Luciana Ribeiro Montenegro

**Estudo *in vitro* da sensibilidade ao IGF-1 de fibroblastos
de crianças nascidas pequenas para a idade gestacional
sem recuperação estatural pós-natal**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para a
obtenção de título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Endocrinologia

Orientador: Alexander Augusto de Lima Jorge

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Montenegro, Luciana Ribeiro

Estudo *in vitro* da sensibilidade ao IGF-1 de fibroblastos de crianças nascidas pequenas para a idade gestacional sem recuperação estatural pós-natal / Luciana Ribeiro Montenegro. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Clínica Médica.

Área de concentração: Endocrinologia.

Orientador: Alexander Augusto de Lima Jorge.

Descritores: 1.Fator de crescimento insulin-like I/genética 2.Fator de crescimento insulin-like II/genética 3.Receptor IGF tipo 1/genética 4.Proteína 3 de ligação a fator de crescimento insulin-like/fisiologia 5.Retardo do crescimento fetal/etiologia 6.Transtornos do crescimento/etiologia 7.Insuficiência de crescimento/etiologia

USP/FM/SBD-096/09

Este trabalho foi realizado na Unidade Endocrinologia do Desenvolvimento e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM 42 da disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com apoio Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): Projeto Temático 05/04726-0 e bolsa de doutorado 05/5014-2.

Dedicatória

Aos meus pais pelo apoio irrestrito em todos os momentos de minha vida. Ao Marcus, que soube compreender os meus momentos de ausência.
TE AMO!!

Agradecimientos

Há 4 anos comecei algo e hoje finalmente posso mostrar para vocês a conclusão final de um trabalho árduo, mas que finalmente posso chamá-lo de tese. Nesses anos arrisquei-me em uma nova cidade, em um novo trabalho, em novos amigos. Apreendi muito e amadureci como profissional e como pessoa. Não foi uma caminhada breve, mas uma travessia que parecia sem fim. Intercorrências de toda ordem me atropelaram durante a realização do trabalho (longos experimentos, resultados insatisfatórios, dezenas de repetições, “dupla qualificação”...). Só mesmo o apoio do meu grande amor, de amigos e familiares para me manter no caminho certo e tornar possível à conclusão deste trabalho.

Nada na vida conquistamos sozinhos. Sempre precisamos de outras pessoas para nos ajudar a alcançar os nossos objetivos. O homem jamais poderá iludir para si o dom de ser auto-suficiente. Ninguém e nada cresce sozinho. Muitas vezes um simples gesto, uma simples palavra pode mudar a nossa vida e contribuir para o nosso sucesso.

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus pela sua presença constante na minha vida sem que eu precise pedir; pelo auxílio nas minhas escolhas e por me confortar nas horas difíceis, sempre me dando forças para seguir em frente.

Ao Marcus pela amizade, amor, carinho e apoio incondicional. Você me ensinou que, por mais difícil que seja o caminho, desistir seria covardia. Ser vencedor é nunca desistir de lutar, mesmo quando se está sempre

---

---

perdendo. Se eu procurasse as palavras mais belas do mundo jamais conseguiria expressar o amor que sinto por você.

Aos meus pais pelo constante incentivo e admiração pelo meu trabalho. Sempre me apoiaram e iluminaram os caminhos obscuros com afeto e dedicação para que eu os seguisse sem medo e repleta de esperança.

Ao vô e vó, exemplo de amor e união que harmonizaram a mudança de cidade com um convívio que antes, devido à distância, não era possível. Hoje sinto que a saudade não é uma palavra triste falando de alguém que se foi, mas sim que tivemos momentos maravilhosos juntos.

Ao meu irmão Fil, a Mel e Bezinho, por simplesmente fazerem parte da minha vida. Nada como um sorriso do meu “fofucho” para iluminar todo o meu dia.

Aos meus padrinhos, Tia Ana e Tio Artur, sempre presentes em todos os meus grandes momentos.

A toda a minha família de BH pelos encontros e desencontros, mas sempre em clima de alegria e festa.

Aos eternos amigos da PUC por toda a torcida. Sempre ao meu lado, mesmo a distância. Onde quer que nos encontremos, são os nossos amigos que constituem o nosso mundo.

Ao meu orientador, Dr. Alexander Augusto de Lima Jorge, por me acolher a partir de uma consulta em seu consultório e compartilhar comigo seu tema de pesquisa. Sempre foi uma pessoa disposta a oferecer estímulos e muito me ensinou durante toda a realização desse trabalho; sempre

---

---

corajoso em ousar trabalhar com novas idéias e conceitos, correndo os riscos inerentes a esta atitude. Durante esses anos sorrimos juntos os melhores sorrisos, choramos juntos as nossas amarguras e aprendemos o mais importante da vida: conviver, enfrentar obstáculos e, apesar de tudo, continuarmos unidos no mesmo ideal até o fim.

A Dra. Berenice pela grande oportunidade concedida de participar da grande família LIM42; dos inúmeros aprendizados além do eterno incentivo ao crescimento pessoal e profissional.

Ao Dr. Ivo e Dra. Ana Cláudia por todas as dicas e sábias sugestões, todas sempre bem vindas.

A Dra. Elaine por todas as sugestões e dedicação na “primeira qualificação”.

Ao Dr. Mário Saad pela ajuda com os anticorpos e protocolos.

As secretárias Nilda, Cris e Ana sempre disponíveis a ajudar.

A Ana Elisa pela ajuda constante com os cálculos bioquímicos e ensinamentos moleculares.

A Fran pelo carinho e eficiência, nunca deixando faltar material ou cafezinho para todos.

A Cidinha pela paciência no constante pedido de compras.

A Cris e Miriam pela inesgotável ajuda e descontração na sala de cultura e pelo MLPA.

Ao “trio pink”: Déb, Camila e Linde, pelas viagens inesquecíveis, por todos os momentos de amizade, fofocas e companheirismo.

As minhas “irmãs mais novas” Everlayny, Alexsandra, Patrícia e Marcela pelo ótimo convívio e pela paciência por tomar conta da bancada com tanto material. Um obrigado especial a Andréia por toda a ajuda no final.

A Vivi por todo o com a minha “menininha”, além da amizade sincera.

Um obrigado mais que especial a uma grande nova amiga Helena, pela constante ajuda na bancada, pelo ombro amigo e por todo o incentivo nas horas difíceis.

Aos demais amigos do LIM42 por proporcionar um clima agradável, alegre e descontraído de trabalho: Ana Paula, Antônio, Beatriz, Carolina, Érika, Frederico, Karina, Letícia, Luciana Brito. Luciani, Madson, Mariana, Mariza, Maria Estela, Milena, Priscila, Regina, Rocil, Tamaya, Vinícius e a turma dos hormônios.

Ha, e obrigada a todos por aguentarem o meu uso constante de β mercaptoetanol!!

Sumário

Listas de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Anexos

Abstract

1	Introdução.....	1
1.1	Ações parácrinas e endócrinas dos fatores de crescimento insulino-símiles (IGFs)	4
1.2	Mecanismos de ação das IGFs e seus receptores	7
1.3	Via de sinalização do IGF-1R.....	8
1.4	Modelos animais de retardo de crescimento intra-uterino (RCIU)...	11
1.5	Defeitos no <i>IGF1</i> e <i>IGF1R</i> em humanos	13
1.6	Defeitos epigenéticos do <i>IGF2</i>	15
1.7	Justificativa para o estudo <i>in vitro</i> da sensibilidade ao IGF-1	18
2	Objetivo.....	20
3	Métodos.....	22
3.1	Considerações éticas	23
3.2	Casuística	23
3.3	Descrição dos pacientes selecionados	25
3.4	Preparação das amostras	33
3.5	Avaliação do efeito proliferativo	35
3.6	Avaliação da via de sinalização do IGF-1	37

3.7	Estudo da expressão do RNAm do <i>IGF1R</i> e <i>IGFB3</i> por PCR em tempo real	38
3.8	Avaliação do conteúdo de IGF-1R, IGBP-3 e GRB10 nas linhagens celulares	40
3.9	Avaliação da produção de IGFBP-3.....	40
3.10	Análises estatísticas.....	41
4	Resultados	42
4.1	Avaliação do efeito proliferativo	43
4.2	Avaliação da expressão e conteúdo de IGF-1R.....	46
4.3	Avaliação da via de sinalização do IGF-1	48
4.3.1	Avaliação da via MAPK	48
4.3.2	Avaliação da via PI3K	50
4.4	Avaliação da expressão do IGFBP-3	51
4.5	Produção de IGFBP-3 para o meio de cultura	53
4.6	Proliferação e ativação da via MAPK por desIGF-1	54
4.7	Concentração de IGFBP-3 intracelular	56
4.8	Avaliação do conteúdo de GRB10	57
5	Discussão	58
6	Conclusões	65
7	Anexos	67
8	Referências	81

Lista de Abreviaturas

ALS	Acid labile subunit
AGnRH	GnRH analogue
BSA	Bovine serum albumin
C1	Controle 1
C2	Controle 2
cDNA	Complementary DNA
desIGF-1	IGF-1 resistant to IGFBPs ([Arg3]-IGF-I-des)
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNPM	Desenvolvimento neuropsicomotor
DP	Desvio padrão
FCS	Fetal calf serum (soro bovino fetal)
GHR	Growth hormone receptor
GLUT4	Insulin-regulated glucose transporter 4
GRB10	Growth-factor receptor-bound protein 10
GRB2	Growth factor receptor-bound protein2
H ₂ O MiliQ	Água destilada e deionizada
hGH	Growth hormone
IB	Imunoblot
ICR1	Imprinting center region 1
IGF-1	Insulin like growth factor 1
IGF-1R	Insulin like growth factor one receptor

IGF-2	Insulin like growth factor 2
IGF-2R	Insulin like growth factor two receptor
IGFBPs	IGF binding proteins
IGFs	Insulin-like growth factors
IgG	Immunoglobulin G
IMC	Índice de massa corporal
IR	Insulin receptor
IRS-1	Insulin-receptor substrate-1
Jak	Janus quinase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
mUPD7	Dissomia uniparental materna do cromossomo 7
PCR	Polymerase chain reaction
PBS-T	Phosphate buffer saline com tween-tweent
PI3K	Phosphoinositide-3 kinase
PIG	Pequena para a idade gestacional
PVDF	Polyvinylidene fluoride
pY	Phosphotyrosine
RCIU	Retardo de crescimento intra-uterino
RNA _m	Messenger ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse transcriptase PCR
SDS - PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SGA	Small for gestational age
SHC	SRC homology proteins

SMF	Serum free médium (meio livre de hormônios)
SNC	Sistema nervoso central
SOS1	Son of sevenless homolog 1 (<i>Drosophila</i>)
SSR	Síndrome de Silver Russel
Stat5a/b	Signal transducers and activator of transcription A e B
TH	Target height (altura alvo)
Taq	Thermus aquaticus polymerase
Thr204	Threonine kinase 204
TORSCH	Toxoplasma, vírus da rubéola, citomegalovírus e herpes vírus
Tyr202	Tyrosine kinase 202

Lista de Símbolos

---

cm/ano	centímetros por ano
cm ²	centímetros quadrados
cm	centímetros
G	gramas
Kb	kilobases
KDa	kilodaltons
mg/L	miligramas por litro
nm	nanômetros
ng/mL	nanogramas por mililitro
Nm	nano molar
µg/kg/dia	microgramas por kilo por dia
<	menor que
>	maior que
=	igual a
≤	menor ou igual
≥	maior ou igual

Lista de Figuras

Figura 1:	Vias de sinalização para IGF-1 e insulina	9
Figura 2:	Papel da metilação da região ICR1 na regulação da expressão do <i>IGF2</i> e <i>H19</i>	17
Figura 3:	Desenvolvimento das linhagens de fibroblastos.....	34
Figura 4:	Esquema do ensaio de proliferação.	36
Figura 5:	Resposta proliferativa dos fibroblastos frente ao estímulo com IGF-1	44
Figura 6:	Análise da expressão do <i>IGF1R</i> em fibroblastos.....	47
Figura 7:	Avaliação do conteúdo de IGF-1R nas linhagens celulares dos pacientes PIG e controles.....	47
Figura 8:	Efeito da ação do IGF-1 em cultura de fibroblastos sobre a fosforilação de ERK1/2.....	48
Figura 9:	Fosforilação de ERK após estímulo com IGF-1 em cultura de fibroblastos.	49
Figura 10:	Efeito da ação do IGF-1 em cultura de fibroblastos sobre a fosforilação de AKT.....	50
Figura 11:	Fosforilação de AKT após estímulo com IGF-1 em cultura de fibroblastos.	51
Figura 12:	Análise da expressão do <i>IGFBP3</i>	52
Figura 13:	Análise da quantidade de IGFBP-3 no meio de cultura. A: imunoblot do meio de cultura. B: Gráfico representa os resultados de 3 ensaios independentes	54
Figura 14:	Fosforilação de ERK1/2 após estímulo com IGF-1 ou desIGF-1 em cultura de fibroblastos. A- imunoblot B: Gráfico representativo.....	55
Figura 15:	Avaliação do conteúdo de IGFBP-3 intracelular	56
Figura 16:	Avaliação do conteúdo de GRB10.	57

Lista de Tabelas

Tabela 1:	Fenótipo em relação ao crescimento pré-natal de diversos modelos animais com nocaute em diversos genes.....	12
Tabela 2:	Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes selecionados	32
Tabela 3:	Incremento percentual de proliferação em relação às células não tratadas das linhagens de fibroblastos de pacientes nascidos PIG e controles	45

Lista de Anexos

Anexo A: Gráficos de crescimento (01) e IMC (02) do paciente SGA1	68
Anexo B: Gráficos de crescimento (01) e IMC (02) do paciente SGA2	70
Anexo C: Gráficos de crescimento (01) e IMC (02) do paciente SGA3	72
Anexo D: Gráficos de crescimento (01) e IMC (02) do paciente SGA4	74
Anexo E: Lista de reagentes e soluções utilizadas no estudo	76

Resumo

Montenegro LR. *Estudo in vitro da sensibilidade ao IGF-1 de fibroblastos de crianças nascidas pequenas para a idade gestacional sem recuperação estatural pós-natal* [tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 92p.

Introdução: Crianças nascidas pequenas para a idade gestacional (PIG) apresentam maior risco de permanecerem com baixa estatura na vida adulta. Os fatores de crescimento insulino-símile tipo 1 e 2 (IGF-1 e IGF-2) são os principais fatores endócrinos determinantes do crescimento fetal. A maioria das ações conhecidas do IGF-1 e 2 é mediada via um receptor tirosina quinase, conhecido como IGF-1R. Recentemente, a insensibilidade ao IGF-1 foi identificada como uma das causas de retardo de crescimento em crianças nascidas PIG que não apresentaram recuperação espontânea do crescimento na vida pós-natal. Crianças afetadas apresentavam níveis elevados de IGF-1, IGFBP-3 além de microcefalia. O papel de defeitos pós-receptor na sinalização do IGF-1 como causa de retardo de crescimento pré e pós-natal ainda não foi investigado. **Objetivo:** Analisar *in vitro* a ação do IGF-1 em fibroblastos de crianças nascidas PIG. **Material e métodos:** Desenvolvemos cultura de fibroblastos de 2 controles (C1 e C2) e de 4 pacientes nascidos PIG (SGA1, SGA2, SGA3 e SGA4) com suspeita de insensibilidade ao IGF-1 por ausência de recuperação do crescimento na vida pós natal, resposta insatisfatória ao tratamento com hGH apesar de níveis normais/elevados de IGF-1. Foi confirmado do ponto de vista molecular que um dos pacientes (SGA1) apresenta Síndrome de Silver-Russell com perda da metilação do alelo paterno da região ICR1 (*imprinting center region 1*) importante para a expressão do IGF-2. Defeitos no gene do *IGF1* e *IGF1R* foram afastados por sequenciamento direto. As ações do IGF-1 foram determinadas por ensaios de proliferação, análise da produção de IGFBP-3 em meio de cultura e estudos de fosforilação de proteínas da via de sinalização do IGF-1 em fibroblastos (AKT e ERK). **Resultados:** As linhagens SGA1, SGA2 e SGA3 proliferaram respectivamente 31%, 60% e 78% a menos sob estímulo de IGF-1 em relação às linhagens controles. Já a linhagem SGA4 apresentou comportamento semelhante às linhagens controles. No estudo da expressão do RNAm do *IGF1R* por PCR em tempo real, não foi observada diferença significativa na expressão do *IGF1R* nas diversas linhagens PIG em relação aos controles, assim como o conteúdo total da proteína IGF-1R. Em relação à ativação da via MAPK, todas as linhagens dos pacientes PIGs apresentaram menor fosforilação ERK1/2 basal e após estímulo com IGF-1, quando comparadas com as linhagens controles ($p < 0.001$) apesar do conteúdo total de ERK1/2 ser semelhante. Já em relação a ativação da via PI3K, as linhagens SGA1, SGA2, SGA3 e SGA4 não diferiram significativamente em relação aos fibroblastos controles quanto à ativação de AKT pelo IGF-1. O conteúdo total de AKT também foi semelhante em todas as linhagens estudadas. O estudo da expressão de *IGFBP3* mostrou um aumento da expressão deste peptídeo na linhagem de fibroblastos do paciente SGA1 (14X). O conteúdo de IGFBP-3 intracelular não sofreu alteração, porém comprovamos que a linhagem SGA1 secretava 2x mais IGFBP-3 para o meio de cultura. Apesar de apresentarem estrutura,

---

---

expressão e conteúdo de IGF1R normais, essas mesmas 3 linhagens celulares que apresentaram menor proliferação também apresentaram diminuição na fosforilação de ERK após tratamento com IGF-1. Mesmo sob o estímulo com desIGF-1 (um análogo do IGF-1 com baixa afinidade por IGFBPs mas que preserva sua capacidade de ativar o receptor IGF-1R) a ativação de ERK e a proliferação celular se manteve abaixo das das linhagens controles. O estudo do conteúdo total de GRB10 foi semelhante em todas as linhagens celulares. **Conclusão:** Três dos 4 pacientes PIG estudados apresentaram insensibilidade pós-receptor ao IGF-1. A linhagem celular SGA1, obtida de um paciente com hipometilação do ICR1 11p15 causando SSR, demonstramos um aumento da expressão e secreção de IGFBP-3, o qual não se mostrou responsável por inibir a ação do IGF-1 nestes fibroblastos. Novos estudos devem ser desenvolvidos para identificar o defeito molecular responsável pela insensibilidade ao IGF-1 a nível pós-receptor observada nestes pacientes.

Descritores: 1.Fator de crescimento insulín-like I/genética 2.Fator de crescimento insulín-like II/genética 3.Receptor IGF tipo 1/genética 4.Proteína 3 de ligação a fator de crescimento insulín-like/fisiologia 5.Retardo do crescimento fetal/etiologia 6.Transtornos do crescimento/etiologia 7.Insuficiência de crescimento/etiologia

---

Summary

Montenegro LR. *In vitro study of sensitivity to IGF-1 of fibroblasts of children born small for gestational age without postnatal statural recovery* [thesis]. São Paulo. "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009. 92p.

Introduction: Children born small for gestational age (SGA) have a higher risk of staying with short stature in adulthood. The insulin-like growth factors (IGF-1 and IGF-2) are the main endocrine factor determining fetal growth. Most of the known actions of IGFs are mediated by IGF-1R, a tyrosine kinase receptor. Recently, the IGF-1 insensitivity was identified causing growth retardation in children born SGA who who did not present spontaneous catch-up growth in postnatal life. Affected children had elevated IGF-1 and IGFBP-3 levels in addition to microcephaly. The role of post receptor defects in IGF-1 signaling on the deficit of growth is still unclear. **Objective:** To assess IGF-1 action and signaling *in vitro* in fibroblasts from SGA children. **Methods:** Fibroblasts cell cultures were developed from 2 controls (C1 and C2) and 4 patients with pre- and post-natal growth retardation (SGA1, SGA2, SGA3 and SGA4). IGF-1 insensitivity was demonstrated by severe pre and postnatal growth impairment without any evident cause, IGF1 SDS > 0 and poor growth response during high doses of hGH treatment. Three SGA patients presented microcephaly. Defects in the gene of the *IGF1* and *IGF1R* were excluded by direct sequencing. One patient (SGA1) presents the Silver-Russell syndrome (SRS) with loss of methylation of the paternal allele in the ICR1 (imprinting center region 1) chromosome 11p15, important for IGF-2 expression. IGF-1 action was assessed by cell proliferation by colorimetric assay. IGF-1 signaling was assessed by AKT and ERK phosphorylation after IGF-1 stimulation through SDS-PAGE of intracellular extract followed by immunoblotting with specific antibodies. The expression of IGF1R and IGFBP3 gene was determined by Real-time quantitative PCR and the levels of the IGF-1R and IGBP-3 protein by direct immunoblotting. **Results:** The SGA1, SGA2 and SGA3 cell lines proliferated 31%, 60% and 78% less under IGF-1 stimulation in comparison of controls fibroblasts, respectively. The expression of *IGF1R* mRNA and the level of total amount of IGF-1R protein were similar in all SGA and control cell lines. Despite normal IGF-1R structure and quantity, the same 3 SGA cell lines that presented low proliferation response also had 50 to 85% lower ERK phosphorylation after IGF-1 treatment ($p < 0.001$), although the similar total content of ERK1/2. In relation to PI3K pathway activation, all SGA cell cultures presented normal AKT phosphorilation. Fibroblasts from the SGA1 patient presented a 14x increase in *IGFBP3* mRNA and 2x more IGFBP-3 secretion to culture serum medium. Treatment with desIGF-1, an IGF-1 analogue with low affinity for IGFBPs although retains its ability to activate the IGF-1R, did not recover cell proliferation or ERK phosphorylation. All cell lines presented similar amount of GRB10 protein **Conclusion:** Three of 4 SGA patients showed evidence of post-receptor IGF-1 insensitivity. The cell line SGA1, obtained from a SRS patient with ICR1 hypomethylation, showed increased expression and secretion of IGFBP-3, which was not directly responsible for inhibition in IGF-1 action. Further studies should be developed to identify the molecular cause of IGF-1 post-receptor insensitivity observed in our patients.

Descriptors: 1. Insulin-Like Growth Factor I 2. Insulin-Like Growth Factor II
3. Receptor, IGF Type 1 4. Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 3
5. Fetal Growth Retardation 6. Growth Disorders 7. Failure to Thrive

---

---

1 Introdução

O termo PIG (pequeno para a idade gestacional) denomina neonatos que nasceram com peso e/ou comprimento dois desvios padrão (DP) abaixo da média para a idade e sexo de uma determinada população (2). O termo PIG refere-se exclusivamente ao tamanho no nascimento enquanto que o termo retardo de crescimento intra-uterino (RCIU) refere-se à diminuição no crescimento e desenvolvimento fetal. Esse crescimento atenuado na maioria das vezes resulta no nascimento de uma criança PIG. A maioria das crianças nascidas PIG apresentam recuperação espontânea do crescimento na vida pós-natal, com normalização da sua estatura ao redor do segundo ano de vida, quer nascidas prematuras ou a termo (2). Entretanto, 10% a 15% de crianças nascidas PIG permanecem baixas, apresentando Z da altura inferior a -2DP (2, 3) e aproximadamente 20% das crianças com baixa estatura apresentaram RCIU (3). Indivíduos nascidos PIG, além da baixa estatura durante a infância resultando em adultos baixos, apresentam maior risco de mortalidade perinatal e anormalidades metabólicas na vida adulta, como obesidade, hipertensão arterial, hipercolesterolemia, doenças cardiovasculares, intolerância à glicose e diabetes mellítus tipo 2 (4, 5). As causas desse déficit de crescimento pré-natal e a sua manutenção após o nascimento ainda não são completamente conhecidas.

A fisiologia do crescimento pré-natal difere consideravelmente do crescimento pós-natal, sendo que no período pré-natal ocorre uma complexa

interação de 3 sistemas distintos: mãe, placenta e feto. O crescimento e diferenciação observados no conceito pré-implantação e no período embrionário inicial é relativamente independente dos fatores ambientais (ou seja, da mãe e da placenta), dependendo principalmente de fatores genéticos inerentes ao próprio embrião (6). Em contraste, no último trimestre de gestação, quando a maior parte da organogênese já se completou, o feto experimenta um crescimento mais acelerado, e o ambiente intra-uterino passa a ser de fundamental importância para o crescimento e desenvolvimento normal (6). A habilidade da unidade útero placentária em fornecer adequada quantidade de substratos (principalmente glicose, aminoácidos, lactato/corpos cetônicos e oxigênio) é determinante para que o feto expresse o seu potencial genético de crescimento. Durante todas as fases de crescimento fetal, o GH apresenta pequeno efeito sobre o crescimento, sendo o sistema de fatores de crescimento insulino-símile (IGF-1 e IGF-2) determinantes para o crescimento fetal (6).

No período pós Natal, o IGF-1 (*insuline like growth factor 1*) e o IGF-1R (*insulin like growth factor one receptor*) ainda apresentam um papel fundamental na determinação do crescimento normal, estando o IGF-1 sob a regulação do hormônio de crescimento (GH).

1.1 Ações parácrinas e endócrinas dos fatores de crescimento insulino-símiles (IGFs)

Os IGFs compreendem uma família de peptídeos importantes no crescimento e desenvolvimento de mamíferos. Foram primeiramente postulados em 1957 por Salmon e Daughaday (7), ao observarem que o GH não exercia seu efeito diretamente no tecido, mas sim através de um fator intermediário, presente no soro, inicialmente chamado “fator de sulfatação”, e mais tarde, denominado somatomedina. Paralelamente, foram identificados fatores séricos que apresentavam estrutura semelhante à pro-insulina e que apresentavam efeitos insulino-símile. Subsequentemente foi mostrado que estes fatores estimulavam o crescimento e apresentavam propriedades mitogênicas, sendo denominados como IGFs. Finalmente em 1983 foi demonstrado que a somatomedina A e C possuíam a mesma sequência de aminoácidos que o IGF-2 e 1 respectivamente (8).

O IGF-1 e o IGF-2 apresentam uma expressão ubíqua nos tecidos humanos durante a vida pré e pós-natal, estando envolvidos em diversos mecanismos fisiológicos. As principais ações biológicas dos IGFs podem ser sumarizadas em: ações metabólicas insulina-símile, estímulo a proliferação e diferenciação celular, modulação da apoptose e da adesão celular (9).

O IGF-2 é expresso de forma constitutiva no início da gestação e possui um papel predominante no crescimento embrionário inicial, enquanto que os níveis de IGF-1 são baixos nessa fase. Quando a gestação está mais avançada e a função placentária passa a ser determinante para o

---

crescimento fetal, o IGF-1 assume o papel de principal regulador do crescimento (4). Os níveis de IGF-1 fetal são diretamente influenciados pelo estado nutricional do feto (10). Assim sendo, a regulação da secreção de IGF-1 e a regulação do crescimento são feitas pelo eixo glicose-insulina-IGF-1; a placenta transfere glicose para o feto, que estimula a secreção de insulina fetal, que por sua vez determina a secreção de IGF-1 (6).

Enquanto que no período pré-natal o hormônio de crescimento (GH) possui relativamente pouca influência no crescimento fetal, na vida pós-natal, o GH passa a ser o principal regulador da expressão de IGF-1, e o sistema GH/IGF-1 o principal determinante do crescimento linear. O fígado é o principal órgão responsável pela síntese de IGF-1 encontrado na circulação sanguínea, mas por meio da sua produção local nos diversos tecidos, o IGF-1 apresenta também ações autócrina, parácrina.

O IGF-1 presente na circulação e no fluido extracelular encontra-se ligado a uma família de proteínas transportadoras de alta afinidade, as IGFBPs (*IGF-binding proteins*). Atualmente, estão bem caracterizadas, do ponto de vista molecular e bioquímico, seis IGFBPs, denominadas IGFBP-1 a IGFBP-6. Todas possuem uma homologia significativa em sua sequência de nucleotídeos. As IGFBPs regulam a disponibilidade das IGFs para seus sítios de ação no receptor IGF-1R, além de possuírem funções independentes, modulando as diferentes ações das IGFs em nível autócrino, parácrino e endócrino (11). Em humanos, aproximadamente 80% do IGF-1 circulante está associado à IGFBP-3, na forma de um complexo ternário de 150 KDa, composto por uma molécula de IGF-1, uma molécula de IGFBP-3 e

uma molécula da subunidade ácido lábil (ALS). Aproximadamente 20% encontram-se ligados a outras IGFBPs e menos de 5% é encontrada na forma livre (12). O IGF-1 presente no complexo ternário (IGF-1/IGFBP-3/ALS) é incapaz de passar para o compartimento extravascular, e desta forma, exercer a sua ação nos tecidos alvos. Por este mecanismo, o complexo ternário prolonga a meia vida do IGF-1 circulante livre de 6 horas para 20 horas e modula a sua atividade biológica (12).

A ação endócrina e parácrina do IGF-1 sobre o crescimento é alvo de discussão. Por muitos anos acreditou-se que o GH regulava o crescimento por estimular a síntese de IGF-1 hepático e este, por sua vez, atuando na cartilagem de crescimento, promovia o crescimento linear em um típico sistema endócrino. Em 1999 um estudo modificou este paradigma ao demonstrar que camundongos com expressão do *Igf1* silenciada apenas no fígado (nocaute tecido específico) apresentavam crescimento normal a despeito de uma redução em 75% nos níveis séricos de IGF-1. (12). O crescimento praticamente normal destes animais era garantido apenas pelo IGF-1 produzido localmente, estimulado pela secreção aumentada de GH. Este primeiro estudo colocou em dúvida a importância do IGF-1 produzido no fígado e demonstrou que o IGF-1 produzido localmente e agindo de maneira parácrina e autócrina, eram suficientes para garantir o crescimento normal. Pesquisas subsequentes mostraram que animais com nocaute combinado do *Igf1* e da subunidade ácido lábil (ALS) hepáticos, ocasionando uma redução de 90% nos níveis séricos de IGF-1, apresentavam um prejuízo significativo no crescimento pós-natal (12). Este dado sugere que uma redução nos níveis circulantes de IGF-1, abaixo de certo limite, tem um

impacto sobre o crescimento. Recentemente, um estudo analisou o impacto do nocaute tecido específico das *Stat5a* e *Stat5b* em camundongos. Estes animais apresentavam a principal via de sinalização do GH, responsável pela síntese de IGF-1, bloqueada seletivamente no fígado ou no músculo esquelético. Os animais sem a Stat5 hepática apresentavam níveis de IGF-1 séricos diminuídos, mas o crescimento era indistinguível dos animais controles. Por outro lado, os animais sem a Stat5 no tecido muscular, apresentavam um crescimento significativamente menor ao de animais controles, apesar de níveis séricos de IGF-1 estarem apenas modestamente reduzidos (13). Estes resultados fortalecem a idéia de que o IGF-1 produzido localmente sob estímulo do GH, provavelmente em tecido muscular, seja o fator principal para determinar o crescimento linear pós-natal.

1.2 Mecanismos de ação das IGFs e seus receptores

Os IGFs exercem suas ações pela interação com 2 tipos diferentes de receptores, denominados IGFR tipo 1 e 2 (IGF-1R e IGF-2R). A grande maioria das ações conhecidas do IGF-1 e 2 é mediada via IGF-1R (9, 14).

O receptor do tipo 2 (IGF-2R) não apresenta homologia com os IGF-1R ou IR. Trata-se de uma proteína monomérica com um grande domínio extracelular, sem atividade tirosino quinase e que contém sítios de ligação para IGF-2 e para manose-6-fosfato. Os mecanismos de sinalização deste receptor ainda não foram elucidados (14).

Já o IGF-1R humano é codificado por um único gene (Genebank, NM_147370), com 100kb, organizados em 21 exons localizado no cromossomo 15q25-26. O IGF-1R apresenta estrutura semelhante ao receptor de insulina (*insulin receptor* - IR) com quase 50% de homologia na sequência de aminoácidos, sendo membro da família de receptores de membrana com atividade tirosino quinase (9, 14). Apesar das similaridades estruturais, esses dois receptores diferem quanto à afinidade pelo ligante, distribuição nos tecidos e funções biológicas (15). O IGF-1R apresenta uma afinidade maior ao IGF-1, seguido pelo IGF-2 e insulina; enquanto o IR apresenta afinidade maior à insulina, seguido pelo IGF-2 e IGF-1 (15).

1.3 Via de sinalização do IGF-1R

O IGF1R está presente na superfície celular como uma glicoproteína transmembrânica heterotetramérica, composto por dois monômeros idênticos de IGF-1R, cada um contendo uma subunidade α e uma subunidade β , conectadas por pontes dissulfídicas (Figura 1). As subunidades α são extracelulares e contêm o domínio de ligação ao hormônio. Já as subunidades β são transmembrânicas e intracelulares e contêm os domínios tirosino quinases responsáveis pela ativação de diversas vias de sinalização que caracterizam a sua ação (16)

A ligação do IGF-1 à subunidade α do seu receptor promove a ativação da sua propriedade tirosino quinase intrínseca, resultando na fosforilação em

sítios de tirosina (pY) na porção intracelular da subunidade β . Estas pY atuam como sítios acopladores (*docking sites*) para diversas proteínas intracitoplasmáticas que contêm domínios de reconhecimento conhecidos como domínios SH2 (Figura 1).

Figura 1: Vias de sinalização para IGF-1 e insulina (1)

Duas principais vias de sinalização são ativadas pela fosforilação em tirosina do IGF-1R, a via *Phosphatidylinositol 3-kinase* (PI3K), responsável principalmente pelas ações insulino-símiles dos IGFs e via MAPK, principal modulador dos efeitos proliferativos dos IGFs.

Uma importante proteína recrutada e ativada pelo IGF-1R é o IRS-1 (substrato 1 do receptor de insulina), uma fosfoproteína hidrofílica que pode recrutar e regular a atividade de outras proteínas intracelulares. O IRS-1 funciona como uma molécula adaptadora ativando a cascata de sinalização da via PI3K. A proteína PI3K é composta por 2 subunidades: a p110 considerada como a subunidade catalítica e a p85 que inibe a atividade catalítica da subunidade p110 e contém dois domínios SH2 que permitem a ligação desta proteína ao IRS-1. A ligação entre a IRS-1 com a subunidade p85 libera a subunidade p110 para exercer sua atividade catalítica de converter fosfolípedes de membrana, como 3,4 inositol fosfato, para inositol trifosfato e outras moléculas lipídicas sinalizadoras. Esses lipídios se combinam com fosfoinositídeo dependente de quinase para ativar AKT (serina/treonina kinase). AKT, por sua vez, promove síntese de glicogênio e captação de glicose via GLUT4, efeito semelhante ao da insulina (1)

Outra via de sinalização do IGF-1R ocorre por ativação do complexo RAS-MAPK (14). Proteínas como a Shc e Grb2 (*Growth Factor Receptor-Bound Protein 2*) são recrutadas pelo IGF-1R ativado. A Grb2 está associada à SOS1, proteína que catalisa a conversão de RAS inativo (associado à guanosina difosfato, RAS-GDP) para RAS ativo (associado à guanosina trifosfato RAS-GTP). Uma vez ativado, o RAS ativa RAF, que por sua vez, ativa MEK e que, por fim, ativam quinases extracelulares sinalizadoras conhecidas como ERK1/2. Estas últimas proteínas atuam como fatores de transcrição e promovem atividades mitóticas e inibição da apoptose (1, 14)

1.4 Modelos animais de retardo de crescimento intra-uterino (RCIU)

Os modelos animais mostram a importância das ações do IGF-1 no crescimento intrauterino (Tabela 1). Tanto o *nocaute* em homozigose para *Igf1* como para *Igf2* determinaram um importante retardo de crescimento intra-uterino (redução de 40% do peso em relação ao controle), mostrando a importância destes dois hormônios no crescimento fetal (17, 18). O nocaute duplo do *Igf1+Igf2* ocasionou déficit de crescimento mais grave e semelhante ao nocaute em homozigose do *Igf1r* (redução de 70% do peso no nascimento). Porém, os animais nocautes homozigotos para o *Igf1r* morreram alguns minutos após o nascimento por insuficiência respiratória. Por sua vez, os animais nocautes heterozigotos para o *Igf1r* são fenotipicamente normais no nascimento.

Já o *nocaute* do *Igf1* ou *Igf2*, associado ao nocaute do *Igf1r*, não se diferenciou do *nocaute* isolado *Igf1r*, sugerindo a ação predominante destes dois hormônios através do IGF-1R na determinação do crescimento fetal (17). Os animais apresentavam, além do RCIU, alta mortalidade peri-natal por problemas respiratórios e hipoplasia de diversos órgãos (SNC, pele, músculo e esqueleto).

Nocautes de outros hormônios e receptores (como insulina e GH) influíram de forma menos expressivas no desenvolvimento pré-natal (19). O *nocaute* do *Irs-1*, molécula que participa da transdução do sinal do IGF-1R e do IR, causou RCIU associado à resistência à insulina, mas com menor letalidade quando comparados aos *nocautes* do *Igf1/2* ou *Igf1r*. (20)

O *nocaute* em homozigose do *Akt*, importante proteína do metabolismo celular, apresentou uma pequena redução do tamanho, apenas 20% quando comparado com o controle (21). Já o *nocaute* em homozigose do *Erk* levou a uma redução de 14% em relação ao controle e, apesar dessa redução, ambos os animais nocautes de *Erk* e *Akt* não apresentaram aumento da letalidade e nem alterações no metabolismo de carboidratos (22). Apesar disso, apresentavam retardo no desenvolvimento de aprendizagem e motor. Podemos presumir assim, que defeitos pós-receptor podem influenciar o crescimento pré-natal, sem, no entanto, alterar a viabilidade do conceito.

Tabela 1: Fenótipo em relação ao crescimento pré-natal de diversos modelos animais com nocaute em diversos genes

Gene Deletado	% do peso no nascimento em relação ao controle	Referência
<i>Igf1</i>	60	(17, 18)
<i>Igf2</i>	60	(23)
<i>Igf1/Igf2</i>	30	(17)
<i>Igf-1R</i>	45	(17)
<i>Igf1/IGF-1R</i>	45	(17)
<i>Igf2/IGF-1R</i>	45	(17)
<i>Insulina</i>	78	(24),
<i>Ir</i>	78	(19; 25; 26)
<i>Irs-1</i>	40-60	(20; 26)
<i>Irs-2</i>	90	(27, 28)
<i>Akt1</i>	85-80	(21)
<i>Akt2</i>	87-85	(29)
<i>Erk</i>	86	(22)
<i>Ghr</i>	83	(30)
<i>Als</i>	90	(12)
<i>Stat5b</i>	73	(13, 31)
<i>Stat5a/b</i>	80-60	(31)

1.5 Defeitos no *IGF1* e *IGF1R* em humanos

Em humanos, a resistência aos IGFs tem sido proposta para explicar o fenótipo de pacientes com deleção parcial do cromossomo 15 (32), pigmeus (14), pacientes com Síndrome de Seckel (33) e crianças nascidas pequenas para a idade gestacional (14). Uma parcela das crianças com deficiência de crescimento de início pré-natal e manutenção na vida pós-natal apresenta deficiência isolada do IGF-1 ou resistência a este por mutações no seu receptor (34). Desde 1996, defeitos no gene *IGF1* e *IGF1R* são implicados na gênese da deficiência do crescimento de crianças nascidas *PIG*. Em 1996 Woods e colaboradores descreveram o primeiro paciente com defeito no gene *IGF1* que apresentava deleção em homozigose dos exons 4 e 5 deste gene (35). Mais recentemente, Walekamp (36) e colaboradores identificaram uma mutação *missense*, V44M, levando à formação de uma molécula biologicamente inativa. Esses pacientes apresentavam características comuns: baixo peso e comprimento no nascimento, baixa estatura importante na idade adulta, microcefalia, micrognatia, surdez neurossensorial e atraso de desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM). Laboratorialmente apresentavam valores normais ou elevados de GH basal e após estímulo; concentrações de IGF-1 indetectáveis (nos casos de mutações que causavam deficiência de IGF-1) ou elevados (no caso do paciente com IGF-1 biologicamente inativo) (36)

As primeiras mutações no gene *IGF1R* foram descritas em 2003 por Abuzzahab e colaboradores (34). Até o momento foram descritos 12 casos de indivíduos portadores de mutações no *IGF1R* em 5 famílias distintas (34, 36-38). Dentre os 12 casos, nove apresentavam mutações *missense*, sendo um paciente heterozigoto composto para 2 mutações. Os três restantes apresentavam mutações *nonsense*. Todos os pacientes apresentavam peso no nascimento abaixo do normal ou no limite inferior da normalidade ($Z = -3,5$ a $-1,5$), assim como o comprimento no nascimento ($Z = -5,8$ a $-0,34$). A estatura na infância e na idade adulta também apresentou uma grande variabilidade entre os diversos casos descritos ($Z = -5,7$ a $-1,6$) e alguns indivíduos afetados apresentavam altura no limite inferior da normalidade. Microcefalia foi descrita em 2 pacientes (16%) e 5 casos (42%) apresentaram leve atraso de DNPM ou diminuição do coeficiente de inteligência (QI). Ao contrário dos indivíduos com mutações no gene *IGF1*, o comprometimento no desenvolvimento neuropsicomotor é discreto, e não foi descrito surdez neurosensorial em nenhum dos pacientes com defeito no IGF-1R. Laboratorialmente, esses pacientes apresentam uma grande variabilidade nas concentrações de IGF-1, que variaram de valores normais a elevados ($Z = -1$ a $+2,9$), assim como os valores de IGFBP-3 ($Z = -1$ a $+1,8$) e o pico de GH após estímulo (5,7 a 74 ng/mL).

1.6 Defeitos epigenéticos do *IGF2*

A síndrome de Silver-Russel (SSR, OMIM: 180860) é um distúrbio clínico caracterizado por retardo de crescimento pré e pós-natal, dificuldade alimentar na infância, presença de clinodactilia, assimetria corporal e dismorfismo facial - face triangular, perímetro cefálico normal, fronte proeminente e micro/retrognatia - (39). A maioria dos casos de SSR é esporádica, no entanto, casos familiares com herança autossômica dominante, autossômica recessiva e hereditariedade ligada ao cromossoma X foram descritos (40).

Os primeiros defeitos moleculares relatados em pacientes com foi a dissomia uniparental materna do cromossomo 7 (mUPD7), identificado em 5% a 11% dos pacientes afetados (39, 41, 42). O déficit de crescimento pré e pós-natal observado nesses pacientes pode estar relacionado ao aumento de genes maternalmente expressos que apresentam efeitos negativos sobre o crescimento corporal, associado ou não a uma diminuição de genes paternalmente expressos envolvidos na promoção do crescimento.

Estudos genéticos em ratos demonstraram que a duplicação materna e deficiência paterna da região proximal do cromossomo 11 resultam em retardo do crescimento pré-natal, enquanto que a duplicação paterna e deficiência materna resultam em aumento do crescimento embrionário e placentário (43). Genes homólogos a essa região em humanos, como IGFBP3 e GRB10, estão localizados no cromossoma 11 e têm sido sugeridos como genes candidatos para SSR.

Um dos genes que possivelmente poderia ser responsável pelo retardo de crescimento de crianças com mUPD7 é o GRB10 (Growth factor receptor-bound protein 10) (39, 44). Esta proteína age como um regulador negativo da sinalização via IGF-1R (45, 46) e estudos sugerem que uma hiperexpressão de GRB10 estaria envolvido na causa da baixa estatura em uma parcela de pacientes com SSR (47, 48).

Já 2005, um novo mecanismo molecular causando SSR foi descrito em 43 a 64% dos casos: a perda da metilação do alelo paterno na região chamada *imprinting center region 1* (ICR1), localizada no cromossomo 11 (11p15) (41, 49, 50). Esta região controla a expressão do *IGF2* e do gene não codificante *H19*.

O IGF-2 tem um papel crítico durante o crescimento fetal e tem uma expressão predominantemente monoalélica pelo imprinting do alelo paterno e silenciamento do alelo materno, enquanto que o gene *H19* é expresso exclusivamente a partir do alelo materno não metilado (50) (Figura 2).

O *imprinting* genômico é o mecanismo de regulação da expressão gênica que permite apenas a expressão de um dos alelos parentais. Ao contrário da maioria dos genes em que a expressão é bialélica, os genes que estão submetidos a este mecanismo têm expressão monoalélica. Em um loci *imprinted*, apenas um alelo está ativo e o inativo está epigeneticamente marcado por modificação histônicas e/ou metilação das citosinas.

Figura 2: Papel da metilação da região ICR1 na regulação da expressão do *IGF2* e *H19*. Em indivíduos normais, o fator de ligação CTCF (*CCCTC-binding factor*) liga-se ao ICR1 não metilado presente no alelo materno, impedindo que potenciadores de transcrição do *IGF2* interajam com a região promotora e aumentem a sua expressão. Já no alelo paterno, a ligação do CTCF é inibida pela metilação do ICR1, o que permite a associação de potenciadores de transcrição com a região promotora do *IGF2*, aumentando sua expressão. Na SSR os pacientes apresentam uma hipometilação do ICR1, diminuindo a expressão do *IGF2* pelo alelo paterno.

Pacientes SSR apresentaram uma perda de metilação do ICR1, causando uma redução na expressão do IGF2 em diversos tecidos durante a vida pré-natal. Os níveis séricos de IGF-2 são normais, provavelmente refletindo a produção hepática de IGF-2, que apresenta um padrão bialélico.

de expressão (49). Recentemente, foi demonstrado que crianças com SSR e hipometilação do ICR1 apresentavam maiores níveis de IGF-1 e IGFBP-3 do que crianças com SSR, causadas por outros defeitos moleculares ou ainda crianças que nasceram pequenas para a idade gestacional sem SSR (41). A presença de níveis de IGF-1 e IGF-2 normais ou moderadamente elevados, com ausência de recuperação do crescimento na vida pós-natal em crianças com SSR com hipometilação do ICR1, sugere uma forma parcial de insensibilidade aos IGFs, explicando a falta de crescimento pré- e pós-natal. É importante uma melhor caracterização molecular desta insensibilidade hormonal nos pacientes com SSR, pois é possível uma melhor compreensão desta síndrome, além do desenvolvimento de tratamentos mais individualizados para este grupo de pacientes.

1.7 Justificativa para o estudo *in vitro* da sensibilidade ao IGF-1

Análises *in vitro* da insensibilidade ao IGF-1 de crianças PIG apenas foram desenvolvidos para estudos funcionais de mutações encontradas no *IGF1* ou no seu receptor. Ainda assim existe uma grande parcela de crianças nascidas PIG sem recuperação estatural, com níveis de IGF-1 normais a elevados e que não respondem adequadamente ao tratamento com rhGH mas que não apresentam mutações no gene do *IGF1* ou *IGF1R*. O mesmo padrão laboratorial sugestivo de insensibilidade ao IGF-1 é observado em

---

crianças com síndrome de Silver-Russell com hipometilação do ICR1. Os mecanismos moleculares de resistência aos IGFs nestes dois grupos de pacientes ainda não foram caracterizados. O aumento do IGFBP-3 em pacientes com SSR sugere que este peptídeo pode estar envolvido na etiologia da insensibilidade aos IGFs. Também é possível que essa resistência hormonal seja causada por alterações na via de sinalização do IGF-1 e, por este motivo, estudos da transdução do sinal devem ser desenvolvidos para melhor caracterizar a insensibilidade ao IGF-1.

---

2 *Objetivo*

Analisar, *in vitro*, a sensibilidade ao IGF-1 de fibroblastos de crianças nascidas pequenas para a idade gestacional e que não apresentaram recuperação espontânea do crescimento na vida pós-natal, suspeitas de apresentarem resistência ao IGF-1.

---

3 *Métodos*

3.1 Considerações éticas

Este estudo foi conduzido de acordo com princípios éticos, seguindo as orientações contidas na declaração de Helsinki. Consentimentos, por escrito, foram obtidos de todos os pacientes ou de pais/tutores antes que os procedimentos de pesquisas fossem iniciados. O protocolo de estudo foi submetido e aprovado ao comitê de ética da instituição.

3.2 Casuística

Quatro crianças nascidas PIG que foram submetidas à investigação clínica e laboratorial, conforme protocolos de investigação de baixa estatura da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento do Hospital das Clínicas da FMUSP foram selecionadas para o estudo por apresentarem indícios de resistência ao IGF-1. Foram utilizados os seguintes critérios de seleção:

- Inclusão:

1. Apresentar peso e/ou comprimento ao nascimento de 2 desvios-padrão (DP) abaixo da média para idade gestacional e sexo ($Z \leq 2$) (51) e/ou comprovação ultrassonográfica, durante a gestação, de retardo de crescimento intrauterino.
2. Ausência de recuperação espontânea do crescimento após o nascimento, comprovado por Z da altura < -2 , em idade superior ou igual a 2 anos de idade (52).
3. Ausência de recuperação de altura durante tratamento com hGH em doses supra fisiológicas (50 a 100µg/kg/dia ou 0,15 a 0,3 U/kg/dia).
4. Valores de IGF-1 normais ou elevados para a idade e sexo.
5. Ausência de mutações nos genes do IGF1(53), IGF1R e do receptor de GH (GHR), afastados em estudos paralelos.

- Exclusão:

1. Causas materno-placentárias de retardo de crescimento intrauterino como: hipertensão arterial, diabetes, descolamento prematuro de placenta, tabagismo e TORSCH (toxoplasma, vírus da rubéola, citomegalovírus e herpes vírus).
  2. Causas conhecidas de baixa estatura após o nascimento, como presença de distúrbios genéticos e cromossômicos (exceto a síndrome de Siver-Russell), desnutrição, doenças hepáticas, patologias sistêmicas, ósseas ou endocrinológicas.
-

Usando estes critérios, foram selecionados 4 pacientes do nosso ambulatório que apresentavam maiores indícios clínicos e laboratoriais de insensibilidade ao IGF-1. Os quatro pacientes não apresentavam defeitos moleculares no IGF-1, IGF-1R e GHR. Um dos pacientes foi diagnosticado como portador da síndrome de Silver-Russell e o restante dos pacientes, como não portadores de nenhuma síndrome conhecida. As linhagens de fibroblastos oriundas de cada paciente foram nomeadas SGA1 a SGA4 (ver “Descrição dos pacientes selecionados”).

Utilizamos como controle duas linhagens de fibroblastos de indivíduos nascidos adequados para idade gestacional e com altura e peso normais para a idade e sexo. Uma das linhagens foi estabelecida de uma criança com 12 anos, pré-púbere (Controle 1 – C1), e a outra estabelecida de um adulto jovem, com 30 anos (Controle 2 – C2). Ambas as linhagens apresentaram comportamento semelhante durante o estudo.

3.3 Descrição dos pacientes selecionados

SGA1 - V.Y.N.

Paciente do sexo masculino, filho de pais orientais, não consanguíneos. Pai com 163cm e mãe com 150cm, resultando em altura alvo de 163cm ($Z = -1,8$). Criança nascida prematura de parto cesariana, na 35ª semana de gestação devido ao RCIU documentado a partir do 2º semestre de gestação,

---

de causa não esclarecida. No nascimento apresentou APGAR 5 e 8 no 1º e 5º minutos, respectivamente; seu peso foi de 1.370g ($Z = -3,1$), comprimento 35,5cm ($Z = -5,9$) - (Tabela 2). O paciente apresentou desenvolvimento neuropsicomotor (DNPM) adequado: firmou a cabeça com 3 meses, sentou com apoio com 6 meses, falou com 1 ano, andou aos 2 anos e apresenta adequado desempenho escolar. O paciente foi avaliado em nosso serviço, pela primeira vez, aos 6 anos e 11 meses, com 92cm de altura ($Z = -5,1$) e 10,1g de peso (Z do IMC = $-4,8$) - (Anexo A e Tabela 2). Durante o exame físico foram observados alguns estigmas: microcefalia, fácies triangular, hipotelorismo, encurtamento do 5º dedo da mão bilateral, pés com sindactilia em dedos e discreta assimetria corporal, compatível com síndrome de Silver-Russell (SSR). Exames laboratoriais de rotina foram normais, e a deficiência de GH foi afastada por pico de GH após estímulo com clonidina de 31,9 ng/mL. Foi observado, antes de iniciar-se o tratamento com hGH, concentrações de IGF-1 de 324ng/mL ($Z = +1,9$) e de IGFBP3 de 4,9 ng/mL ($Z = +1,2$) - (Tabela 2). Foram descartadas alterações cromossômicas por estudo de cariótipo, assim como mutações nos genes do *GHR*, *IGF1* e *IGF1R* por sequenciamento direto destes genes. Iniciou-se tratamento com hGH com doses supra fisiológicas aos 7 anos e 4 meses (0,2 a 0,3 U/kg/dia ou 67 a 100µg/kg/dia), com recuperação parcial do déficit de altura (Anexo A). Durante o tratamento o paciente manteve níveis elevados de IGF-1 e IGFBP-3 (Z de IGF-1 de +3 e de IGFBP-3 de +2). Aos 11 anos iniciou a puberdade espontaneamente, e, devido a previsão de altura desfavorável, foi iniciado bloqueio da puberdade com análogo do

GnRH (aGnRH). O tratamento continua em andamento (Anexo A). Estudos realizados em paralelo demonstrou que este pacientes apresentava uma hipometilação da região ICR1 do cromossomo 11 (11p15), confirmando o diagnóstico molecular de SSR (50). Estudos correlacionando o fenótipo de pacientes com alterações semelhantes indicam a presença de insensibilidade ao IGF-1 por mecanismo ainda desconhecido (41). É sugerido que estes pacientes apresentam aumento da síntese de IGFBP-3, com possível efeito modulador negativo desta proteína carregadora sobre a ação do IGF-1.

SGA2 - J.G.S.

Criança do sexo feminino, filha de pais não consanguíneos, de altura normal; pai com 170cm e mãe com 162cm, resultando em altura alvo de 159,5cm ($Z = -0,45$). Possui um irmão com história de retardo de crescimento intra-uterino de grau menos grave e que também não apresentou recuperação espontânea do crescimento, mas teve boa resposta ao tratamento com hGH; e um outro irmão com crescimento normal pré e pós-natal. Paciente nascido pré-termo (6º mês de gestação), por parto cesariana, devido a evidências de retardo de crescimento intra-uterino e oligodrâmnio, com peso de 840g ($Z = -0,1$) e comprimento de 31,5cm ($Z = -2,1$) – (Tabela 2). Permaneceu internada por 3 meses na UTI neonatal devido imaturidade pulmonar. Apresentou DNPM normal, com sorriso social aos 4 meses, engatinhou com 8 meses, andou com 1 ano e 4 meses e primeiras palavras com 1 ano e

---

6 meses. Cursa escola normal com bom aproveitamento. A paciente foi avaliada pela primeira vez, em nosso serviço, aos 2 anos e 2 meses, com 65,5cm de altura ($Z = -6,2$) e 5,43g de peso ($Z \text{ IMC} = -2,4$) (Tabela 2). No exame físico a criança apresentava alguns estigmas: microcefalia, base alargada do nariz, palato ogival, hipoplasia de face, clinodactilia do 5º dedo de ambas as mãos e luxação congênita do quadril. Porém, avaliação da genética não enquadrou a criança em nenhuma síndrome conhecida. A criança apresentava exames gerais normais, cariótipo normal, valores de GH espontâneos entre 2,0 e 12,4 ng/mL, com concentração de IGF-1 e IGFBP-3 normais (IGF-1: 37 ng/mL, $Z = -0,8$; e IGFBP3: 1,4 ng/mL, $Z = -1,4$) – (Tabela 2). Foi descartada qualquer alteração nos genes do *GHR*, *IGF1* e *IGF1R*. Iniciou o tratamento com hGH com 2 anos e 4 meses (Anexo B), inicialmente na dose de 0,1 U/Kg/dia (ou 33 µg/kg/dia). Após o segundo ano de tratamento, devido a resultados insatisfatórios de velocidade de crescimento, foi aumentada a dose para 0,2 e 0,3 U/kg/dia (ou 67 a 100 µg/kg/dia). Durante o tratamento com hGH foram observados valores de Z do IGF-1 e IGFBP-3 entre +1 e +1,5, a despeito de velocidades de crescimento de 3 a 4 cm/ano. Iniciou a puberdade com 10 anos e 6 meses e, devido a gravidade da baixa estatura, foi optado por bloquear a puberdade com aGnRH. A paciente ainda se encontra em tratamento em nosso serviço (Anexo B).

SGA3 - L.D.

Filha única de pais não consanguíneos de altura normal, pai com 172cm e mãe com 166cm, resultando em altura alvo de 162,5cm ($Z = 0,0$). Criança nascida a termo (39 semanas), de parto cesárea, devido à apresentação pélvica com peso no nascimento de 1950g ($Z = -2,5$) e comprimento de 40cm ($Z = -4,8$) – (Tabela 2). Apresentou DNPM normal, andou com 1 ano e 2 meses, falou antes de 1 ano e apresenta bom aproveitamento escolar. Apresenta como estigmas: implantação irregular dos dentes, palato ogival, fronte olímpica, micrognatia, face triangular, retrognatia, microcefalia e luxação congênita do quadril (corrigida por cirurgia). A avaliação da genética não enquadrou a criança em nenhuma síndrome conhecida. Na primeira avaliação da criança em nosso serviço, a paciente tinha 2 anos e 8 meses, com 67,8cm de altura ($Z = -6,4$) e 5,7kg de peso ($Z \text{ IMC} = -3,8$) – (Tabela 2). Os exames realizados para a investigação laboratorial da baixa estatura, incluindo cariótipo, foram normais. Também foram descartadas mutações nos genes do *GHR*, *IGF1* e *IGF1R* por sequenciamento direto desses genes. A paciente apresentou pico de GH após hipoglicemia de 8,5ng/mL (Tabela 2). Não foram dosados IGF-1 e IGFBP-3 na investigação inicial. Afastado defeitos nos genes do *GHR*, *IGF-1* e *IGF1R*. Iniciou o tratamento com hGH (0,1 U/Kg/dia ou 33 µg/kg/dia) - (Anexo C). Durante o tratamento com hGH, foram observados valores de IGF-1 e IGFBP-3 acima da média ($Z = 0$ a $+1$) – (Tabela 2). Devido ao resultado insatisfatório do tratamento com hGH, a dose foi aumentada progressivamente até 0,3 U/kg/dia (100µg/kg/dia). A criança iniciou a puberdade com 12 anos e 8 meses e teve a

sua puberdade bloqueada por 3 anos (Anexo C). Após 14 anos de uso de hGH, o tratamento foi interrompido e a altura final, obtida aos 17 anos, foi de 129,8cm ($Z = -5,4$) - (Anexo C). A avaliação laboratorial, 1 ano após a suspensão do hGH, mostrou concentrações normais de IGF-1 (229 ng/mL, $Z = -0,7$) e IGFBP-3 (4,3 mg/L, $Z = -0,7$).

SGA4 - A.A.S.G.C.

Criança do sexo masculino, filho de pais não consanguíneos, ambos com baixa estatura e sem história de doenças pregressas; pai com 160cm e mãe com 138cm, resultando em altura alvo de 155,5cm ($Z = -2,9$). Tem dois meio-irmãos por parte de mãe, com altura normal. Criança nascida a termo (39 semanas), com peso de 2400g ($Z = -2,3$) e comprimento de 45cm ($Z = -3,3$) – (Tabela 2). Apresentou DNPM normal; está com aproveitamento escolar adequado. Apresenta alguns estigmas discretos que não caracterizam nenhuma síndrome conhecida: palato ogival, implantação baixa das orelhas e nevos pigmentados. O paciente foi avaliado inicialmente, em nosso serviço, com 7 anos e 8 meses e apresentava altura de 102cm ($Z = -4,5$) e 14,9 kg de peso (Z do IMC = $-1,2$) – (Tabela 2). Os exames laboratoriais de rotina, realizados para investigação da baixa estatura foram normais, assim como o cariótipo. O paciente apresentava níveis de GH espontâneos entre 2,7 a 7,1 ng/mL (mediana = 4,2 ng/mL) (Tabela 2). Na mesma época o paciente apresentava valores normais de IGF-1 (41 ng/mL, $Z = -1,7$) e IGFBP-3 (2,2 mg/L, $Z = -1,1$) – (Tabela 2). Foi descartada qualquer alteração nos genes do *GHR*, *IGF1* e *IGF1R*. O tratamento com hGH foi iniciado aos 9

---

anos e 5 meses na dose de 0,1 U/Kg/dia (ou 33 µg/kg/dia) (Anexo D). A velocidade de crescimento aumentou de 4,3 para 5,8 cm/ano no primeiro ano de tratamento. No segundo ano de tratamento devido à resposta insatisfatória do crescimento, a dose do hGH foi aumentada para 0,15 U/Kg/dia (ou 50 µg/kg/dia) e no terceiro ano de tratamento para 0,2 U/Kg/dia (ou 66 µg/kg/dia), sem melhora significativa do ritmo de crescimento (2º ano de tratamento VC = 4,8 cm/ano e 3º ano de tratamento VC = 4,5 cm/ano) – (Anexo D). Durante o tratamento com hGH o paciente manteve valores normais de IGF-1 ($Z = 0$ a $+0,8$) e IGFBP-3 ($Z = 0$ a $+1$), que associado à baixa resposta ao tratamento com hGH, sugeriu a presença de insensibilidade ao IGF-1. A criança iniciou a puberdade com 13 anos e 3 meses, e a mesma foi bloqueada com o uso de aGnRH por 2,6 anos (Anexo D). O tratamento com hGH foi interrompido após 8,4 anos de tratamento e a altura final do paciente é de 152,2cm com 18 anos de idade ($Z = -3,4$) – (Anexo D). A concentração de IGF-1 e IGFBP-3 do paciente, após 1 ano da suspensão do tratamento, foram 233 ng/mL ($Z = -1$) e 4,2 mg/L ($Z = -0,8$), respectivamente.

Tabela 2: Dados clínicos e laboratoriais dos pacientes selecionados

Paciente	Dados ao Nascimento				Dados na Infância					
	Sexo	IG (semanas)	Z do Peso	Z do Comprimento	Idade (anos)	Z da Altura	Z do peri. cefálico	Pico de GH (ng/mL)	Z do IGF1	Z do IGFBP-3
SGA 1	M	35	-3.1	-5.9	6.9	-5.1	-2.7	31.9	+1.9	+1.2
SGA 2	F	24	-0.1	-2.1	2.1	-6.2	-4.8	12.4*	-0.8	-1.4
SGA 3	F	39	-2.5	-4.8	2.8	-6.4	-3.1	8.5	+0.5 **	+1 **
SGA 4	M	39	-2.3	-3.3	7.6	-4.5	-1.3	7.1*	-1.7	-1.1

* - pico de GH espontâneo

** - após início do tratamento com IGF-1

3.4 Preparação das amostras

Escolhemos fibroblastos para os estudos *in vitro* em razão da facilidade de obtenção do tecido, por existir comprovação que estas células expressam receptores funcionais de IGF-1, além das proteínas necessárias para a transdução do sinal (54) e por estes modelos terem sido validados em trabalhos anteriores, como modelos *in vitro*, para determinar a sensibilidade de um organismo à ação do IGF-1 (14, 32-34).

Os fibroblastos foram obtidos por biópsia de pele (*punch* de 3 mm de diâmetro) da região do antebraço, realizada ambulatorialmente após assepsia e anestesia local. As idades dos pacientes no momento da biópsia eram 11,3 anos para SGA1; 9,3 anos para SGA2; 15,5 anos para SGA3 e 15,3 anos para SGA4.

O produto da biópsia de pele foi fragmentado em aproximadamente 12 diminutos fragmentos que foram transferidos para frascos apropriados para cultura celular de 25cm², contendo AmnioMax™-C100 Basal com 20% de AmnioMax™-C100 Supplement. Os frascos de cultura foram mantidos em estufa a 37°C com 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. Após 10 a 12 dias foi observado no microscópio de inversão os primeiros fibroblastos aderentes que emergiram do fragmento inicial (Figura 3A). Com a proliferação dos fibroblastos, os fragmentos iniciais foram retirados e os fibroblastos aderentes, tratados com tripsina e transferidos para frascos de 75cm², onde se expandiram até a confluência (Figura 3B). Após este período, os fibroblastos foram transferidos para criotubo e congelados em

nitrogênio líquido para estudos posteriores. Todo o estudo foi realizado com células entre a 4^o e a 13^o passagem. Para analisar a sensibilidade ao IGF-1 *in vitro*, utilizamos três abordagens que avaliam aspectos distintos da ação deste hormônio: proliferação celular, produção de IGFBP3 e ativação de proteínas da cascata da via de sinalização do IGF-1(55)

A- **B-**

Figura 3: Desenvolvimento das linhagens de fibroblastos. O fragmento de pele obtido por biópsia foi desfeito em fragmentos menores e então colocado em frascos próprios para cultura. Após aproximadamente 20 dias foi possível visualizar fibroblastos emergentes do fragmento inicial **(A)**. Quando chegaram à confluência **(B)** foram então transferidos para garrafas de cultura maiores (75cm²) para expansão da cultura e criopreservação em nitrogênio líquido

3.5 Avaliação do efeito proliferativo

A proliferação das células foi quantificada utilizando um ensaio baseado na capacidade de células viáveis em reduzir o sal de tetrazolium (amarelo) para formazan (azul). O CellTiter® é formado por uma combinação de compostos tetrazolium (MTS) e outro reagente de ligação de elétrons (PES). O PES aumenta a estabilidade química, formando uma solução estável, quando combinado com MTS. A redução do sal de tetrazolium é mediada por NADPH ou NADH, produzido pelas enzimas desidrogenases que refletem a atividade metabólica das células. Este método possuiu a sensibilidade e a acurácia necessária para avaliar a diferença de resposta proliferativa dos ensaios planejados, sendo este método comparável ou superior ao uso da incorporação de timidina marcada, com a vantagem de utilizar um método colorimétrico e não radioativo (56).

As células foram semeadas em uma densidade de 5×10^3 células por poço em uma placa de 96 poços e depois submetidas a tratamento com doses crescentes de IGF-1. Também foi usado meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 0.1% BSA (Bovine Serum Albumin) para controle negativo de proliferação e DMEN suplementado com soro fetal bovino (5-10%) para controle positivo de proliferação. Todos em um volume final de 100 μ l (Figura 4).

	1	2	3	4	5	6
	Fibroblastos do paciente A					
	IGF-I					
A						
B	SFM	10ng/ml	25ng/ml	50ng/ml	SFM	FCS 5%
C	SFM	10ng/ml	25ng/ml	50ng/ml	SFM	FCS 5%
D	SFM	10ng/ml	25ng/ml	50ng/ml	SFM	FCS 5%
	IGF-I			IGF-I		
E	10ng/ml	25ng/ml	50ng/ml	10ng/ml	25ng/ml	50ng/ml
F	10ng/ml	25ng/ml	50ng/ml	10ng/ml	25ng/ml	50ng/ml
G	10ng/ml	25ng/ml	50ng/ml	10ng/ml	25ng/ml	50ng/ml
H						

Figura 4: Esquema do ensaio de proliferação. Fibroblastos foram semeados em placa de 96 poços e um grupo de 3 poços foram usados para cada modalidade de tratamento: meio livre de hormônio (SFM, controle negativo de proliferação), meio suplementado com soro bovino fetal (FCS, controle positivo de proliferação) e doses crescentes de IGF-1

Após um período de 72 horas de tratamento, adicionou-se o sal metrazolium que foi reduzido para formazan através da atividade metabólica mitocondrial celular. Assim sendo, a redução do sal foi proporcional ao número de células presentes em cada poço. Depois foi realizada a leitura da placa em leitor de ELISA. Como controle de qualidade de cada experimento, analisamos apenas ensaios onde a diferença entre os valores obtidos nos dois controles negativos de proliferação (SFM) foi menor que 12% e foi observada proliferação acima 50% no estímulo com soro fetal bovino (FCS).

3.6 Avaliação da via de sinalização do IGF-1

Com o objetivo de analisar as duas vias principais de sinalização do IGF-1R, comparamos as culturas de fibroblastos dos pacientes selecionados com a de controles quanto à sua responsividade ao IGF-1 no que se refere à fosforilação de proteínas importantes e representativas das cascatas de sinalização da via PI3K (Akt1/2) e da via RAS-MAPK (Erk1/2).

As culturas de fibroblastos foram cultivadas em placas de seis poços e, após atingirem aproximadamente 80% de confluência, foram lavados com PBS e incubados por 24 horas com meio livre de hormônio. Após esse período, foram novamente lavadas com PBS e incubadas com SFM por mais 24 horas, totalizando um período de 48 horas de jejum, para redução máxima de suas atividades para níveis basais. Após o período de “jejum”, as células foram tratadas com IGF-1 (25ng/mL) por períodos de 20 e 60 minutos. Na sequência, as células foram lisadas para extração de proteínas intracelulares com solução de lise celular.

O extrato de proteínas obtidas de cada experimento foi submetido à SDS-PAGE e, na sequência, transferidos do gel para uma membrana de nitrocelulose, método denominado western blot. Posteriormente, a membrana, contendo as proteínas transferidas do gel, foi bloqueada com leite desnatado 10% por 1 hora e com BSA 3% por mais 1 hora para a redução de sinais inespecíficos. Depois de bloqueada, a membrana foi incubada overnight com o 1º anticorpo específico contra proteínas fosforiladas da cascata de sinalização do IGF-1; α pAKT1/2/3 (Ser473) ou

α p-ERK (Tyr202/Thr204) diluídos em BSA 1% em concentração 1:400. Após a incubação, a membrana foi lavada três vezes com PBS-T e incubada por mais uma hora com o 2º anticorpo anti-IgG de coelho ou camundongo (dependendo do 1º anticorpo), associado à peroxidase na concentração de 1:5000 diluído em PBS-T. O resultado foi detectado através do sistema de quimiluminescência ECL^{TM} western blotting e as imagens geradas, captadas pelo aparelho Storm860 e analisadas pelo programa ImageQuant 5.2.

Posteriormente, as membranas foram “stripadas”, ou seja, os anticorpos fosforilados foram retirados da membrana com solução própria. Para quantificação do conteúdo total das proteínas estudadas, uma segunda hibridização com anticorpos α AKT1/2 ou α ERK, que reconhecem as formas com ou sem fosforilação, foi realizada. Este resultado foi utilizado para equalizar os valores obtidos de fosforilação.

3.7 Estudo da expressão do RNAm do *IGF1R* e *IGFB3* por PCR em tempo real

Foi feita a extração do RNA total das células não estimuladas dos pacientes e controles pelo método do trizol.(57). O RNA extraído foi submetido a RT PCR (*reverse transcription step*), no qual o cDNA é transcrito através do uso de primers randômicos provenientes do kit *High Capacity cDNA Archive Kit*.

Posteriormente, o cDNA foi submetido à reações de RT-PCR em tempo real pelo método TaqMan®, utilizando-se ABI 7000 Sequence Detection Systems, para a avaliação do nível de expressão do RNA do gene do *IGF1R* e *IGBP3*. Os ensaios utilizados foram: IGF1R, Hs00181385_m1 e IGFBP3, Hs00181211_m1. Os primers utilizados para a PCR em tempo real estão localizados em dois diferentes exons de cada gene alvo para evitar amplificação por eventual contaminação por DNA genômico.

As reações foram preparadas em triplicada, em um volume final de 25µl, contando 12,5µl de Taqman® Universal mastermix 2X, 1,25µl de cada kit (primers e sonda) 20X, 3µl de cDNA (obtidos a partir de 150ng de RNA total) e H₂O MiliQ a completar. Como controle de qualidade das reações, o coeficiente de variação máximo permitido nas triplicatas foi de 2%. As condições de termociclagem compreendem uma incubação a 50°C por 2 minutos, seguida pela ativação da Taq Gold a 95°C por 15 segundos, intercalados com hibridação e extensão a 60°C por minuto.

A quantificação relativa do *IGF1R* e *IGFB3* foi realizada utilizando-se como calibrador RNA extraído de células controles. O cálculo da quantificação de forma a permitir uma comparação expressa em número de vezes em relação à expressão nas células controles foi realizada utilizando-se o método $2^{-\Delta\Delta CT}$, conforme descrito por Livak (58). ΔCT é a diferença de expressão entre o gene alvo e endógeno de uma determinada amostra e o $\Delta\Delta CT$ corresponde à diferença entre o ΔCT de cada amostra e o ΔCT do calibrador.

3.8 Avaliação do conteúdo de IGF-1R, IGBP-3 e GRB10 nas linhagens celulares

Para analisar o conteúdo total de IGF-1R, IGBP-3 e GRB10 em cada linhagem celular, as culturas de fibroblastos dos pacientes e controles foram cultivadas em placas de seis poços e, após atingirem a confluência, foram lavados com PBS e incubados por 18 horas, com meio livre de hormônio. Na sequência, as células foram novamente lisadas para extração das proteínas celulares totais. O extrato de proteína total foi submetido à SDS-PAGE e, na sequência, western blot. Após o bloqueio da membrana, realizamos uma primeira incubação com anticorpo específico para IGBP-3, GRB10 e subunidade beta do IGF1R. Na sequência, a membrana foi novamente incubada com anticorpo β tubulina para normalização da quantidade de proteína aplicada no gel (59).

3.9 Avaliação da produção de IGFBP-3

Fibroblastos de pacientes PIG e controles foram semeados em placas de 6 poços. Quando chegaram à confluência foram lavados com tampão fosfato/salina e incubados em meio livre de hormônio por 36 horas. Após esse período, o meio de cultura foi coletado para a análise do conteúdo de IGFBP-3 secretado por cada linhagem celular por SDS-PAGE / Western blot.

A concentração de proteína total presente no meio de cultura foi determinado através do Kit micro lowry (Sigma). Os volumes utilizados de cada amostra foram equalizados para uma mesma quantidade de proteína total. O meio de cultura foi concentrado através do uso de filtros (Ultracel YM-30), no qual só eram mantidas proteínas acima de 30KDa e as demais eram desprezadas. Na sequência, o meio de cultura concentrado foi analisado por SDS-PAGE, seguido de transferência para uma membrana de PVDF. As membranas foram então submetidas à reação imunológica com anticorpos específicos (α IGFBP-3) e detectados usando o sistema de quimiluminescência ECL^{TM} (Western Blotting Detection Reagent - Amersham Life Science). As imagens geradas pelas membranas foram captadas pelo aparelho Storm860 e analisadas pelo programa ImageQuant 5.2. Cada experimento foi realizado em triplicata.

3.10 Análises estatísticas

A comparação dos resultados entre as diversas linhagens celulares foi realizada pelo testes t de Student ou Mann–Whitney para grupos com distribuição normal e grupos com distribuição não-normal, respectivamente. Para toda análise estatística foram considerados como estatisticamente significante valores de $p < 0,05$.

---

4 Resultados

4.1 Avaliação do efeito proliferativo

Nas linhagens de fibroblastos controles, o tratamento com IGF-1 foi capaz de estimular proliferação celular de forma semelhante entre os dois controles (Figura 5 e Tabela 3). Houve uma tendência de maior proliferação em doses maiores, sendo que o IGF-1 promoveu em média um incremento da proliferação de 57% em relação às mantidas em meio de cultura livre de hormônio (células não tratadas) em todas as doses. A proliferação induzida pelo IGF-1 foi aproximadamente 43% menor do que o observado quando as células foram tratadas com soro fetal bovino a 5-10%.

Foi observado que as linhagens SGA1, SGA2 e SGA3 apresentaram proliferação significativamente menor em relação às duas linhagens controles em todas as concentrações de IGF-1 utilizadas (Tabela 3). Em relação à proliferação obtida por fibroblastos controles (C1 e C2), as linhagens SGA1, SGA2 e SGA3 proliferaram respectivamente 31%, 60% e 78% a menos sob estímulo de IGF-1. O aumento da concentração de IGF-1, em concentrações até cinco vezes maiores que a inicial, foi incapaz de corrigir o déficit proliferativo destas três linhagens de fibroblastos. Houve uma correlação direta entre o Z da altura na vida pós natal e a capacidade de proliferação *in vitro* dos fibroblastos estimulados com 10 ng/mL de IGF-1 ($r = 0,99$, $p = 0,008$). A linhagem SGA4 teve comportamento proliferativo semelhante ao dos controles frente ao estímulo

---

com IGF-1 e a linhagem SGA1 apresentou um comprometimento menos grave da proliferação induzida com IGF-1 em comparação as linhagens SGA2 e SGA3. Estes resultados indicam a presença de insensibilidade ao IGF-1 nas linhagens SGA1, SGA2 e SGA3.

Figura 5: Resposta proliferativa dos fibroblastos de pacientes nascidos PIG e controle frente ao estímulo com 10ng/mL de IGF-1 por 36 horas em relação às células não tratadas. Os resultados são expressos como média $\pm$ 1 erro padrão. * - $p < 0.05$ em relação ao controle

Tabela 3: Incremento percentual de proliferação em relação às células não tratadas das linhagens de fibroblastos de pacientes nascidos PIG e controles

	C1	C2	SGA1	SGA2	SGA3	SGA4
IGF-1 10 ng/mL	47 ± 3,7%	47 ± 10%	39 ± 6,2% *	16 ± 2,7%*	11 ± 0,5%**	44 ± 10%
IGF-1 25 ng/mL	55 ± 5,2%	65 ± 6,9%	41 ± 10%	21 ± 27%*	10 ± 2,4%**	43 ± 3,7%
IGF-1 50 ng/mL	55 ± 5,0%	70 ± 3,0%	33 ± 1,9%*	29 ± 2.6%**	16 ± 1,4%*	59 ± 29%

Os resultados são expressos como média ± erro padrão. * - p <0.05 e ** - p <0.01 em relação a C1 e C2

4.2 Avaliação da expressão e conteúdo de IGF-1R

Os pacientes selecionados não apresentavam mutações na região codificadora do *IGF1R*, porém defeitos na região promotora, alterações intrônicas ou pós-traducionais poderiam ser responsáveis por uma diminuição do IGF-1R expresso, causando resistência aos IGFs. Para investigar esta possibilidade, avaliamos a expressão de RNAm e o conteúdo total de proteínas do IGF-1R.

A expressão do RNAm do *IGF1R* foi semelhante em ambas as linhagens controles (C1 e C2). Não foi observada diferença significativa na expressão do *IGF1R* nas diversas linhagens SGAs em relação aos controles. A linhagem SGA1 apresentou uma expressão 1,87 vezes maior do que a linhagem C1, porém, este resultado não foi significativo ($p=0.07$) (Figura 6).

O conteúdo total de IGF-1R foi semelhante em ambas as linhagens controles (C1 e C2) e estas não diferiram em relação ao conteúdo de IGF-1R nas diversas linhagens SGAs (Figura 7). Estes resultados indicam que a insensibilidade ao IGF-1 das linhagens SGA1, SGA2 e SGA3 não está relacionada com alterações no receptor IGF-1R.

Figura 6: Análise da expressão do *IGF1R*. Os valores são expressos em quantidade de expressão relativa do *IGF1R* em relação ao observado nos fibroblastos C1 (média $\pm$ 1 erro padrão de três ensaios independentes)

Figura 7: Avaliação do conteúdo de IGF1-R nas linhagens celulares dos pacientes PIG e controles. A quantidade de proteína aplicada em cada amostra foi normalizada pelo sinal da β tubulina, uma proteína expressa constitutivamente

4.3 Avaliação da via de sinalização do IGF-1

4.3.1 Avaliação da via MAPK

O IGF-1 promoveu um aumento significativo na fosforilação do ERK1/2 em tirosina 202 e treonina 204 em fibroblastos controles com incremento de 76% de ativação em relação ao basal ($p = 0.005$). Observamos uma máxima ativação de ERK1/2 após 20 minutos de estímulo com IGF-1 e retornado a valores basais após 60 minutos do mesmo. Sendo assim, todos os experimentos foram realizados após 20 minutos de estímulo com 25ng/ml de IGF-1 (Figura 8).

Figura 8: Efeito da ação do IGF-1 em cultura de fibroblastos sobre a fosforilação de ERK1/2 (ty 202 e thr 204) nas linhagens SGAs e controles. Imunoblot de extrato de proteína intracelular total com anticorpo anti forma fosforilada de ERK1/2 e anti-ERK1/2 total com e sem estímulo com 25 ng/mL de IGF-1

As linhagens SGAs apresentaram menor fosforilação ERK1/2 basal e após estímulo com IGF-1, quando comparadas a linhagem C1 ($p < 0.001$) (Figura 9), apesar do conteúdo total de ERK1/2 ser semelhante em todas as linhagens estudadas. Os fibroblastos SGA1 e SGA2 foram as que apresentaram menor fosforilação de ERK1/2 após estímulo, obtendo valores máximos 80% inferiores ao observado na linhagem de fibroblastos C1, enquanto os SGA3 e SGA4 apresentaram redução de 39% (Figura 9). O tratamento dos fibroblastos das linhagens SGA1 e SGA2, com doses crescentes de IGF-1, não normalizou a intensidade de fosforilação de ERK1/2.

Figura 9: Fosforilação de ERK após estímulo com IGF-1 (25ng/mL) em cultura de fibroblastos (* - $p < 0.02$ em relação ao C1). Os valores são expressos com unidades arbitrárias de densidade óptica de pERK, corrigidos pelo conteúdo total de ERK (média $\pm$ 1 erro padrão de três ensaios independentes)

4.3.2 Avaliação da via PI3K

O IGF-1 promoveu um aumento significativo na fosforilação da AKT em treonina 204 nas linhagens de fibroblastos controles e dos pacientes Pigs (Figura 10).

Figura 10: Efeito da ação do IGF-1 em cultura de fibroblastos sobre a fosforilação de AKT (Ser473) nas linhagens SGAs e controles. Imunoblot de extrato de proteína intracelular com anticorpo anti forma fosforilada de AKT e anti-AKT total com e sem estímulo de IGF-1 (25 ng/mL)

As linhagens SGA1, SGA2, SGA3 e SGA4 não diferiram significativamente em relação aos fibroblastos controles (C1 e C2) quanto à ativação de AKT pelo IGF-1. (Figura 11). O conteúdo total de AKT foi semelhante em todas as linhagens estudadas.

Figura 11: Fosforilação de AKT após estímulo com IGF-1 (25ng/mL) em cultura de fibroblastos. Os valores são expressos com unidades arbitrárias de densidade óptica de pAKT, corrigidos pelo conteúdo total de AKT (média $\pm$ 1 erro padrão de três ensaios independentes)

4.4 Avaliação da expressão do IGFBP-3

O transporte do IGF-1 e IGF-2 na circulação são mediados principalmente via ligação com IGFBP-3 e ALS. As IGFBP-3 também atuam como um modulador da bioatividade dos IGFs e tem ações independentes sobre o crescimento e desenvolvimento. Estudos em modelos animais indicaram que a superexpressão de IGFBP-3 está associada com retardo do crescimento intrauterino e pós-natal apesar de níveis elevados de IGF-1 (60). Recentemente, o aumento da concentração sérica de IGFBP-3 foi sugerido

como provável causa do retardo de crescimento pós-natal em pacientes SSR (41). Por essa razão, estudamos a expressão do *IGBP3* nos pacientes selecionados e controles.

As linhagens celulares controles apresentaram uma expressão semelhante de *IGBP3*, enquanto observamos um aumento significativo ($p < 0.001$) na expressão do *IGBP3* nas linhagens celulares SGA1 (14x), SGA2 (5x) e SGA3 (4x) (Figura 12). A linhagem SGA1 apresentou uma hiperexpressão significativamente maior do que a observada nas linhagens SGA2 e SGA3. Apenas a linhagem celular SGA4 apresentou expressão semelhante às células controles.

Figura 12: Análise da expressão do *IGFBP3*. Os valores são expressos em quantidade de expressão relativa do *IGFBP3* em relação ao observado nos fibroblastos C1 (média $\pm$ 1 erro padrão de três ensaios independentes). A linha vermelha mostra a expressão relativa igual a 1. (* - $p < 0.001$ em relação aos controles)

4.5 Produção de IGFBP-3 para o meio de cultura

Com o objetivo de avaliar se o aumento de expressão do RNAm de *IGFBP3*, observado nas linhagens SGA1, resulta em um aumento na produção da proteína IGFBP-3, avaliamos a concentração de IGBP-3 no meio de cultura de fibroblastos sem estímulo. Usamos apenas as linhagens SGA1 e SGA4 por apresentarem, respectivamente, maior e menor expressão de *IGFBP3* nos estudos de real time.

As linhagens controles e a linhagem celular do paciente SGA4 apresentaram uma secreção de IGFBP-3 para o meio de cultura semelhante; porém observamos um aumento de 2 vezes na quantidade de IGBP-3 presente no meio de cultura da linhagem celular SGA1 (Figura 13 A e B).

Figura 13: Análise da quantidade de IGFBP-3 no meio de cultura. **A:** Foto representativa do imunoblot do meio de cultura de cada uma das linhagens. **B:** Gráfico representa os resultados de 3 ensaios independentes (Média $\pm$ 1 erro padrão). Os valores são dados em unidades arbitrárias de densitometria óptica (* - $p < 0.001$ em relação aos controles).

4.6 Proliferação e ativação da via MAPK por desIGF-1

Como observamos um aumento da expressão de *IGFBP3* nas linhagens SGA1, SGA2 e SGA3, assim como uma maior secreção desta proteína para o meio de cultura na linhagem SGA1, avaliamos a proliferação celular e a ativação da via MAPK após o estímulo destas linhagens de

fibroblastos com [Arg3]-IGF-I-des(1-3)IGF-I (ou desIGF-1), um análogo do IGF-1 com baixa afinidade por IGFBPs mas que preserva sua capacidade de ativar o receptor IGF-1R (61).

Nas linhagens controles o estímulo com desIGF-1 promoveu proliferação e indução de fosforilação de ERK semelhante a obtida com o IGF-1. Não houve melhora da proliferação ou da ativação da via MAPK com desIGF-1 na linhagem SGA1, indicando que o IGFBP-3 não seria o fator principal na insensibilidade ao IGF-1 destes fibroblastos.

Figura 14: Fosforilação de ERK1/2 após estímulo com IGF-1 ou desIGF-1 em cultura de fibroblastos. **A-** Foto representativa do imunoblot da fosforilação de ERK1/2 nas linhagens C2, SGA1 e SGA4. **B:** Gráfico representativo da fosforilação de ERK1/2 na linhagem SGA1. Os valores são expressos com unidades arbitrárias de densidade óptica de pERK1/2 corrigidos pelo conteúdo total de ERK1/2

4.7 Concentração de IGFBP-3 intracelular

Alguns estudos indicam que a IGBP-3 apresenta ações intracelulares e nucleares independentes das IGFs, induzindo apoptose de células pela sua capacidade de direcionar reguladores intracelulares da apoptose, incluindo fatores de transcrição nucleares (62-64). Considerando o aumento na expressão de IGBP-3 observado nas linhagens celulares SGA1, SGA2 e SGA3 e o aumento na concentração de IGBP-3 no meio de cultura secretado pela linhagem SGA1, analisamos se esse aumento protéico no meio de cultura também estava presente a nível intracelular.

A análise de extrato de proteínas intracelulares (Figura 15) não evidenciou aumento na concentração de IGBP-3 intracelular nas linhagens de fibroblastos de crianças nascidas PIG em relação às linhagens controles.

Figura 15: Avaliação do conteúdo de IGFBP-3 intracelular nas linhagens dos pacientes nascidos PIG e controles (foto representativa de 3 experimentos independentes). A quantidade de proteína aplicada em cada amostra foi normalizada pelo sinal da β tubulina, uma proteína expressa constitutivamente

4.8 Avaliação do conteúdo de GRB10

A dissomia uniparental materna do cromossomo 7 (mUPD7) foi descrita em 5% a 10% dos casos de retardo de crescimento intrauterino associados à SSR. (65, 66). O gene *GRB10*, que apresenta expressão exclusivamente materna, foi mapeado neste cromossomo e foi também observado duplicação do seu locus em alguns pacientes com SSR (47). Como o GRB10 apresenta um efeito inibitório nas vias de sinalização do IGF-1 e 2 (67), avaliamos a concentração de GRB10 nas linhagens celulares dos pacientes PIG e controles.

O conteúdo total de GRB10 foi semelhante em ambas as linhagens controles (C1 e C2) e nas diversas linhagens de pacientes nascidos PIG (Figura 16), mostrando que não há um aumento de GRB10 e esta não é a provável causa da resistência ao IGF-1 presente nesses pacientes.

Figura 16: Avaliação do conteúdo de GRB10 nas linhagens celulares dos pacientes PIG e controles (foto representativa de 3 experimentos independentes). A quantidade de proteína aplicada em cada amostra foi normalizada pelo sinal da β tubulina, uma proteína expressa constitutivamente.

---

5 Discussão

Devido ao papel crucial dos fatores de crescimento IGF-1 e IGF-2 no crescimento no crescimento pré e pós-natal, estas proteínas, assim como seu receptor (IGF-1R), foram estudadas como causa de retardo no crescimento intra-uterino, em crianças sem recuperação espontânea após o nascimento. Porém, defeitos no IGF-1R causando insensibilidade ao IGF-1, foram identificados em poucos pacientes, frequentemente associado com microcefalia e apresentando concentrações normais ou elevadas de IGF-1 e GH (34, 37, 38, 68).

Considerando a semelhança na estrutura e das vias de sinalização entre o IGF-1R e o receptor de insulina (IR), é possível fazer uma analogia entre as duas síndromes de resistência hormonal. A síndrome de resistência à insulina pode ser causada, raramente, por mutações inativadoras do IR, porém a vasta maioria de pacientes com resistência à insulina apresentam defeitos pós-receptor (69). Da mesma forma, podemos esperar que a síndrome de resistência aos IGFs possa ser causada, mais frequentemente, por defeitos nas vias de sinalização intracelular do IGF-1 do que por mutações no seu receptor.

Poucos trabalhos investigaram o papel da insensibilidade ao IGF-1 a nível pós-receptor, e estes estudos concentram-se na investigação da insensibilidade adquirida ao IGF-1, causada pela insuficiência renal crônica ou desnutrição (14). Defeitos congênitos na via de sinalização do IGF-1R e o

---

seu papel como responsável do déficit de crescimento pré e pós-natal apenas foram estudados em pigmeus (14) e pacientes com síndrome de Seckel (33). Leucócitos de pigmeus apresentam menor proliferação quando estimulados por IGF-1 e esta resistência hormonal foi associada com diminuição da quantidade de receptor na superfície celular (14). Já um estudo avaliando cultura de fibroblastos de um pacientes com síndrome de Seckel demonstrou a presença de insensibilidade ao IGF-1 com IGF-1R normal, porém com aumento de 6x na secreção de IGFBP-3 no meio de cultura. Os autores sugerem que este aumento de IGFBP-3 contribui com a resistência ao IGF-1 observada (33).

Em nosso estudo, a ação e sinalização do IGF-1 foram avaliadas em linhagens de células oriundas de pacientes com suspeita clínica de insensibilidade ao IGF-1. Os nossos pacientes apresentavam crescimento pré e pós-natal muito comprometido e resposta insatisfatória ao tratamento com hGH, a despeito de concentrações normais ou elevadas de IGF-1. Defeitos nos principais genes, associados ao eixo GH/IGF-1 (*GHR*, *IGF1* e *IGF1R*), foram previamente afastados por sequenciamento direto, tornando estes pacientes bons candidatos a apresentarem insensibilidade ao IGF-1 por defeitos nas vias de sinalização do IGF-1R. Adicionalmente, utilizamos abordagens distintas para analisar a sensibilidade ao IGF-1 *in vitro*: proliferação celular e fosforilação de proteínas da via de sinalização do IGF-1R.

Nossos resultados mostraram evidências de resistência ao IGF-1 em três das quatro linhagens de fibroblastos estudadas (SGA1, SGA2 e SGA3). Os fibroblastos destes pacientes apresentaram uma menor capacidade de

---

proliferação e de ativação da via MAPK, frente ao estímulo com IGF-1, quando comparado com células controles. A resistência ao IGF-1, apresentada por estes pacientes, não pode ser explicada pela presença de defeitos quantitativos ou qualitativos do IGF-1R, uma vez que foram descartadas mutações no seu gene e foi demonstrado expressão normal do RNAm, assim como do conteúdo total da proteína.

Observamos um aumento importante da expressão do *IGFBP3* na linhagem celular SGA1 de um paciente com SSR com hipometilação da região ICR1, resultando em um aumento da secreção deste peptídeo para o meio de cultura. Esse resultado está em concordância com dados observacionais que indicam uma maior concentração sérica de IGFBP-3 nestes pacientes (41). Também constatamos um aumento da expressão de *IGFBP3* nas linhagens SGA2 e SGA3, porém sem resultar em um aumento da quantidade de IGFBP-3 secretado no meio de cultura.

Recentemente estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que o IGFBP-3 possui um papel pró-apoptótico, podendo ser um efeito independente da ação das IGFs (70). Porém observamos nesses pacientes uma ativação normal da via PI3K sob estímulo com IGF-1, indicando adequada ativação do receptor. Da mesma forma, quando a linhagem SGA1 foi estimulada com desIGF-1, um análogo do IGF-1 que não se liga as IGFBPs, não houve melhora da proliferação ou fosforilação de ERK, sugerindo que o aumento da IGFBP-3 não é responsável diretamente por inibir a ação do IGF-1 em seu receptor nestas linhagens celulares.

O aumento da expressão de IGBP-3 em nossos pacientes PIGs estudados pode representar apenas um biomarcador da resistência aos IGFs. Estudos mostraram que há um aumento da expressão de IGFBP-3 *in vitro* quando fibroblastos são induzidos a senescência (processo natural de envelhecimento) (71). Defeitos na via de sinalização da MAPK poderiam estar associados a um processo acelerado de senescência com o consequente aumento de IGFBP-3.

Na literatura, existem evidências que um aumento da expressão de GRB10, uma proteína com atividade inibitória da via MAPK, poderia estar envolvida em uma insensibilidade pós-receptor ao IGF-1 (44), inclusive de pacientes com SSR (47). Avaliamos o conteúdo desta proteína no meio intracelular nas linhagens SGAs, porém não encontramos alteração, indicando que o GRB10 não participa do mecanismo de resistência ao IGF-1 observado em nossos pacientes.

O estudo atual não identificou a causa exata da resistência ao IGF-1 nas linhagens SGA1, SGA2 e SGA3, mas constitui uma etapa inicial importante na elucidação da deficiência do crescimento destas crianças, uma vez que caracterizou a presença de insensibilidade ao IGF-1 em nível pós-receptor. Diversos defeitos nesta via de sinalização podem ser postulados.

Mutações inativadoras de proteínas essenciais para a ativação da via MAPK poderiam levar a resistência ao IGF-1 como observada em nossos pacientes. Isso foi demonstrado em modelos animais onde o *nocaute* de *ERK* resulta em um importante retardo de crescimento intra-uterino (20, 22).

Também podem ser citadas as proteínas adaptadoras SHC, GRB2, SOS1 e SHP2, que medeiam as etapas iniciais da transdução sinal ao se ligar a múltiplas tirosina fosforiladas do receptor, desencadeando ativação da cascata RAS-MAPK (72).

Alterações na estrutura da membrana também podem interferir na via de sinalização do IGF-1. O sistema caveolar consiste em pequenas invaginações da membrana plasmática ricas em colesterol, glicoesfingolípídios e proteínas sinalizadoras, como as caveolinas. Foram identificados 3 membros dessa família (Cav1, Cav2 e Cav3), com expressões tecidos específicas e ações variadas, como tráfico de colesterol, ácidos graxos e triglicérides, controle da homeostase celular e transdução de sinal. Também foi demonstrado que o sistema caveolin age diretamente com o IGF-1R e seus substratos celulares. A *downregulation* de Cav-1 diminui a ativação do IGF-1R afetando sua capacidade de inibir a apoptose em células endoteliais de veias umbilicais humanas (73).

Também tem sido proposto que ao sistema integrinas e IGF-1R funcionam de forma cooperativa potencializando mudanças na estrutura celular associadas à proliferação, diferenciação e migração celular (74, 75). Outros estudos demonstram que a migração de células musculares em resposta ao estímulo ao IGF-1 eram dependente da ocupação de ligantes do sítio de $\alpha 5 \beta 3$ integrina como a vitronectina (76).

Por fim, podemos citar como uma provável causa de resistência aos IGFs o aumento na expressão de proteínas que apresentam atividade negativa sobre a transdução do sinal do IGF-1. Estudos mostraram que a

---

proteína SOCS-3, que age como regulador negativo na ativação de receptores de citocinas (via Jak/Stat), interage diretamente com o domínio citoplasmático de IGF-1R e IR ativados. Estudos sugerem que a proteína SOCS-3 seja um substrato direto do de outros receptores tirosina quinase (77).

Todos estes defeitos moleculares são baseados em modelos animais ou estudos experimentais da fisiologia da transdução do sinal via IGF-1R e merecem ser abordados em estudos futuros para a elucidação da causa da insensibilidade do IGF-1 pós-receptor em nossos pacientes.

---

6 *Conclusões*

Demonstramos a presença de insensibilidade pós-receptor ao IGF-1 em 3 das 4 linhagens de fibroblastos (SGA1, SGA2 e SGA3) obtidas de crianças com retardo do crescimento pré- e pós-natal, resposta inadequada ao tratamento com hormônio de crescimento e ausência de defeitos no IGF-1R. A insensibilidade ao IGF-1 foi resultante do comprometimento exclusivo da via MAPK, estando a via PI3K preservada.

A linhagem de fibroblastos obtida de um paciente com síndrome de Silver-Russell com hipometilação do ICR1 no cromossomo 11p15 (SGA1) apresenta aumento da expressão e secreção de IGFBP-3. O aumento do IGFBP-3 não atua diretamente causando inibição da ação do IGF-1, podendo representar um biomarcador da insensibilidade ao IGF-1 observada nesta linhagem.

A insensibilidade ao IGF-1 observada nas linhagens SGA1, SGA2 e SGA3 não está associada a alterações no conteúdo protéico de IGF-1R, GRB10, AKT e ERK1/2.

---

7 Anexos

Anexo A: Gráficos de crescimento (01) e IMC (02) do paciente SGA1**01- Gráfico de crescimento do paciente SGA1**

02- Gráfico de IMC do paciente SGA1

Anexo B: Gráficos de crescimento (01) e IMC (02) do paciente SGA2**01- Gráfico de crescimento do paciente SGA2**

02- Gráfico de IMC do paciente SGA2

Anexo C: Gráficos de crescimento (01) e IMC (02) do paciente SGA3**01- Gráfico de crescimento do paciente SGA3**

02- Gráfico de IMC do paciente SGA3

Anexo D: Gráficos de crescimento (01) e IMC (02) do paciente SGA4**01- Gráfico de crescimento do paciente SGA4**

02- Gráfico de IMC do paciente SGA4

Anexo E: Lista de reagentes e soluções utilizadas no estudo

1. Meio de cultura:

Aminomax T100 - Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA

AmnioMax^{TM}-C100 Supplement - Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA.

BSA (Bovine Serum Albumin)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) High Glucose 1X - 11965

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) Low Glucose 1X - 12320

2. Solução de lise celular:

EDTA 10mM: 1,25mL do 200mM

Trisma base 100mM: 2,5 do 1M

H₂O: completar para 25 mL

Fluoreto de Sódio 10mM: 0,105g

Pirofosfato de Na 100mM: 0,1125g

P40 (1X): 300µl

Deoxicholato de sódio 1% (0,250g)

10mg/mL de aprotina

1mg/mL leupeptina

1mg/mL pepstatina

PMSF (0,035g em 1mL de álcool etílico)

Ortovanato de Na: 250µl da solução 200mM

---

3. Acrilamida 30%

150g de acrilamida
4g de bis-acrilamida
500mL de água

4. Persulfato de amônio (APS)

250mg APS
2.5mL de água

5. SDS 10% (Lauryl sulphate)

10g de SDS
100mL água

6. Tampão de amostra: pH: 6.5

13.3% SDS
0.42M Tris-base
0.013% bromophenol blue¹⁵

7. Tampão de corrida 4X Ph: 8.3

200mM Tris-base – 24.25g
1.52M Glicina - 114g
EDTA 7.18mM – 2.6g
0.4% SDS - 4g
1L de água

---

8. Tampão de transferência

25mM Tris-base – 3.025g

192mM glicina – 14.41g

SDS 0.02% - 0.4g

800mL de água

20% metanol

9. PBS + 0.1% Tween: Ph:7.5

11.5g Na_2HPO_4 ou 14.2g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (80mM)

2.96g NaH_2PO_4 ou 2.75g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (20mM)

5.84g NaCl

1L de água

10. Solução para retitulação de anticorpos da membrana de nitrocelulose

Tris-HCL 10mM pH 7,5

Uréia 8M

β -mercaptoetanol 0,5M

Soro albumina bovina 1,5M

11. Anticorpos usados:

p-ERK1/2 (TyrThr 202/try204): Invitrogen – número de catálogo 36-8800

ERK1/2 total: Invitrogen – número de catálogo 13-6200

pAKT1/2 (Ser473): Santa Cruz – número de catálogo sc-7985-R

AKT1/2 total (H-136): Santa Cruz – número de catálogo sc-8312

IGF-1R (C-20) subunidade β : Santa Cruz - número de catálogo: sc-713

GRB10 (K-20): Santa Cruz – número de catálogo: sc-1026

IGFBP-3: Upstade – número de catálogo 06-108

β -tubulina III: Sigma – número de catálogo T 2200

12. IGF-1 recombinante:

IGF-1 recombinante humano: Chemicon – número de catálogo GF006

IGF-1 resistente a IGFBPs (desIGF-1): Millipore – número de catálogo 01-189

13. Kit de quimioluminescência

ECL^{TM} Western blotting :Amershan Pharmacia – número de catálogo RPN2132

14. Kit colorimétrico para proliferação

CellTiter 96® - Promega USA - número de catálogo E3030

15. Kit para obtenção de cDNA

High Capacity cDNA Archive Kit - Applied Biosystems - número de catálogo 432217

16. Kit Taqman®

IGF-1R - Hs00181385_m1

IGFBP3 - Hs00181211_m1

---

17. Kit para determinação de proteínas totais

Kit micro lowry – Sigma - número de catálogo TP0300

18. Kit para concentração de proteínas totais

Ultracel YM-30 – Millipore - número de catálogo 42409

---

8 Referências

---

1. Dupont J, LeRoith D 2001 Insulin and insulin-like growth factor I receptors: similarities and differences in signal transduction. *Horm Res* 55 Suppl 2:22-6
  2. Saenger P, Czernichow P, Hughes I, Reiter EO 2007 Small for gestational age: short stature and beyond. *Endocr Rev* 28:219-51
  3. Hokken-Koelega AC, De Ridder MA, Lemmen RJ, Den Hartog H, De Muinck Keizer-Schrama SM, Drop SL 1995 Children born small for gestational age: do they catch up? *Pediatr Res* 38:267-71
  4. Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A 1993 Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75:73-82.
  5. de Zegher F, Francois I, van Helvoirt M, Van den Berghe G 1997 Clinical review 89: Small as fetus and short as child: from endogenous to exogenous growth hormone. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82:2021-6.
  6. Gluckman PD, Harding JE 1997 Fetal growth retardation: underlying endocrine mechanisms and postnatal consequences. *Acta Paediatr Suppl* 422:69-72.
  7. Daughaday WH, Hall K, Raben MS, Salmon WD, Jr., van den Brande JL, van Wyk JJ 1972 Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature* 235:107
  8. Levine MA, Downs RW, Jr., Moses AM, Breslau NA, Marx SJ, Lasker RD, Rizzoli RE, Aurbach GD, Spiegel AM 1983 Resistance to multiple
-

- hormones in patients with pseudohypoparathyroidism. Association with deficient activity of guanine nucleotide regulatory protein. *Am J Med* 74:545-56
9. Laron Z 2001 Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Mol Pathol* 54:311-6
  10. Gluckman PD 1995 Clinical review 68: The endocrine regulation of fetal growth in late gestation: the role of insulin-like growth factors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 80:1047-50.
  11. Rosenzweig SA 2004 What's new in the IGF-binding proteins? *Growth Horm IGF Res* 14:329-36
  12. Yakar S, Rosen CJ, Beamer WG, Ackert-Bicknell CL, Wu Y, Liu JL, Ooi GT, Setser J, Frystyk J, Boisclair YR, LeRoith D 2002 Circulating levels of IGF-1 directly regulate bone growth and density. *J Clin Invest* 110:771-81.
  13. Udy GB, Towers RP, Snell RG, Wilkins RJ, Park SH, Ram PA, Waxman DJ, Davey HW 1997 *Requirement of STAT5b for sexual dimorphism of body growth rates and liver gene expression*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:7239-44
  14. Jain S, Golde DW, Bailey R, Geffner ME 1998 Insulin-like growth factor-I resistance. *Endocr Rev* 19:625-46
  15. Abbott AM, Bueno R, Pedrini MT, Murray JM, Smith RJ 1992 Insulin-like growth factor I receptor gene structure. *The Journal of biological chemistry* 267:10759-63
  16. Nakae J, Kido Y, Accili D 2001 Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. *Endocr Rev* 22:818-35
-

17. Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A 1993 Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell* 75:59-72.
  18. Butler AA, LeRoith D 2001 Minireview: tissue-specific versus generalized gene targeting of the igf1 and igf1r genes and their roles in insulin-like growth factor physiology. *Endocrinology* 142:1685-8
  19. Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, Asico LD, Jose PA, Taylor SI, Westphal H 1996 Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nature genetics* 12:106-9
  20. Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B, 3rd, Johnson RS, Kahn CR 1994 Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 372:186-90
  21. Chen WS, Xu PZ, Gottlob K, Chen ML, Sokol K, Shiyanova T, Roninson I, Weng W, Suzuki R, Tobe K, Kadowaki T, Hay N 2001 Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev* 15:2203-8
  22. Dufresne SD, Bjorbaek C, El-Haschimi K, Zhao Y, Aschenbach WG, Moller DE, Goodyear LJ 2001 Altered extracellular signal-regulated kinase signaling and glycogen metabolism in skeletal muscle from p90 ribosomal S6 kinase 2 knockout mice. *Mol Cell Biol* 21:81-7
  23. DeChiara TM, Efstratiadis A, Robertson EJ 1990 A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 345:78-80
  24. Duvillie B, Cordonnier N, Deltour L, Dandoy-Dron F, Itier JM, Monthieux E, Jami J, Joshi RL, Bucchini D 1997 *Phenotypic alterations in insulin-*
-

deficient mutant mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94:5137-40

25. Joshi RL, Lamothe B, Cordonnier N, Mesbah K, Monthieux E, Jami J, Bucchini D 1996 Targeted disruption of the insulin receptor gene in the mouse results in neonatal lethality. *Embo J* 15:1542-7
  26. Ueki K, Yamauchi T, Tamemoto H, Tobe K, Yamamoto-Honda R, Kaburagi Y, Akanuma Y, Yazaki Y, Aizawa S, Nagai R, Kadowaki T 2000 Restored insulin-sensitivity in IRS-1-deficient mice treated by adenovirus-mediated gene therapy. *J Clin Invest* 105:1437-45
  27. Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Eto K, Yamauchi T, Suzuki R, Tsubamoto Y, Komeda K, Nakano R, Miki H, Satoh S, Sekihara H, Sciacchitano S, Lesniak M, Aizawa S, Nagai R, Kimura S, Akanuma Y, Taylor SI, Kadowaki T 2000 Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes* 49:1880-9
  28. Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF 1998 Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391:900-4
  29. Garofalo RS, Orena SJ, Rafidi K, Torchia AJ, Stock JL, Hildebrandt AL, Coskran T, Black SC, Brees DJ, Wicks JR, McNeish JD, Coleman KG 2003 Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *J Clin Invest* 112:197-208
  30. Al-Regaiey KA, Masternak MM, Bonkowski M, Sun L, Bartke A 2005 Long-lived growth hormone receptor knockout mice: interaction of reduced insulin-like growth factor I/insulin signaling and caloric restriction. *Endocrinology* 146:851-60
-

-
31. Fain JN, Ihle JH, Bahouth SW 1999 Stimulation of lipolysis but not of leptin release by growth hormone is abolished in adipose tissue from Stat5a and b knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* 263:201-5
  32. Okubo Y, Siddle K, Firth H, O'Rahilly S, Wilson LC, Willatt L, Fukushima T, Takahashi S, Petry CJ, Saukkonen T, Stanhope R, Dunger DB 2003 Cell proliferation activities on skin fibroblasts from a short child with absence of one copy of the type 1 insulin-like growth factor receptor (IGF1R) gene and a tall child with three copies of the IGF1R gene. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88:5981-8
  33. Schmidt A, Chakravarty A, Brommer E, Fenne BD, Siebler T, De Meyts P, Kiess W 2002 Growth failure in a child showing characteristics of Seckel syndrome: possible effects of IGF-I and endogenous IGFBP-3. *Clin Endocrinol (Oxf)* 57:293-9
  34. Abuzzahab MJ, Schneider A, Goddard A, Grigorescu F, Lautier C, Keller E, Kiess W, Klammt J, Kratzsch J, Osgood D, Pfaffle R, Raile K, Seidel B, Smith RJ, Chernausk SD 2003 IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. *N Engl J Med* 349:2211-22
  35. Woods KA, Camacho-Hubner C, Savage MO, Clark AJ 1996 Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med* 335:1363-7.
  36. Walenkamp MJ, Karperien M, Pereira AM, Hilhorst-Hofstee Y, van Doorn J, Chen JW, Mohan S, Denley A, Forbes B, van Duyvenvoorde HA, van Thiel SW, Sluimers CA, Bax JJ, de Laat JA, Breuning MB, Romijn JA, Wit JM 2005 Homozygous and heterozygous expression of a novel insulin-like growth factor-I mutation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90:2855-64
-

37. Inagaki K, Tiulpakov A, Rubtsov P, Sverdlova P, Peterkova V, Yakar S, Terekhov S, LeRoith D 2007 A familial insulin-like growth factor-I receptor mutant leads to short stature: clinical and biochemical characterization. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92:1542-8
  38. Kawashima Y, Kanzaki S, Yang F, Kinoshita T, Hanaki K, Nagaishi J, Ohtsuka Y, Hisatome I, Ninomoya H, Nanba E, Fukushima T, Takahashi S 2005 Mutation at cleavage site of insulin-like growth factor receptor in a short-stature child born with intrauterine growth retardation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90:4679-87
  39. Abu-Amero S, Monk D, Frost J, Preece M, Stanier P, Moore GE 2008 The genetic aetiology of Silver-Russell syndrome. *Journal of medical genetics* 45:193-9
  40. Hitchins MP, Stanier P, Preece MA, Moore GE 2001 Silver-Russell syndrome: a dissection of the genetic aetiology and candidate chromosomal regions. *Journal of medical genetics* 38:810-9
  41. Binder G, Seidel AK, Martin DD, Schweizer R, Schwarze CP, Wollmann HA, Eggermann T, Ranke MB 2008 The endocrine phenotype in silver-russell syndrome is defined by the underlying epigenetic alteration. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 93:1402-7
  42. Kotzot D 2008 Maternal uniparental disomy 7 and Silver-Russell syndrome - clinical update and comparison with other subgroups. *European journal of medical genetics* 51:444-51
  43. Cattanach BM, Beechey CV 1990 Autosomal and X-chromosome imprinting. *Development (Cambridge, England)*:63-72
-

44. Vecchione A, Marchese A, Henry P, Rotin D, Morrione A 2003 The Grb10/Nedd4 complex regulates ligand-induced ubiquitination and stability of the insulin-like growth factor I receptor. *Mol Cell Biol* 23:3363-72
  45. O'Neill TJ, Rose DW, Pillay TS, Hotta K, Olefsky JM, Gustafson TA 1996 Interaction of a GRB-IR splice variant (a human GRB10 homolog) with the insulin and insulin-like growth factor I receptors. Evidence for a role in mitogenic signaling. *The Journal of biological chemistry* 271:22506-13
  46. Wick KR, Werner ED, Langlais P, Ramos FJ, Dong LQ, Shoelson SE, Liu F 2003 Grb10 inhibits insulin-stimulated insulin receptor substrate (IRS)-phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway by disrupting the association of IRS-1/IRS-2 with the insulin receptor. *The Journal of biological chemistry* 278:8460-7
  47. Joyce CA, Sharp A, Walker JM, Bullman H, Temple IK 1999 Duplication of 7p12.1-p13, including GRB10 and IGFBP1, in a mother and daughter with features of Silver-Russell syndrome. *Human genetics* 105:273-80
  48. Yoshihashi H, Maeyama K, Kosaki R, Ogata T, Tsukahara M, Goto Y, Hata J, Matsuo N, Smith RJ, Kosaki K 2000 Imprinting of human GRB10 and its mutations in two patients with Russell-Silver syndrome. *Am J Hum Genet* 67:476-82
  49. Netchine I, Rossignol S, Dufourg MN, Azzi S, Rousseau A, Perin L, Houang M, Steunou V, Esteva B, Thibaud N, Demay MC, Danton F, Petriczko E, Bertrand AM, Heinrichs C, Carel JC, Loeuille GA, Pinto G, Jacquemont ML, Gicquel C, Cabrol S, Le Bouc Y 2007 11p15 imprinting center region 1 loss of methylation is a common and specific cause of typical Russell-Silver syndrome: clinical scoring system and epigenetic-phenotypic correlations. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92:3148-54
-

50. Gicquel C, Rossignol S, Cabrol S, Houang M, Steunou V, Barbu V, Danton F, Thibaud N, Le Merrer M, Burglen L, Bertrand AM, Netchine I, Le Bouc Y 2005 Epimutation of the telomeric imprinting center region on chromosome 11p15 in Silver-Russell syndrome. *Nature genetics* 37:1003-7
  51. Usher R, McLean F 1969 Intrauterine growth of live-born Caucasian infants at sea level: standards obtained from measurements in 7 dimensions of infants born between 25 and 44 weeks of gestation. *J Pediatr* 74:901-10
  52. Tanner JM, Whitehouse RH, Takaishi M 1966 Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity: British children, 1965. I. *Arch Dis Child* 41:454-71.
  53. Coutinho DC, Coletta RR, Costa EM, Pachi PR, Boguszewski MC, Damiani D, Mendonca BB, Arnhold IJ, Jorge AA 2007 Polymorphisms identified in the upstream core polyadenylation signal of IGF1 gene exon 6 do not cause pre- and postnatal growth impairment. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92:4889-92
  54. Kamp GA, Ouwens DM, Hoogerbrugge CM, Zwinderman AH, Maassen JA, Wit JM 2002 Skin fibroblasts of children with idiopathic short stature show an increased mitogenic response to IGF-I and secrete more IGFBP-3. *Clin Endocrinol (Oxf)* 56:439-47
  55. Martin BM 94 *Tissue Culture Techniques Biotechnology* 2431 – Cell Culture Techniques
  56. Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K 1986 An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods* 93:157-65
-

57. Chomczynski P, Sacchi N 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* 162:156-9
  58. Livak KJ, Schmittgen TD 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-8
  59. Ferguson RE, Carroll HP, Harris A, Maher ER, Selby PJ, Banks RE 2005 Housekeeping proteins: a preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. *Proteomics* 5:566-71
  60. Modric T, Silha JV, Shi Z, Gui Y, Suwanichkul A, Durham SK, Powell DR, Murphy LJ 2001 Phenotypic manifestations of insulin-like growth factor-binding protein-3 overexpression in transgenic mice. *Endocrinology* 142:1958-67
  61. Francis GL, Ross M, Ballard FJ, Milner SJ, Senn C, McNeil KA, Wallace JC, King R, Wells JR 1992 Novel recombinant fusion protein analogues of insulin-like growth factor (IGF)-I indicate the relative importance of IGF-binding protein and receptor binding for enhanced biological potency. *Journal of molecular endocrinology* 8:213-23
  62. Lee KW, Ma L, Yan X, Liu B, Zhang XK, Cohen P 2005 Rapid apoptosis induction by IGFBP-3 involves an insulin-like growth factor-independent nucleomitochondrial translocation of RXRalpha/Nur77. *The Journal of biological chemistry* 280:16942-8
  63. Chen X, Ferry RJ, Jr. 2006 Novel actions of IGFBP-3 on intracellular signaling pathways of insulin-secreting cells. *Growth Horm IGF Res* 16:41-8
-

64. Goda N, Tenno T, Inomata K, Shirakawa M, Tanaka T, Hiroaki H 2008 Intracellular protein delivery activity of peptides derived from insulin-like growth factor binding proteins 3 and 5. *Experimental cell research* 314:2352-61
  65. Kotzot D, Schmitt S, Bernasconi F, Robinson WP, Lurie IW, Ilyina H, Mehes K, Hamel BC, Otten BJ, Hergersberg M, et al. 1995 Uniparental disomy 7 in Silver-Russell syndrome and primordial growth retardation. *Human molecular genetics* 4:583-7
  66. Preece MA, Price SM, Davies V, Clough L, Stanier P, Trembath RC, Moore GE 1997 Maternal uniparental disomy 7 in Silver-Russell syndrome. *Journal of medical genetics* 34:6-9
  67. Jerome CA, Scherer SW, Tsui LC, Gietz RD, Triggs-Raine B 1997 Assignment of growth factor receptor-bound protein 10 (GRB10) to human chromosome 7p11.2-p12. *Genomics* 40:215-6
  68. Walenkamp MJ, van der Kamp HJ, Pereira AM, Kant SG, van Duyvenvoorde HA, Kruithof MF, Breuning MH, Romijn JA, Karperien M, Wit JM 2006 A variable degree of intrauterine and postnatal growth retardation in a family with a missense mutation in the insulin-like growth factor I receptor. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91:3062-70
  69. Matthaei S, Stumvoll M, Kellerer M, Haring HU 2000 Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. *Endocr Rev* 21:585-618
  70. Lee KW, Cohen P 2002 Nuclear effects: unexpected intracellular actions of insulin-like growth factor binding protein-3. *The Journal of endocrinology* 175:33-40
-

71. Debacq-Chainiaux F, Pascal T, Boilan E, Bastin C, Bauwens E, Toussaint O 2008 Screening of senescence-associated genes with specific DNA array reveals the role of IGFBP-3 in premature senescence of human diploid fibroblasts. *Free radical biology & medicine* 44:1817-32
  72. Xi G, Shen X, Clemmons DR 2008 p66shc negatively regulates insulin-like growth factor I signal transduction via inhibition of p52shc binding to Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1 leading to impaired growth factor receptor-bound protein-2 membrane recruitment. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 22:2162-75
  73. Salani B, Briatore L, Garibaldi S, Cordera R, Maggi D 2008 Caveolin-1 down-regulation inhibits insulin-like growth factor-I receptor signal transduction in H9C2 rat cardiomyoblasts. *Endocrinology* 149:461-5
  74. Thiery JP, Boyer B 1992 The junction between cytokines and cell adhesion. *Current opinion in cell biology* 4:782-92
  75. Clark EA, Brugge JS 1995 Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science (New York, NY)* 268:233-9
  76. Jones JI, Prevette T, Gockerman A, Clemmons DR 1996 *Ligand occupancy of the alpha-V-beta3 integrin is necessary for smooth muscle cells to migrate in response to insulin-like growth factor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93:2482-7
  77. Dey BR, Furlanetto RW, Nissley P 2000 Suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 protein interacts with the insulin-like growth factor-I receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 278:38-43
-