

# ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS CON LA EXPRESIÓN DE IGF1R EN PLACENTA HUMANA EN ALTERACIONES DEL PESO AL NACIMIENTO

García Segoviano, Estefanía (1), González Domínguez, Martha Isabel (2), Barbosa Sabanero, Gloria (3), Lazo de la Vega Monroy, María Luisa (3)

<sup>1</sup> [Licenciatura en Nutrición, Universidad de Guanajuato] | [fanygs23@hotmail.com]

<sup>2</sup> [Universidad de la Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo Trayectoria de Ingeniería en Nanotecnología]

<sup>3</sup> [Departamento de Ciencias Médicas, División de Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato] | [mlazo@ugto.mx]

## Resumen

El peso al nacer es un indicador importante de la salud del recién nacido. El crecimiento fetal deficiente da lugar a niños SGA que a su vez trae complicaciones neonatales y mortalidad infantil. El sistema de factores de crecimiento similares a insulina (IGF, por sus siglas en inglés), que incluyen, IGF-1, IGF-2, insulina y las proteínas de unión IGFBP1 e IGFBP3, están implicados en la regulación del crecimiento y desarrollo fetal y placentario. Los efectos mitogénicos tanto de IGF-1 e IGF-2, están regulados por IGF1R. En muestras de placentas de madres que tuvieron bebés con pesos AGA, SGA y LGA en las cuales se había evaluado la expresión de IGF1R, se genotipificó el polimorfismo [rs4966035](#) de IGF1R por medio RFLPs. Se encontró que las placentas que presentaban genotipos con alelos GG tenían mayor expresión de IGF1R.

## Abstract

Birth weight is an important indicator of newborn health. Low fetal growth results in SGA children that brings many neonatal complications and children mortality derived. The insulin-like growth factor system, IGF-1, IGF-2, insulin and the IGF binding proteins IGFBP1 and IGFBP, are involved in the regulation of fetal and placental growth and development. The mitogenic effects of both IGF-1 and IGF-2 are regulated by IGF1R. Previous expression of IGF1R receptors was detected in placenta samples from mothers who had babies with AGA, SGA and LGA weights. In those samples, SNP [rs4966035](#) in IGF1R gene was genotyped by RFLPs. It was found that placentas with GG genotypes had a higher expression of IGF1R.

## Palabras Clave

IGF1R; placenta; Peso al nacer.

## INTRODUCCIÓN

La placenta es un órgano fetal localizado en la interfase entre la circulación materna y fetal, proporcionando un espectro de funciones fundamentales para el embarazo. Principalmente el suministro de nutrientes y oxígeno al feto, así como la producción de hormonas y factores de crecimiento. [1]

- *Peso al nacimiento*

El peso al nacer es un indicador importante de la salud del recién nacido. El crecimiento fetal deficiente da lugar a niños SGA y a las complicaciones neonatales y de mortalidad derivadas de esta condición. El peso bajo al nacer también se ha asociado con diversas consecuencias metabólicas a largo plazo, como el síndrome metabólico, la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. [2]

- *El sistema de factores de crecimiento similares a insulina*

El sistema de factores de crecimiento similares a insulina (IGF, por sus siglas en inglés), que incluyen, IGF1, IGF2, insulina y las proteínas de unión IGFBP1 e IGFBP3, están implicados en la regulación del crecimiento y desarrollo fetal y placentario. [1]

Este sistema abarca dos IGFs: IGF-I e IGF-II, y por lo menos seis proteínas de unión al IGF (IGFBP)[2], los cuales se expresan en diferentes partes de la superficie de la placenta. [1]

IGF-1 se une a su receptor IGF1R. Esta proteína heterotetramérica está compuesta por dos subunidades alfa que contienen los sitios de unión para IGF-1. Las subunidades beta contienen una región transmembrana con un sitio de unión para el ATP, y un dominio para tirosina kinasa que constituye el mecanismo de transducción del receptor. El receptor para IGF-1 puede unirse también con IGF-2 con una alta afinidad. IGF-1 circula en plasma unido a los IGFBP's de los cuales se conocen 6 tipos diferentes. El que se encuentra en mayor cantidad es el IGFBP3. [3]

- *Polimorfismos de un solo nucleótido*

Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) representan a las variantes genéticas más comúnmente encontradas en el genoma humano. Debido a su amplia distribución, estos polimorfismos se localizan en cualquier parte de la estructura de los genes y el genoma. [4]

Los SNP que tienen implicaciones funcionales sobre los niveles de expresión génica se denominan SNP reguladores (rSNP), mientras que los que alteran la traducción de los ARN mensajeros (ARNm), el corte y empalme, la eficiencia para potenciar o inhibir el corte y empalme, la estabilidad de los ARNm y la función de las proteínas (sin alterar su estructura) se denominan SNP ARN estructurales (srSNP). [4]

- *Polimorfismo rs4966035 del gen IGF1R*

El gen IGF1R es el responsable de la expresión del receptor IGF1R. Su ubicación genética es 15q26.3. [5] Contiene 21 exones y abarca de aproximadamente 100 kb. [6]

Entre los polimorfismos de IGF1R encontramos el rs4966035, el cual se ha asociado previamente con alteraciones de peso al nacimiento. [2] La frecuencia del alelo menor es  $A=0.4377$ , de acuerdo al proyecto de los 1000 genomas. [7]

En este proyecto, se evaluó el genotipo para el polimorfismo rs4966035 en placentas de bebés AGA, SGA y LGA cuya expresión de los receptores IGF1R había sido previamente determinada.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras se tomaron de un estudio previo, descriptivo, comparativo y transversal realizado en placentas de madres sanas y recién nacidos a término SGA (bebés con peso por debajo del percentil 10 de peso normal para la población) (n=5), AGA (bebés con peso entre los percentiles 10 y 90 de peso normal para la población) (n=9) y LGA (bebés con peso superior al percentil 90 de peso normal para la población) (n=11). Las muestras fueron tomadas de la Unidad Médica de Alta Especialidad HGP no. 48 del Instituto Mexicano del Seguro Social y el Hospital General Regional de León (HGRL), en Guanajuato. Todos los procedimientos fueron aprobados por los

comités de ética e investigación correspondientes. Se consideraron para el estudio mujeres mayores de 18 años y menores de 35 con embarazo a término (edad gestacional de 37-41 semanas), sin diabetes mellitus, diabetes mellitus gestacional, enfermedad hipertensiva en el embarazo, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, enfermedades del tejido conectivo, enfermedades infecciosas crónicas, tabaquismo o alcoholismo durante el embarazo, con productos únicos. Los bebés nacieron por parto eutócico o cesárea, y no presentaron datos de sufrimiento fetal.

De forma previa al parto y previa firma del consentimiento informado, se examinó a mujeres sanas al final del embarazo y se obtuvieron, mediante un interrogatorio directo y a través del expediente, los datos generales de la madre (antecedentes de diabetes por ramas materna y paterna, enfermedades metabólicas e infecciosas, antecedentes ginecoobstétricos, fecha de la última menstruación, peso previo, peso actual y estatura), así como los datos antropométricos y clínicos del recién nacido (peso, talla, APGAR, sexo y edad gestacional). Inmediatamente después del parto o la cesárea se tomó una muestra transversal de placenta, la cual se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el procesamiento del tejido.

La expresión placentaria de los receptores IGF-1 fue evaluada previamente por Western Blot.

El DNA placentario se extrajo por medio de la técnica TSNT. Se cortó la muestra de placenta y se colocó en tubo eppendorf. Posteriormente se lavó con agua desionizada y se agregó a la muestra 250  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis de ADN y 40  $\mu\text{L}$  de Proteinasa K. Se incubó a  $65^{\circ}\text{C}$  por una hora y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se agregó volumen equivalente de fenol saturado (aprox. 300  $\mu\text{L}$ ) y se mezcló por 2 minutos en vórtex. Se centrifugó 5 minutos a 14,000 rpm. La fase acuosa se transfirió a otro tubo estéril y se agregaron 1/10 del volumen de acetato de sodio (3M, pH 8). Posteriormente se agregaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto, se mezcló y se centrifugó por 1 minuto a 14,000 rpm. Se descartó sobrenadante y se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 70%. Se repitió la centrifugación y se descartó el sobrenadante. Por último, se disolvió el precipitado en 100  $\mu\text{L}$  de TE 1x.

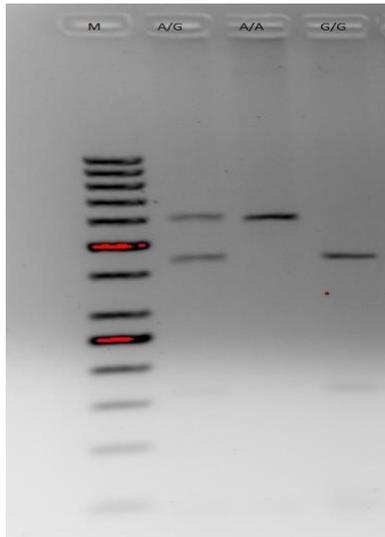
En este estudio se genotipificaron un total de 25 muestras. El genotipo para rs4966035 se evaluó

por RFLP. El polimorfismo de longitud de fragmento de Restricción es una diferencia en secuencias de ADN homólogas que pueden ser detectadas por la presencia de fragmentos de diferentes longitudes después de la digestión de las muestras de ADN en cuestión con endonucleasas de restricción específicas. La mayoría de los marcadores RFLP son co-dominantes (se detectarán ambos alelos en la muestra heterocigótica) y altamente locus-específicos. [8]

Una sonda de RFLP es una secuencia de ADN marcada que se hibrida con uno o más fragmentos de la muestra de ADN digerida después de que se separaron por electroforesis en gel, revelando así un patrón de transferencia único característico de un genotipo específico en un locus específico. [8]

Para el PCR, se preparó un mix por cada muestra de 3  $\mu\text{L}$  de ADN de placenta, 14.68  $\mu\text{L}$  de agua, 1.8  $\mu\text{L}$  de buffer, 2  $\mu\text{L}$  de Cloruro de Magnesio, 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs, y 1  $\mu\text{L}$  de cada oligo para la amplificación de un fragmento de 597 pb. Posteriormente se corrieron las muestras en gel de agarosa al 2% en una cámara de electroforesis a 80 voltios por 40 minutos. Se leyó el resultado de la electroforesis en el procesador ImageLab.

Para la digestión se preparó el mix con 7  $\mu\text{L}$  de ADN previamente amplificado, 0.5  $\mu\text{L}$  de TaqI, 1  $\mu\text{L}$  de Buffer 10 x ( 0.1 M Tris-HCl pH 8.3, 1 M NaCl, 50 Mm MgCl<sub>2</sub>, 0.1% BSA) y 1  $\mu\text{L}$  0.1% BSA. Se dejó en el termociclador por 1 hora a una temperatura de  $65^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se corrió en gel de agarosa al 3% en una cámara de electroforesis a 80 voltios por 90 minutos. Se leyó el resultado de la electroforesis en el procesador de imágenes ImageLab. Se realizó análisis estadístico de ANOVA de una vía de los resultados obtenidos.



**IMAGEN 1:** Digestión de 3 muestras diferentes de ADN de placenta. En el carril 1 (M) se cargó un marcador de 50 pb. En carril 2 (A/G) se encontró genotipo A/G. En tercer carril (A/A) se encontró genotipo A/A. En carril 4 (G/G) se encontró genotipo G/G.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A pesar del número limitado de sujetos, la población está en equilibrio HW, ya que el valor de P es de 0.81.

**Tabla 1:** Equilibrio de Hardy Weingberg.

Genotipo	Observado	Esperado	Frecuencias alélicas
A/A	7	7.3	80%
A/G	13	12.4	49%
G/G	5	5.3	20%
Total de sujetos	25		
X <sup>2</sup> test P value	0.815		

De acuerdo al proyecto de los 1000 genomas, en población Americana descendientes de mexicanos, la menor frecuencia alélica (MAF)

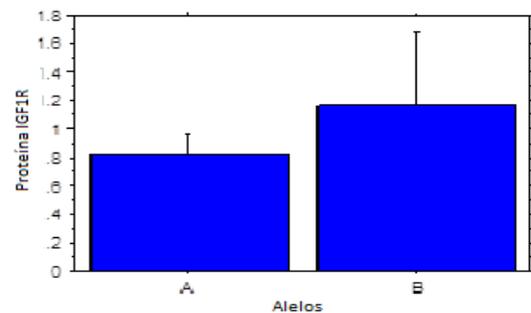
pertenece al alelo ancestral (A) con una frecuencia de 0.45. Sin embargo, en el presente estudio el alelo que se encontró en menor frecuencia es G, posiblemente por el número pequeño de muestra.

Se identificó que la mayoría de los bebés que tenían alelos AG, presentaban peso normal, aunque estadísticamente no se encontró diferencia. Esto es importante analizarlo, ya que, en el caso de niños nacidos con SGA comprenden un fenotipo heterogéneo [5].

Al comparar el peso al nacer con genotipo no se encontraron diferencias significativas, ya que, el valor de p fue de 0.9198.

Tampoco se encontró diferencia significativa entre el genotipo y el IMC (índice de masa corporal pregestacional) ( $p= 0.2080$ ) ni la ganancia de peso durante el embarazo ( $p=0.1922$ ). Al agrupar los genotipos en un modelo recesivo, donde el grupo A, está formado por alelos AG y AA y el grupo B está formado por alelos GG (alelo menor) y comparar la expresión de IGF1R en estos grupos, se observó una diferencia significativa ( $P= 0.050$ ) con la expresión de IGF1R, lo cual, quiere decir que la presencia de este alelo recesivo podría influir en la expresión de IGF1R.

Esto podría indicar que aquellas placentas que presenten el genotipo G podrían llegar afectar el crecimiento fetal, teniendo como consecuencia bebés grandes para la edad gestacional. Sin embargo, es necesario aumentar el tamaño de la muestra para corroborar estos resultados.



**IMAGEN 2:** Relación proteína IGF1R- grupo A y grupo B. Grupo A corresponde a alelos AA y AG. Grupo B corresponde a alelos GG.

## CONCLUSIONES

El crecimiento óptimo fetal, no sólo se debe al estilo de vida y la alimentación de la madre. También puede estar influenciado por factores genéticos. El polimorfismo rs4966035, el gen de IGF1R podría estar asociado con una mayor expresión de IGF1R en placenta. Es necesario aumentar el número de muestra para darle mayor validez al estudio.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Rubén Rangel Salazar y a la Dra. Edith Arenas por su invaluable apoyo técnico.

## REFERENCIAS

[1] Hiden U, Glitzner E, Hartmann M, Desoye G. Insulin and the IGF system in the human placenta of normal and diabetic pregnancies. *Journal of Anatomy*. 2009;215(1):60-68.

[2] Lazo de la Vega Monroy M, González Domínguez M, Daza Benítez L, Barbosa Sabanero G. Expresión del receptor IGF1R y la vía de Akt en la placenta de recién nacidos pequeños para la edad gestacional. *REVISTA MEXICANA DE ENDOCRINOLOGÍA, METABOLISMO & NUTRICIÓN*. 2015;2:5-10.

[3] Wallborn T, Wüller S, Klammt J, Kruis T, Kratzsch J, Schmidt G et al. A Heterozygous Mutation of the Insulin-Like Growth Factor-I Receptor Causes Retention of the Nascent Protein in the Endoplasmic Reticulum and Results in Intrauterine and Postnatal Growth Retardation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* [Internet]. 2010 [cited 14 July 2017];95(5):2316-2324. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2009-2404>

[4] Ramírez Bello J, Vargas Alarcón G, Tovilla-Zárate C, Fragoso J. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP): implicaciones funcionales de los SNP reguladores (rSNP) y de los SNP-ARN estructurales (srSNP) en enfermedades complejas. *Gaceta Médica de México*. 2013;149:220-228.

[5] Ester W, Hokken-Koelega A. Polymorphisms in the IGF1 and IGF1R genes and children born small for gestational age: results of large population studies. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2008;22(3):415-431.

[6] OMIM. 2017 [cited 19 July 2017]. Available from: <http://www.omim.org/entry/147370?search=igf1r&highlight=igf1r>

[7] Ncbi.nlm.nih.gov. 2017 [cited 14 July 2017]. Available from: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=11591147](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=11591147)

[8] Ncbi.nlm.nih.gov. 2017 [cited 19 July 2017]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/probe/doc/TechRFLP.shtml>