLÊS

Insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor mRNA expression and autophosphorylation in human myometrium and leiomyoma

Chaves, Eunice Beatriz Martin, MS, MD+

Silva, Ilma Simoni Brum da, MS, PhD*

Corleta, Helena von Eye, MD, PhD+‡§

Capp, Edison, MD, PhD*‡§+

+ Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Graduate Program in Clinical Medicine – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

* Department of Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

‡ Department of Gynecology and Obstetrics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

§ Clínica Gerar de Fertilização Assistida, Porto Alegre, Brazil

Correspondence to:

Eunice Beatriz Martin Chaves
Rua Francisco Ferrer, 133/202
90 420 140 – Porto Alegre, RS - Brazil
e-mail: glchaves@cpovo.net
Fax: 055 51 33300491

Financial support: FIPE/HCPA.

ABSTRACT

Objective: To determine insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) mRNA levels and IGF-IR tyrosine kinase activity in normal myometrium and leiomyoma.

Design: Experimental study.

Setting: Academic research center.

Patients: Fourteen women with leiomyoma submitted to hysterectomy.

Intervention: Plasma membrane fractions of human myometrium and leiomyoma were prepared, and samples were incubated with and without IGF-I recombinant. In a second experiment, mRNA was isolated and RT-PCR with specific primers was performed.

Main outcome measure: Western blots of plasma membranes incubated with and without IGF-I recombinant were performed. Chemoluminescent methods followed by densitometry were used to assess the tyrosine kinase activity of IGF-IR by autophosphorylation. RT-PCR with specific primers for IGF-I gene sequences was used to determine IGF-IR mRNA levels.

Results: IGF-I mRNA levels in myometrium (0.8216 ± 0.096) and in leiomyoma (0.7905 ± 0.136) were not different ($p=0.648$). The degree of IGF-I recombinant stimulated IGF-IR autophosphorylation (relative optical density of the 95 kDa band) was also not different in myometrium (1.020 ± 0.120) and leiomyoma (1.620 ± 0.656) ($p=0.075$).

Conclusion: There was no difference in IGF-I receptor expression and IGF-I autophosphorylation between normal myometrium and leiomyoma. Other steps of IGF-I signaling chain may participate in the altered proliferation of leiomyomas.

Key Words: leiomyoma, myometrium, IGF-I receptor, tyrosine kinase.

INTRODUCTION

Uterine leiomyomas are the most common tumor of the genital tract, affecting 20% to 30% of women of reproductive age (1, 2). Symptoms are pelvic discomfort, abnormal uterine bleeding, spontaneous abortion, constipation, and urinary frequency (3, 4). Leiomyomas are the most common indication for hysterectomy (3). Although leiomyomas represent a significant public health issue for women, the mechanisms that govern this tumor genesis are poorly understood. Sex steroid hormones may be involved since these tumors appear during the reproductive years, increase in size during pregnancy, and stabilize or regress after menopause (1, 2, 3, 5, 6, 7). This suggests that estrogen may be involved in the pathogenesis and growth of these tumors. It has already been demonstrated that there is a higher concentration of estrogen receptors in leiomyomas than in the adjacent normal myometrium.

Growth factors such as EGF, platelet-derived growth factor, insulin, and IGF-I seem to be implicated in the development of leiomyomas (2, 9, 10, 11, 21). IGF-I may be engaged in a crosstalk with the estrogen signaling pathway that results in synergistic growth stimulation (2, 8).

The insulin-like growth factor -I receptor (IGF-IR) has two α - and two β -subunits that are bound by disulfide bridges. The α -subunits (MW 135 kDa), located outside of the plasma membrane, are the binding sites for IGF-I. The β -subunits (MW 95 kDa) are transmembrane proteins with intrinsic tyrosine kinase activity. The IGF-I receptor exists in at least 2 isoforms, characterized by β -subunits, migrating at

95 or 105 kDa in SDS-PAGE. Functional consequences of these differences have not yet been identified (14). The binding of IGF-I to the α -subunit of the receptor activates the kinase activity and transmits the IGF-I signal to the metabolic systems of the target cell by means of phosphorylation of cellular proteins on tyrosine residues (10, 12, 13, 14, 15, 16).

Insulin-like growth factors are produced in the liver and in various other tissues. They are polypeptides with insulin-like and growth-promoting activities involved in autocrine or paracrine actions. IGF-I functions are modulated by IGF-binding proteins (IGFBPs), of which six distinct variants have been identified. They may either facilitate or inhibit the binding of IGF to their receptors (7, 17, 18).

IGF-I has growth promoting effects such as the stimulation of RNA and DNA synthesis (15). IGF-I has been implicated in many tumor cell growth processes, such as human breast cancer, colon carcinoma, liposarcoma, rat medullar thyroid carcinoma, human smooth muscle tumor, Wilms tumor and neuroblastoma. These findings indicate that IGFs may play an important role in tumorigenesis (19, 20).

We measured mRNA levels and autophosphorylation activity of IGF-IR in human myometrium and leiomyoma to determine whether there are differences in IGF-I receptor gene expression and its tyrosine kinase activity between these tissues.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Samples were obtained from 14 patients at the time of hysterectomy indicated by their doctors, independently of this study. The patients were not taking any hormonal medication or oral contraceptives, and did not have diabetes. Leiomyomas smaller than 1 cm or larger than 5 cm in diameter were not used. Leiomyoma samples were obtained from the center of the leiomyoma to avoid contamination by myometrium. The cycle phase was histologically evaluated. Normal and adjacent tumor samples were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . The Research Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil, approved this study.

Plasma Membrane Preparation

Normal and tumor tissues were homogenized for 45-60 seconds with an ultraturrax at 4°C , in the presence of the protease inhibitors PMSF (1 mM), Tris (40 mM), EDTA (1 mM), sucrose (250 mM), pH 7.4. The homogenate was centrifuged at 3,000 g for 5 min at 4°C to separate membranes from mitochondria, cell debris and nuclei. The supernatant was centrifuged at 30,000 g for 20 min at 4°C . A Dounce homogenizer was used to resuspend the resultant pellet in Hepes (25 mM) and PMSF (1 mM). The protein concentration was determined by the method of Lowry (22). This suspension with a protein content of about 10 mg/ml was kept at -20°C until use.

Receptor phosphorylation

We incubated 20 μg of proteins with insulin-like growth factor I recombinant (100 μM) or bovine serum albumin (BSA) (10 μM) in the presence of orthosodium vanadate (10 mM) and MnCl_2 (200 mM) for 30 min at 22°C. After incubation with ATP (430 μM) at 22°C for 10 min, the reaction was stopped by the addition of Laemmli buffer, and the proteins were boiled for 10 min at 95°C.

Western blotting

Samples were applied to a 7.5% SDS-PAGE electrophoresis and transferred to nitrocellulose by electroblotting. The nitrocellulose was washed with block solution (NET) containing NaCl (150 mM), EDTA (5 mM), TRIS (50 mM), Triton X-100 (0.025%) and gelatin (0.25%), pH 7.4, and incubated with a monoclonal anti-phosphotyrosine antibody (PY 20, Upstate Biotechnology), and goat anti-mouse IgG conjugate (Bio-Rad Laboratories). A Western blotting detection system (chemoluminescence reaction; ECL, Amersham) with film (Kodak X-Omat) exposure for 15 to 60 sec detected the bands. The optical density (OD) of the bands obtained by chemoluminescence was measured by means of densitometric analysis with an image-processing system (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

Extraction of RNA and synthesis of cDNA

The extraction of RNA and the synthesis of cDNA were carried out as previously described (23). Myometrium and leiomyoma samples were homogenized in phenol-guanidine isothiocyanate (Trizol, Gibco BRL, Gaithersburg, MD). Total RNA was extracted with chloroform and precipitated with isopropanol by 12,000 g centrifugation at 4°C. The RNA pellet was washed twice with 75% ethanol, resuspended in diethylpyrocarbonate-treated water and quantified by light absorbency at 260 nm. First strand cDNA was synthesized from 2 µg total RNA, using the SuperScript Preamplification System (Gibco BRL, Gaithersburg, MD).

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

RT-PCR was carried out in a final volume of 50 µl. We denatured 2 µl of the first strand synthesis reaction (with an expected cDNA yield of 4 ng) at 94°C for 1 min in the presence of 20 mM Tris-HCl, pH 8.4, plus 50 mM KCl and 1.5 mM MgCl₂. After this hot start, 1.25 U of Taq DNA polymerase was added to the same Tris-HCl buffer, with 1.5 mM MgCl₂, 0.4 µM sense and antisense primers, and 0.2 mM dNTP mix. A 350 bp fragment of the IGF-I receptor cDNA sequence (24) was amplified using primers designed to span intron-exon boundaries to prevent the amplification of any contaminating genomic DNA. A 623 bp cDNA fragment corresponding to the ubiquitously expressed protein β₂-microglobulin (23) was amplified to adjust the amounts of cDNA in each sample. The sequence of the primers and cDNA fragment sizes are listed in table 2. PCR conditions were 40 cycles (figure 1) of denaturation at 94°C for 1 min; annealing at 62°C for 1 min; extension at 72°C for 1 min. The product of a first strand reaction performed without reverse transcriptase was also amplified

to serve as negative control. A sample of the PCR mixture (15 μ l) was size-fractionated on 1.5 % agarose gel stained with ethidium bromide, run at 120 V and visualized under UV light. The expected bands were quantified by means of densitometric analysis with an image-processing system (ImageMaster VDS, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden).

Statistical Analysis

The results of IGF-IR mRNA levels are analyzed in relation to β_2 -microglobulin optical density. The degree of tyrosine autophosphorylation in leiomyoma and myometrium was calculated by the difference in optical density (OD) of the bands with and without IGF-I recombinant. The results were compared by means of Student's t test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Table 1 shows the clinical data of patients whose uteri were used in this study. Samples from eleven patients were submitted to RT-PCR and 5 were submitted to Western blotting to observe receptor autophosphorylation.

We determined IGF-IR mRNA in both tissues by means of RT-PCR to analyze the gene expression of IGF-I receptor in myometrium and leiomyoma. Electrophoresis of RT-PCR products (figure 2) shows that samples from myometrium and leiomyoma express the IGF-IR sequence in approximately equal amounts - IGF-I

mRNA levels in myometrium were 0.8216 ± 0.096 and in leiomyoma, 0.7905 ± 0.136 ($p=0.648$).

After incubating the plasma membranes with and without IGF-I recombinant, a 95-kDa band corresponding to the IGF-I receptor β -subunit was identified in myometrium and leiomyoma. The degree of autophosphorylation of the IGF-IR β -subunit was similar for myometrium (1.020 ± 0.120) and leiomyoma (1.620 ± 0.656) ($p = 0.075$) (Figure 2).

DISCUSSION

Our study demonstrated a similar gene expression and autophosphorylation of IGF-IR in uterine leiomyoma and matched myometrium. The IGF-I binding in myometrium and leiomyoma has been shown in previous studies (8), and the existence of high affinity IGF-I receptors in leiomyomas suggests that IGF-I may play a role in the pathogenesis of this tumor (8). It has also been observed that there is no correlation between IGF-I binding and the size of myomas. (8) Although we did not observe differences in gene expression between myometrium and leiomyoma, we believe that these findings do not rule out the participation of the IGF-I receptor in the pathogenesis of leiomyomas. Although IGFs are not identified as proto-oncogene products, there are signs that they have a transforming-inducing capacity. Overexpression of IGFs or IGF-IR is observed in many human tumors (25, 26).

Van der Ven and colleagues showed that higher IGF-I concentrations in leiomyoma than in myometrium may be a result of the higher levels of type I IGF

receptors in leiomyoma (27). However, the malignant transformation of smooth muscle tissue is associated with a decrease in IGF-I expression and an increase in IGF-II expression (19). In an animal model, it was shown that the IGF-I expression was 7.5 fold greater than in age-matched normal tissue, but the level of IGF-IR mRNA in both tumor and normal tissues was found to be negatively correlated with that of IGF-I (28).

It is known that IGF-I and insulin, as well as other tyrosine kinase receptors (29), share common steps in their signal pathways. Their action in conjunction with other peptide factors may be an explanation of how IGF-I is involved in the growth of leiomyomas (30). The formation of hybrids of IGF-I/insulin receptors in leiomyomas also remains to be elucidated (29).

Our data suggest that the expression mRNA of IGF-I receptor and its tyrosine kinase activity is similar in uterine leiomyoma and myometrium. Further experiments will be necessary to elucidate the role of the IGF-I receptor transduction in leiomyomas. Other steps in the IGF-I signaling cascade must be investigated: the concentration of IGF and its six binding proteins; IGF-IR signaling pathways such as insulin receptor substrates (IRS) and MAP kinases; and proto-oncogenes (such as *src*, *ras*, *fos*, and *myc*) that participate in different steps of this cascade. Recent research draws attention to the function of the proto-oncogene Bcl-2 protein, an apoptosis-inhibiting gene product that may be enhanced in leiomyomas (3). Contradictions in the literature should lead us to further studies about the IGF-I cascade and its role in leiomyoma proliferation.

REFERENCES

1. Sharara FI, Nieman LK. Growth hormone messenger ribonucleic acid expression in leiomyoma and surrounding myometrium. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173(3):814-19.
2. Novak RA. Effects of growth factors on leiomyomas. In: Osteen K, Diamond M. (eds) *Endometrium and endometriosis*. Malden, MA: Blackwell Science 1997;301-10.
3. Schwartz SM. Epidemiology of uterine leiomyomata. *Clin Obstet Gynecol* 2001;44(2):316-26.
4. Stewart EA. Uterine fibroids. *Lancet* 2001;357:293-8.
5. De Leo V, la Marca A, Morgante G, et al. Administration of somatostatin analogue reduces uterine and myoma volume in women with uterine leiomyomata. *Fertil Steril* 2001;75:632-3.
6. Maruo T, Matsuo H, Samoto T, et al. Effects of progesterone on uterine leiomyoma growth and apoptosis. *Steroids* 2001;65:585-92.
7. Giudice LC, Irwin JC, Dsupin BA, et al. Insulin-like growth factor (IGF), IGF binding protein (IGFBP), and IGF receptor gene expression and IGFBP synthesis in human uterine leiomyomata. *Hum Reprod* 1993;8:1796-806.
8. Chandrasekhar Y, Heiner J, Osuamkpe C, et al. Insulin-like growth factor I and II binding in human myometrium and leiomyomas. *Am J Obstet Gynecol* 1992;166:64-9.

9. Harrison-Woolrych ML, Charnock-Jones DS, Smith SK. Quantification of messenger ribonucleic acid for epidermal growth factor in human myometrium and leiomyomata using reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:1179-84.
10. Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev* 1995;16:117-42.
11. Fayed YM, Tsibris JC, Langenberg PW, et al. Human uterine leiomyoma cells: binding and growth responses to epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin. *Lab Invest* 1989;60:30-7.
12. Seedorf K. Intracellular signaling by growth factors. *Metabolism* 1995;44:24-32.
13. Capp E, Brandelli A, Monego H, et al. Binding and tyrosine kinase activity of insulin receptor in human normal and neoplastic endometrium. *Med Sci Res* 1996;24:621-3.
14. Kellerer M, von Eye Corleta H, Muhlhofer A, et al. Insulin- and insulin-like growth-factor-I receptor tyrosine-kinase activities in human renal carcinoma. *Int J Cancer* 1995;62:501-7.
15. Häring H, Obermaier-Kusser B. The insulin receptor: its role in insulin action and in the pathogenesis of insulin resistance. *The Diabetes Annual* 1995;5:537-66.
16. Accili D. Receptor tyrosine kinase. In: *Introduction to molecular and cellular research*. Endocrine Society, 2001;Miami, 57-71.

17. Murphy LJ. Insulin-like growth factor-binding proteins: functional diversity or redundancy? *J Mol Endocrin* 1998;21:97-107.
18. Wang HS, Chard T. IGFs and IGF-binding proteins in the regulation of human ovarian and endometrial function. *J Endocrin* 1999;161:1-13.
19. Gloudemans J, Prinsen I, Unnik JAMV, et al. Insulin-like growth factor gene expression in human smooth muscle tumors. *Cancer Res* 1990;50:6689-95.
20. Blakesley VA, Stannard BS, Kalebic T. Role of IGF I receptor in mutagenesis and tumor promotion. *J Endocrinol* 1997;152:339-44.
21. Strawn EY, Novy MJ, Burry KA, Bethea CL. Insulin-like growth factor I promotes leiomyoma cell growth in vitro. *Am J Obstet Gynecol* 1995;172(6):1837-44.
22. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folic phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
23. Silva IS, Morsch DM, Urnauer L, Spritzer PM. Androgen-induced cell growth and c-myc expression in human non-transformed epithelial prostatic cells in primary culture. *Endocr Res* 2001;27:153-69.
24. Liu HC, He ZY, Tang YX. Simultaneous detection of multiple gene expression in mouse and human individual preimplantation embryos. *Fertil Steril* 1997;67:733-41.
25. Corleta HE, Capp E, Corleta OC. Insulin receptor tyrosine kinase activity in colon carcinoma. *Braz J Med Biol Res* 1996;29:1593-7.

26. Tommola P, Pekonen F, Rutanen EM. Binding of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I in human myometrium and leiomyoma. *Obstet Gynecol* 1989;74(4):658-62.
27. Van der Ven LTM, et al. Modulation of insulin-like growth factor (IGF) action by IGF-binding proteins in normal, benign and malignant smooth muscle tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(10):3629-35.
28. Vollenhoven BJ, Herington AC, Healy DL. Epidermal growth factor and transforming growth factor-beta in uterine fibroids and myometrium. *Gynecol Obstet Invest* 1995;40:120-4.
29. Burroughs KD, Howe SR, Okubo Y, Fuchs-Young R, LeRoith D, Walker CL. Dysregulation of IGF-I signaling in uterine leiomyoma. *J Endocrinol* 2002;172(1):83-93.
30. Gao Z, Matsuo H, Wang Y, Nakago S, Maruo T. Up regulation by IGF-I of Proliferating Cell Nuclear Antigen and Bcl-2 Protein Expression in human uterine leiomyoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(11):5593-99.

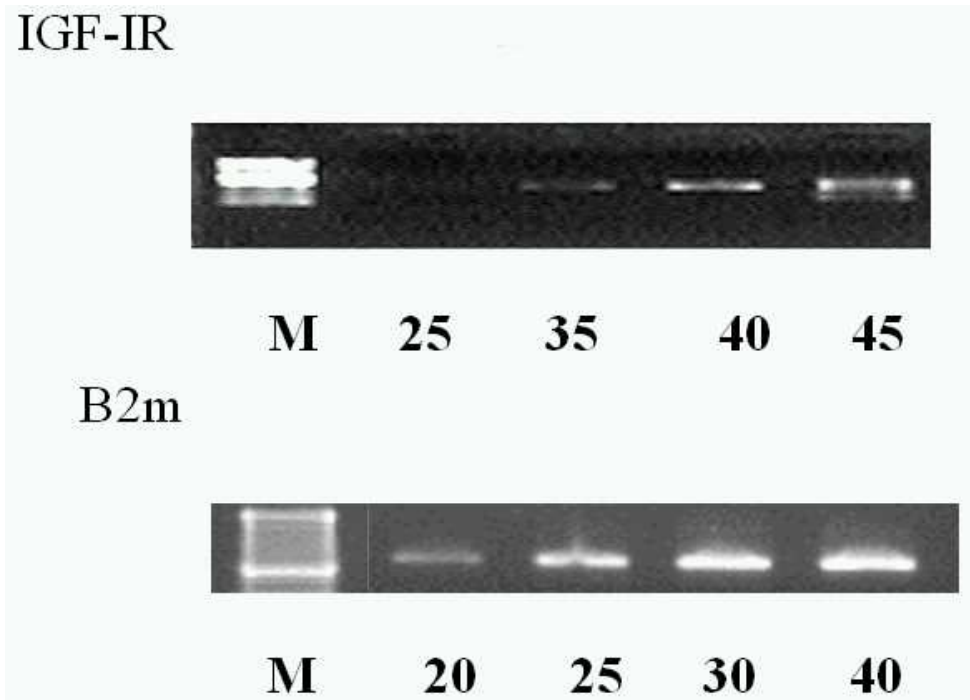
Figure 1

Figure 1. RT-PCR standard curves: first is IGF-I with 25, 35, 40 and 45 cycles; second is β_2 -microglobulin with 20, 25, 30 and 40 cycles. Both show ideal cycles at 40 for IGF-I and 30 for β_2 -microglobulin.

Figure 2

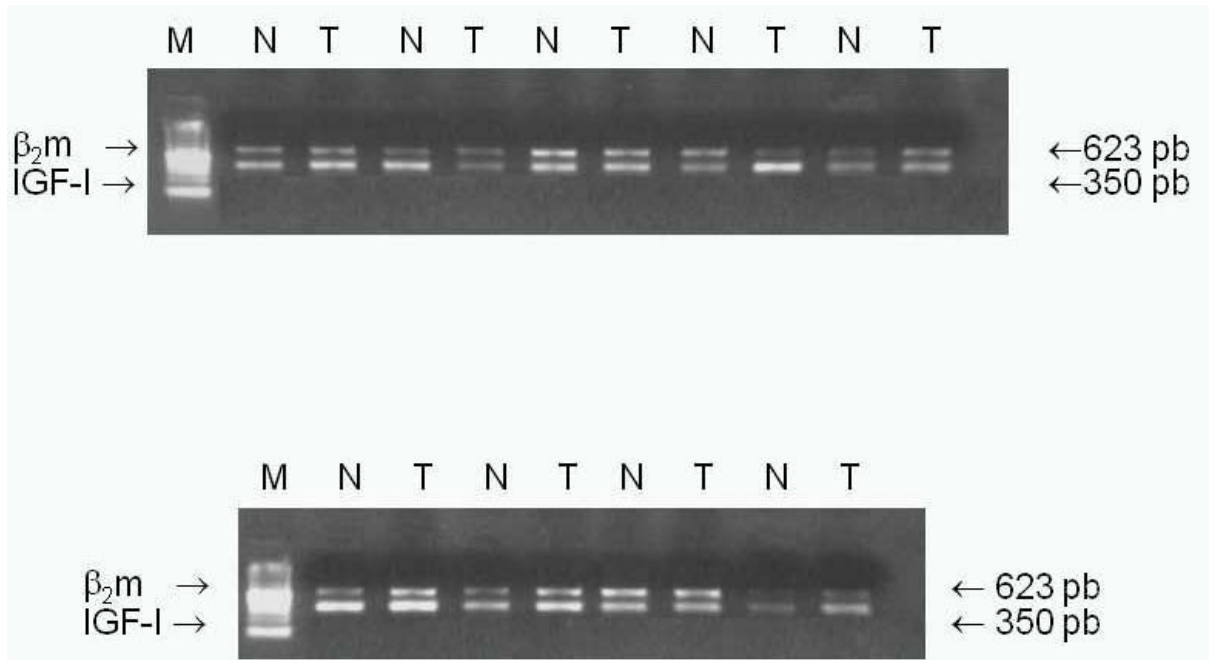


Figure 2. Agarose gel representative of a total of eleven RT-PCR results: 350 bp fragment corresponds to IGF-I receptor, and 623 bp fragment corresponds to β_2 -microglobulina RT-PCR products; visualized in agarose gel stained with ethidium bromide; myometrium (N) and leiomyoma (T).

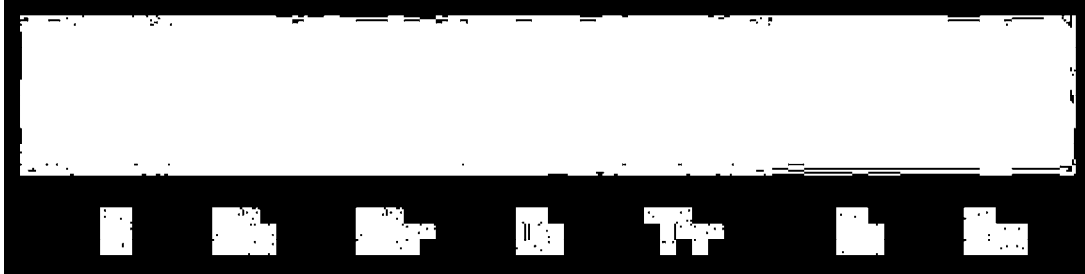
Figure 3

Figure 3. Autoradiogram of autophosphorylation showing β -subunit of IGF-I receptor from normal myometrium (N), leiomyoma (T), and plasma membrane from Wistar rat skeletal muscle used as control (C). Equal amounts of plasma membrane were incubated with Albumin(-) or IGF-recombinant (+). Samples were analyzed by means of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (7.5% gel), transferred to nitrocellulose membrane and incubated with antiphosphotyrosine antibody.

Table 1. Patients and clinical and pathologic diagnoses

Patient	Age(yr)	Race	BMI	Pathologic diagnosis
1	47	W	21.15	end.prolif.
2	47	B	28.95	end.prolif.
3	44	B	22.83	end.secr.
4	32	W	27.05	end.secr.
5	53	W	29.01	end.prolif.
6	50	W	31.33	end.secr.
7	51	W	24.69	end.atro.
8	50	W	25.53	end.prolif.
9	42	W	25.46	end.atro.
10	48	W	33.35	end.secr.
11	51	W	40.58	end.prolif.
12	53	W	26.77	end.prolif.
13	47	W	30.66	end.secr.
14	44	B	40.39	end.secr.

W= white; B= black; BMI= body mass index; end.= endometrium;
 prolif. = proliferative; secr.= secretory; atro= atrophic.

Table 2. Oligonucleotide primers used for RT-PCR for IGF-IR and β -microglobulin

Gene	Primer Sequence (5'-3')	Size
IGF-IR (19)		
Sense	5'- ATGCTGTTTGAAGTGAAGCGCAT- 3'	350 bp
Antisense	5'- CTCGTTCTTGCGGCCCGTTC-3'	
β_2 m (18)		
Sense	5' ATCCAGCGTACTCCAAAGATTCAG 3'	623 bp
Antisense	5' AAATTGAAAGTTAACTTATGCACGC 3'	

ARTIGO DE REVISÃO

PUBLICADO NA REVISTA FEMINA EM MAIO DE 2002

Miomatose uterina – papel do IGF- I e seu receptor

Uterine leiomyoma – role of IGF-I and its receptor

Eunice Beatriz Martin Chaves¹, Helena von Eye Corleta², Edison Capp^{2,3}, Guilherme Kirgner Toscani⁴

¹Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica/UFRGS

²Departamento de Ginecologia e Obstetrícia - UFRGS/Serviço de Ginecologia e Obstetrícia - HCPA

³Departamento de Fisiologia – UFRGS

Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia/UFRGS

Endereço para correspondência:
Eunice Beatriz Martin Chaves
Rua Francisco Ferrer, 133/202
90420-140 – Porto Alegre – RS
Brasil
E-mail: glchaves@cpovo.net

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 IGF-I e 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

IGF-I 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.

IGF – I

O IGF-I 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 IGF-I humano consiste em pelo menos 5 exons, os quais são localizados dentro de uma região de 90 kilobases, no cromossoma 12. Há 2 percursos de mRNA para IGF-I, os quais diferem na parte carboxi-terminal. No entanto, o IGF-I derivado de ambos percursos são idênticos (Gloudemans, 1990).

Ambos IGFs são essenciais no desenvolvimento embrionário e mantém a concentração nanomolar na vida adulta. Após o nascimento o IGF – I 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 IGF – I e a liberação do IGF – I. Assim a concentração de IGF – I usualmente é semelhante a do GH durante as 24 horas do dia, por sua vez o IGF – I inibe a secreção do GH pela hipófise (Roith,1997). O GH, o hormônio da paratireóide e os esteróides sexuais regulam a produção de IGF-I nos ossos, enquanto os esteróides sexuais são os principais reguladores do IGF-I no 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 IGF – I 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 IGF-I apresenta 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 IGF-I (Van Der Ven, 1996).

O IGF-I e a proteína 3 de ligação do IGF-I formam 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 mRNA 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 IGF-I na 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 IGF-I 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 IGF – I

Os receptores de IGF I 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 tirosina quinase 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 IGF I tem potencial de formar um receptor híbrido heterotetramérico. Este receptor híbrido tem capacidade de se ligar a insulina e ao IGF-I com alta afinidade. (Kellerer,1995). No entanto, vários grupos sugerem que o receptor híbrido é mais responsivo ao estímulo de IGF-I do que da insulina e assim exibiria propriedades funcionais predominantemente de um receptor de IGF-I.

TRANSDUÇÃO DO SINAL DE IGF – I

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 IGF – I 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).

IGF-I E MIOMAS

O mecanismo pelo qual o receptor de IGF-I 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 IGF-I 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 IGF-I deficientes, nos quais específicos aminoácidos sofreram mutações. Além disto, partes específicas do C-terminal do

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

Estudos recentes têm mostrado que o leiomioma mostra uma resposta proliferativa aumentada ao IGF-I in vitro comparado ao miométrio normal. Esta resposta é atribuída ao fato do leiomioma expressar níveis mais elevados do receptor de IGF-I (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 IGF-I 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 IGF-I 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 IGF-I no local, sem mudar os níveis de receptores. Os níveis plasmáticos de GH e IGF-I 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 do mRNA 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 IGF-I tem sido identificada nas membranas uterinas usando métodos com material radioativo (Chandrasekhar,1992). Estudos mostram que a maior parte do IGF-I marcado se liga às células musculares do miométrio. Assim, estes estudos mostram que, ambos, IGF-I e seus receptores são mais abundantes no miométrio, sendo sugerido que o IGF-I 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 IGF-I 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 mRNAs para o IGF-I e o IGF-II. Outros estudos sugerem que os níveis de IGF-I mRNA são similares em ambos os tecidos, no entanto, estão suprimidos no leiomiossarcoma, tumor maligno (Gloude-mans, 1990). Ao contrário, os níveis de IGF-II mRNA são consistentemente mais elevados em leiomiossarcomas do que no tecido miometrial normal. (Gloude-mans, 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 IGF-I é suprimido com o aumento da malignidade poderia indicar

que a expressão do IGF-I se desse no tecido conectivo do miométrio ao invés das células de músculo liso. Entretanto estudos imunohistoquímicos mostram que o IGF-I se apresenta exclusivamente nas células do músculo liso e não no tecido conectivo (Gloude-mans, 1990).

A secreção de IGF-I 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 IGF-I 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 IGF-I e IGF-II (Rein, 1990).

CONCLUSÃO

O IGF-I 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.

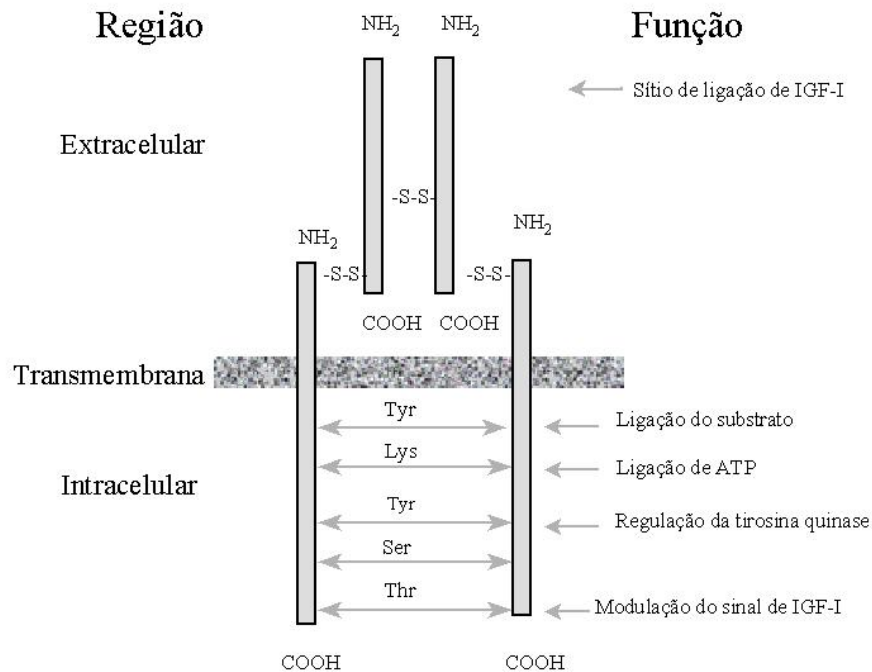
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BLAKESLEY VA, STANNARD BS, KALEBIC T. Role of IGF I receptor in mutagenesis and tumor promotion. *Journal of Endocrinol.* 152:339-344, 1997.
2. CAPP E, BRANDELLI A, MONEGO H, RIBEIRO MF, FREITAS MS, 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, 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 MY, DAWOOD FSK. 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 LC, IRWIN JC, DSUPIN BA, PANNIER EM, JIN IH, VU TH, 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*, 8:1796-1806, 1993.

7. GLOUDEMANS J, PRINSEN I, UNNIK JAMV, 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 HU. Insulin and insulin like growth factor-I receptor tyrosine kinase activities in human renal carcinoma. *Int J Cancer*, 62: 501-507, 1995.
9. MURPHY LJ. Insulin-like growth factor-binding proteins: functional diversity or redundancy? *Journal of Molecular Endocrinology*, 21; 97-107, 1998.
10. NOVAK RA. 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, BAYLINK DJ, MOHAN S. Insulin-like Growth Factor-Binding Proteins in Serum and Other Biological Fluids: Regulation and Functions. *Endocrine Reviews* 18(6): 801-31, 1997.
12. ROITH DL Insulin-like growth Factors, *The New England J of Medicine*, 336 (9): 633-640, Feb 27, 1997.
13. SHARARA FI, NIEMAN LK. Growth hormone messenger ribonucleic acid expression in leiomyoma and surrounding myometrium. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 173(3): 814-19, 1995.

14. STRAWN EY, NOVY MJ, BURRY KA, BETHEA CL. Insulin-like growth factor I promotes leiomyoma cell growth in vitro. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 172(6): 1837-44, 1995.
15. STWEART EA, FRIEDMAN AJ. Steroidal treatment of myomas: preoperative and long term medical therapy. *Semin Reprod Endocrinol.* 10:344-357, 1992.
16. VAN DER VEN LTM, 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 BJ, HERINGTON AC, HEALY DL. Epidermal Growth Factor and Transforming Growth Factor- α in uterine Fibroids and Myometrium. *Gynecol Obstet Invest*, 40: 120-124, 1995.
18. WANG HS, 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 HS, 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 IGF-I 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.

ANEXO 1

CONSENTIMENTO INFORMADO

Estudo: Transdução do sinal de IGF-I (Insulin-like Growth Factor) em mioma e miométrio humanos

Nº DO PROTOCOLO : _____ INSTITUIÇÃO: UFRGS

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Eunice B. Martin Chaves e Helena Corleta.

TELEFONE para contato: (051) 3300491

NOME DO PACIENTE: _____

1 Objetivos deste estudo

A fim de possibilitar novas estratégias não invasivas no tratamento de miomas, torna-se essencial maiores conhecimentos a respeito dos mecanismos que envolvem a regulação do crescimento dos miomas. Assim este projeto de pesquisa tem por objetivo determinar a expressão e a atividade do IGF I (*Insulin-like Growth-Factor – I*) em tecidos de miomas e miométrio humanos.

2 procedimentos para obtenção do material

O material será obtido em cirurgia indicada pelo seu médico, não sendo influenciada de modo algum por esta pesquisa. Nenhum procedimento além daquele indicado por seu médico será realizado.

3 Possíveis benefícios deste estudo

Espera-se que este estudo traga importantes informações a respeito da transdução do sinal de IGF I (*Insulin-like Growth-Factor – I*) em tecidos de miomas e miométrio humanos, permitindo a identificação de possíveis mecanismos que envolvem o crescimento destes tumores.

4 Cobertura

A participação neste estudo é voluntária, não implicando em qualquer cobertura financeira.

5 Direito de desistência

O paciente poderá desistir de participar a qualquer momento. Sua decisão de não participar não afetará o atendimento médico posterior.

6 Sigilo

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.

7 Consentimento

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 do presente estudo.

Assinatura do paciente

Data

Assinatura do médico responsável

Data