

Mecanismul de acțiune a agoniștilor GnRH în fibromul uterin

Effect of GnRH agonists on uterine leiomyomas: mechanism of action

Alina Ursuleanu

UMF "Carol Davila" București

Abstract

Various gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) agonists have been clinically used for numerous conditions. The purpose of this text is to review available data on the

pharmacological and physiological effect of GnRH agonists on uterine leiomyoma.

Keywords: GnRH agonist, uterine leiomyoma

Geneza fibromului uterin și factorii de creștere care inițiază și susțin dezvoltarea acestuia sunt, încă, incomplet elucidate. Similar, mecanismele moleculare prin care agoniștii GnRH determină reducerea dimensiunilor fibromului uterin sunt incomplet cunoscute. Principalul mecanism prin care agoniștii GnRH determină reducerea dimensiunilor fibromului uterin a fost și este considerat a fi statusul hipoe estrogenic produs prin reducerea secreției gonadotropinelor la nivelul hipofizei anterioare, echivalent cu o veritabilă „castrare farmacologică”. După primele aproximativ 15 zile de efect stimulator, estrogenii serici scad în general la niveluri mai mici de 50 pg/ml. Legarea moleculei de GnRH nativ la nivelul receptorilor hipofizari conduce la eliberarea promptă a proteinei Gs care activează fosfolipaza C-beta1. Această enzimă este responsabilă de degradarea fosfoesterilor inozitolului în inozitol trifosfat și diacilglicerol (DAG). La rândul său, inozitol trifosfatul determină creșterea concentrației citosolice a calciului prin eliberarea calciului din depozitele intracelulare și deschiderea canalelor membranare de calciu. Acumularea calciului la nivelul citosolului activează calmodulina, care, împreună cu proteinchinaza C activată de DAG, promovează expresia genelor pentru gonadotropine. Această cascadă de evenimente conduce la eliberarea gonadotropinelor preformate și în același timp inițiază expresia genelor pentru sinteza de gonadotropine.

Molecula endogenă de GnRH este alcătuită, așa cum am arătat, din 10 aminoacizi așezați în secvența descrisă în tabelul 1. In vivo, GnRH are un timp de înjumătățire foarte scurt (aproximativ 2-5 minute), din cauza clivării facile a moleculei de peptidazele hipofizare și hipotalamice în pozițiile 6 și 10 (Gly6-Leu7 și Pro9-Gly-NH210). Așa cum au arătat Schally și Guillemin în secvența de aminoacizi poziția 6 este responsabilă de degradarea enzimatică, pozițiile 2 și 3 sunt legate de eliberarea de gonadotropine, iar pozițiile 1, 6 și 10 condiționează structura tridimensională. Modificările în aceste poziții prin substituirea cu o grupare D-aminoacid la poziția 6 și înlocuirea rezidului Gly-amidă terminal cu o grupare etilamidă au condus la apariția de analogi cu rezistență crescută față de degradarea enzimatică și cu afinitate crescută pentru receptorul GnRH.

În 1971, când Schally și Guillemin au izolat și analizat chimic (independent unul de celălalt) pentru prima oară molecula de GnRH, aplicațiile clinice ale acestei descoperiri au părut a fi direcționate în principal în direcția stimulării axului hipotalamo-hipofizar și mai puțin în direcția supresiei funcției hipofizare. În prezent însă, efectul inhibitor al producției de gonadotropine al analogilor GnRH are o utilizare cel puțin la fel de largă ca și cel stimulator, în tratarea unor condiții variate, de la leiomiome uterine, la cancer genitomamare, pubertate precoce sau endometrioză (tabelul 2).

În ceea ce privește agoniștii GnRH, legarea unei asemenea molecule la receptorul hipofizar pentru GnRH conduce la eliberarea gonadotropinelor stocate la nivel hipofizar (răspunsul flare) și determină transcripția, translația asamblarea subunităților și glicozilarea, cu formarea de noi molecule de gonadotropine. Sub expunere continuă, celulele gonadotrope pituitare devin mai puțin responsive și producerea de gonadotropine încetează. Mecanismul molecular prin care se produce desensibilizarea receptorului GnRH rămâne imprecis precizat. Ipoteza agreată în prezent este aceea că regulatorii proteinei G (RGS3), care acționează ca o proteină activatoare a GTP-azei, pot limita semivita subunităților proteinei G activate. S-a demonstrat că mecanismul de down-regulation al receptorilor pentru GnRH în celulele gonadotrope alfa T3-1 la șoarece este însoțit de reducerea translației mRNA pentru receptor⁽³⁰⁾. Pe aceeași linie celulară, Mason și colab.⁽³¹⁾ găsesc, de asemenea, un nivel redus al receptorilor pentru GnRH, precum și un nivel redus al ARNm pentru receptor. Cu toate acestea, reducerea ARNm a fost proporțional mai mică decât reducerea numărului de receptori. De aceea, investigatorii au sugerat că în fenomenul de down-regulation al receptorilor ar putea interveni un mecanism adițional, cum ar fi endocitoza și degradarea moleculelor receptoare.

Studiile care au urmărit evoluția receptorilor pentru steroizii gonadali la nivelul

Tabelul 1. Structura și potența relativă a GnRH și a agoniștilor GnRH

Compus	Potență	Secvența de aminoacizi									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
GnRH	1	pyro Glu	HIS	TRP	SER	TYR	Gly	LEU	ARG	PRO	Gly-NH ₂
	4										N-EtNH ₂
	4						D-Ala				
	14						D-Ala				N-EtNH ₂
Triptorelina							D-Trp				
Leuprolide	15						D-Leu				N-EtNH ₂
Buserelin	20						D-Ser				N-EtNH ₂
Nafarelin							D-Nal				N-EtNH ₂
Deslorelin	144						D-Trp				N-EtNH ₂
Histrelin	210						D-His				N-EtNH ₂

Adaptat după Conn PM și colab.

Legendă: ARG - arginină; Glu - acid glutamic; Gly -glicină; HIS-histidină; LEU-leucină; PRO-prolină; SER-serine; TRP-tryptofan; TYR-tyrosină; D- -dextro; NH₂-nitrogen + hidrogen (grupare amino); Et-ethylamidă; Nal-naphthylalanină

miometrului sub tratament cu agoniști GnRH au ajuns la concluzii contradictorii. În ceea ce privește evoluția expresiei receptorilor estrogenici sub tratament, în timp ce unii autori remarcă o reducere semnificativă⁽²⁵⁾, alții⁽²⁶⁾ îi găsesc într-o concentrație asemănătoare celei din timpul ciclului menstrual, incriminând astfel progesteronul ca fiind implicat în creșterea fibromului uterin.

Anterior tratamentului, concentrația receptorilor pentru estrogeni și progesteron este similară la nivelul celulelor miomatoase și la nivelul miometrului normal. Sub tratament se produce o creștere a ER totali, cu o creștere a raportului ER α /ER β la nivelul celulelor miomatoase mai mare decât cea înregistrată în miometrul normal. Concentrația PR rămâne nemodificată la nivelul fibromului

și scade semnificativ în miometrul normal. Deoarece PR sunt considerați markeri ai stimulului estrogenic, această constatare indică persistența efectelor estrogenice la nivelul fibromului, în ciuda reducerii marcate a concentrației serice a estrogenilor⁽²⁴⁾. La aceeași concluzie se ajunge și prin analiza nivelurilor estronei și estradiolului și a activității sulfatazei sub tratament cu agoniști GnRH. S-a con-

Tabelul 2. Aplicațiile clinice ale agoniștilor GnRH

Afecțiuni ginecologice și endocrine	Pubertate precoce
	Endometrioză
	Fibrom uterin
	Inducerea ovulației și prevenirea luteinizării premature
Afecțiuni oncologice	Cancer ovarian
	Cancer de prostată
	Carcinom endometrial
	Cancer de sân

statat o reducere semnificativ mai mică a estradiolului la nivelul celulelor miomatoase comparativ cu miometrul normal și menținerea constantă a activității sulfatazei⁽²³⁾.

Alte studii susțin că sub tratamentul cu agoniști GnRH se constată o scădere dramatică a concentrației receptorilor AB pentru progesteron (PRAB) și a receptorilor B pentru progesteron (PRB) și a Ki 67, în timp ce concentrația ER rămâne comparabilă cu cea din timpul ciclului menstrual. Rezultatele sugerează că fibromul uterin pare să fie influențat de progesteron, care pare să joace un rol important în creșterea sa⁽¹⁶⁾.

De altfel, procentul de reducere a dimensiunilor fibromului este corelat negativ cu concentrația de receptori pentru progesteron nelegați⁽²⁹⁾.

Un studiu care a cercetat creșterea în cultură a celulelor miomatoase⁽⁴⁾ constată că evoluția culturilor nu a fost influențată de adăugarea de agoniști GnRH sau de progesteron; în schimb, creșterea a fost accelerată după adăugarea de estrogeni sau ser fetal bovin. Hiperexpresia antigenului nuclear de proliferare celulară a fost blocată de administrarea de estrogeni sau de ser fetal bovin. Administrarea de estrogeni sau ser fetal bovin timp de 4-7 zile a fost urmată de o reducere semnificativă a alterărilor ADN; administrarea de agoniști GnRH sau de progesteron nu a avut nici o influență.

Concluzia studiului este că GnRH induce scăderea dimensiunilor fibromului printr-un mecanism indirect, prin reducerea acțiunii locale a estrogenilor, ceea ce produce alterări ale ADN. Efectul antiproliferativ al agoniștilor GnRH a fost corelat și cu creșterea expresiei intracelulare a anexinei V, mediată, cel puțin în parte, prin activarea proteinkinazei C (PKC)⁽²⁸⁾.

Studii biochimice sugerează că progesteronul, progestativele și receptorii pentru progesteron modulează activitatea mitotică a mioamelor. Există câteva trialuri clinice care demonstrează că progestativele inhibă sau contrabalansează abilitatea hipoeestrogenismului indus de tratamentul cu agoniști GnRH de a reduce fibroamele, sugerând un rol critic pentru progesteron în creșterea fibroamelor⁽¹⁷⁾.

Efectul direct. Una din cele mai importante descoperiri în ceea ce privește mecanismul de acțiune a agoniștilor GnRH a avut loc în 1996, când Chegini și colab.⁽³⁾ decelează GnRH și mARN pentru receptorul GnRH la nivelul miometrului normal și al celulelor miomatoase. Aceiași

autori demonstrează că analogii GnRH inhibă direct acțiunea stimuloare a estradiolului, MPA și a estradiolului + MPA într-o manieră dependentă de timp. Expresia locală a GnRH și a receptorului său, alături de reducerea sub acțiunea GnRH a concentrației TGFβ1 sugerează un rol autocrin/paracrin pentru GnRH la acest nivel, mecanism care ar putea fi răspunzător pentru regresia fibroamelor la femeile sub tratament cu agoniști GnRH⁽³⁾. Administrarea de agoniști GnRH este urmată de o creștere a concentrației propriilor receptori la nivelul miometrului, într-o manieră dependentă de doză.

Acest studiu a fost urmat de explorarea posibilului rol paracrin al agoniștilor GnRH la nivelul celulelor miomatoase prin studierea efectului GnRH asupra unor factori de creștere. Diferiți factori de creștere au fost frecvent incriminați în ultimii ani ca fiind răspunzători pentru stimularea creșterii fibromului uterin. S-a demonstrat că celulele miomatoase exprimă mARN și proteine pentru toate componentele sistemului TGFβ. Sub tratament cu agoniști GnRH se produce reducerea expresiei TGFβ și a receptorilor pentru TGFβ, ceea ce pare a fi în directă legătură cu regresia fibromului⁽⁷⁾. De asemenea, reducerea sub tratamentul cu agoniști GnRH a fibromului uterin este statistic proporțională cu reducerea nivelurilor unui alt factor de creștere, PDGF (de aici ideea că PDGF ar avea o acțiune mitogenică asupra fibromului uterin)⁽⁶⁾. Răspunsul la tratament este corelat și cu reducerea expresiei IGF-I⁽⁸⁾. Un alt factor de creștere incriminat este FGF (factorul de creștere fibroblastic). Creșterea sub tratament a expresiei proteinei chemotactice a monocitelor-1 (MCP-1), substanță cu rol antiproliferativ independent de acțiunea monocitelor, pare a fi un alt mecanism paracrin de acțiune a agoniștilor GnRH⁽²⁰⁾.

De remarcat că majoritatea studiilor care susțin rolul predominant paracrin al GnRH la nivelul celulelor miomatoase se bazează pe datele obținute in vitro, pe culturi de celule miomatoase. În favoarea acțiunii supresive directe a agoniștilor GnRH asupra celulelor miomatoase pledează un alt argument, și anume demonstrarea reducerii expresiei aromatazei P450 la nivelul celulelor miomatoase sub acțiunea GnRH, independent de concentrația estradiolului⁽¹⁹⁾.

Un alt posibil mecanism de acțiune a agoniștilor GnRH este reducerea expresiei

ei sintetazei endoteliale a oxidului nitric la nivelul celulelor miomatoase (eNOS)⁽⁹⁾. Reducerea expresiei acestei enzime se produce, însă, cel mai probabil, prin intermediul hipoeestrogenismului indus de agoniștii GnRH.

La nivelul miometrului normal și al celulelor miomatoase a fost demonstrată prezența receptorilor pentru hormonul de creștere (GH). Concentrația receptorii pentru hormonul de creștere (GH) la nivelul celulelor miomatoase rămâne neinfluențată de tratamentul cu agoniști GnRH⁽¹⁸⁾. Astfel, rolul GH în patogenia fibromului uterin rămâne, încă, neclar.

Aproximativ 30% din fibroamele uterine demonstrează anomalii cromozomiale; în ordinea frecvenței se întâlnesc: del(7q), t(12, 14), trisomia 12 și rearanjarea 6p. S-a demonstrat că fibroamele care exprimă t(12, 14) sunt mai puțin hormono-dependente (răspund mai puțin la tratamentul cu agoniști GnRH), în timp ce del(7q) nu influențează răspunsul la tratamentul cu agoniști GnRH^(21, 22).

Majoritatea fibroamelor demonstrează expresia semnificativă a antigenului nuclear de proliferare celulară. Tratamentul cu agoniști GnRH induce o hiperexpresie semnificativă a antigenului nuclear de proliferare celulară. Fibroamele la care s-a înregistrat eșecul tratamentului cu agoniști GnRH au demonstrat o expresie redusă a antigenului nuclear de proliferare celulară comparativ cu subiecții responsivi. Celulele pozitive la colorația pentru antigenul nuclear de proliferare celulară au fost mai frecvente la grupul tratat comparativ cu martorul. În concluzie, expresia antigenului nuclear de proliferare celulară pare să fie asociată cu răspunsul la terapia cu agoniști GnRH⁽¹²⁾.

Apoptoza. O altă dispută persistă în jurul întrebării dacă agoniștii GnRH induc sau nu o creștere a apoptozei la nivelul celulelor miomatoase.

Există autori care susțin că apoptoza are loc spontan în celulele miomatoase, independent de tratamentul cu agoniști GnRH⁽¹⁷⁾, propunând ca mecanisme de acțiune ale agoniștilor GnRH în fibromul uterin stimularea alterărilor sau reparărilor ADN și oprirea creșterii celulare. Același autor găsește rezultate similare cercetând expresia moleculelor asociate apoptozei (Fas/ligandul Fas - FasL, caspaze 3, 6, 7, 8, 9, 10 și bcl-2); tratamentul cu agoniști GnRH nu modifică apoptoza la nivelul celulelor miomatoase⁽¹¹⁾.

Alt studiu, efectuat pe piese rezecate de la paciente care au urmat preoperator tratament cu agoniști, consideră apoptoza ca fiind un rezultat al tratamentului⁽¹⁰⁾.

Tratamentul cu GnRH conduce la o scădere a numărului de celule miomatoase în cultură într-o manieră dependentă de doză comparativ cu culturile de control. Inhibiția creșterii celulare a fost asociată

cu supresia potențialului proliferativ caracterizată printr-o reducere a procentului celulelor PCNA pozitive și o creștere a procentului celulelor apopto-pto-ze pozitive. GnRH crește expresia Fas și induce expresia ligandului Fas în culturile de celule miomatoase. GnRH asupra numărului de celule miomatoase, procentului celulelor PCNA pozitive, pro-

centului celulelor apopto-pto-ze pozitive și expresiei Fas/ligandului Fas sunt obținute după minimum 4 zile de la inițierea tratamentului. În concluzie, agoniștii GnRH inhibă direct creșterea celulelor miomatoase prin supresia proliferării celulare și inducerea apoptozei, care poate fi asociată cu creșterea expresiei Fas și inducerea expresiei ligandului Fas⁽²⁷⁾.

Bibliografie selectivă

1. Abulafia O, et al. Effect of gonadotropin-releasing hormone agonist treatment upon angiogenesis in uterine leiomyoma. *Gynecol Obstet Invest*, 2001, 52(2): 108-13;
2. Aleem F, Predanic M. The hemodynamic effect of GnRH agonist therapy on uterine leiomyoma vascularity: a prospective study using transvaginal color Doppler sonography. *Gynecol Endocrinol*, 1995, 9(3): 253-8;
3. Chegini N, et al. Gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor gene expression in human myometrium and leiomyomata and the direct action of GnRH analogs on myometrial smooth muscle cells and interaction with ovarian steroids in vitro. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81(9): 3215-21;
4. Cheng Y, et al. Oestrogen deficiency causes DNA damage in uterine leiomyoma cells: a possible mechanism for shrinkage of fibroids by GnRH agonists. *BJOG*, 2001, 108: 95-102;
5. Deligdisch L, et al. Pathologic changes in gonadotropin releasing hormone agonist analogue treated uterine leiomyomata. *Fertil Steril*, 1997, 67(5): 837-41;
6. Di Lieto A, et al. Relationship between platelet-derived growth factor expression in leiomyomas and uterine volume changes after gonadotropin-releasing hormone agonist treatment. *Hum Pathol*, 2002, 33(2): 220-4;
7. Dou Q, et al. Suppression of transforming growth-factor beta (TGF beta) and TGF beta receptor messenger ribonucleic acid and protein expression in leiomyomata in women receiving gonadotrophin-releasing hormone agonist therapy. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81(9): 3222-30;
8. Englund K, et al. Gene expression and tissue concentrations of IGF-I in human myometrium and fibroids under different hormonal conditions. *Mol Hum Reprod*, 2000, 6(10): 915-20;
9. Gokdeniz R, et al. GnRH agonist decreases endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in leiomyoma. *Int J Gynecol Obstet*, 2000, 70(3): 347-52;
10. Higashijima T, et al. Gonadotroin-releasing hormone agonist therapy induces apoptosis in uterine leiomyoma. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1996, 68: 169-73;
11. Huang S, et al. Enhanced deoxyribonucleic acid damage and repair but unchanged apoptosis in uterine leiomyomas treated with gonadotrophin-releasing hormone agonist. *Am J Obstet Gynecol*, 1997, 177: 417-24;
12. Huang SC, et al. Fas and its ligands, caspases, and bcl-2 expression in gonadotropin-releasing hormone agonist-treated uterine leiomyoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(10): 4580-6;
13. Ito F, et al. Ultrastructural comparison of uterine leiomyoma cells from the same myoma nodule before and after gonadotropin-releasing hormone agonist treatment. *Fertil Steril*, 2001, 75(1): 125-30;
14. Kalir T, et al. Morphometric and electron microscopic analyses of the effect of gonadotropin-releasing hormone agonist treatment on arteriole size in uterine leiomyomas. *Arch Pathol Lab Med*, 2000, 124(9): 1295-8;
15. Mesia A, Popiolek D. Effects of gonadotropin-releasing hormone agonists on leiomyomas. *Arch Patol Lab Med*, 1999, 123(4): 282-3;
16. Nisolle M, et al. Immunohistochemical study of the proliferation index, oestrogen receptors and progesterone receptors A and B in leiomyomata and normal myometrium during the menstrual cycle and under gonadotrophin-releasing hormone agonist therapy. *Hum Reprod*, 1999, 14(11): 2844-50;
17. Rein MS, et al. Progesterone: a critical role in the pathogenesis of uterine myomas. *Am J Obstet Gynecol*, 1995, 172: 14-8;
18. Sharara F, Nieman L. Growth hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in leiomyoma and surrounding myometrium. *Am J Obstet Gynecol*, 1995, 173(3): 814-9;
19. Shozu M, et al. Inhibition of in situ expression of aromatase P450 in leiomyoma of the uterus by leuprolin acetate. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(11): 5405-11;
20. Sozen I, et al. Effect of gonadotropin-releasing hormone agonists on monocyte chemotactic protein-1 production and macrophage infiltration in leiomyomatous uterus. *Fertil Steril*, 2001, 76(4): 792-6;
21. Takahashi K, et al. Association of the shrinkage of uterine leiomyoma treated with GnRH agonist and deletion of long arm of chromosome 7. *Int J Oncol*, 2001, 18(6): 1259-63;
22. Takahashi K, et al. Value of magnetic resonance imaging in predicting efficacy of GnRH analogue treatment for uterine leiomyoma. *Hum Reprod*, 2001, 16(19): 1989-94;
23. Van de Ven J, et al. Differential effect of gonadotropin-releasing hormone analogue treatment on estrone levels and sulfatase activity in uterine leiomyoma and myometrium. *Fertil Steril*, 2002, 77(6): 1227-32;
24. Van de Ven, et al. Levels of estrogen and progesterone receptors in the myometrium and leiomyoma tissue after suppression of estrogens with gonadotropin releasing hormone analogs. *Gynecol Endocrinol*, 2001, 15 Suppl. 6: 61-8;
25. Vu K, et al. Cellular proliferation, estrogen receptor, progesterone receptor, and bcl-2 expression in GnRH agonist-treated uterine leiomyomas. *Hum Pathol*, 1998, 29(4): 359-63;
26. Wang H, et al. Different expression of estrogen receptors alpha and beta in human myometrium and leiomyoma during the proliferative phase of the menstrual cycle and after GnRH treatment. *Gynecol Endocrinol*, 2001, 15(6): 443-52;
27. Wang Y, et al. Down-regulation of proliferation and up-regulation of apoptosis by gonadotrophin-releasing hormone agonist in cultured leiomyoma cells. *Eur J Endocrinol*, 2002, 146(3): 447-56;
28. Yamamoto H, et al. Involvement of annexin V in the antiproliferative effect of GnRH agonist on cultured human uterine leiomyoma cells. *Mol Hum Reprod*, 2001, 7(2): 169-73;
29. Zhonghua Y, et al. Uterine myoma after cessation of gonadotrophin-releasing hormone agonist: ultrasound and histopathologic findings. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 1998, 61(11): 625-9;
30. Tsutsumi M, et al. Translational regulation of the gonadotropin-releasing hormone receptor in alpha T3-1 cells. *Endocrinology*, Vol 136, 1128-1136
31. Mason DR, et al. Homologous down-regulation of gonadotropin-releasing hormone receptor sites and messenger ribonucleic acid transcripts in alpha T3-1 cells. *Endocrinology*, Vol 135, 1165-1170, Copyright © 1994 by Endocrine Society