

INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL EN ENDOCRINOLOGÍA PEDIÁTRICA

Expresión y contenido placentario de los componentes del eje somatotrófico en niños con alteraciones del crecimiento fetal

Germán Iñiguez y Fernando Cassorla

*Instituto de Investigaciones Materno Infantil. Hospital Clínico San Borja Arriarán.
Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Santiago, Chile.*

Resumen:

El eje somatotrófico (IGFs/IGFBPs/ALS/IGF-IR) en humanos tiene una importante participación tanto en el crecimiento prenatal como en el postnatal. Los IGFs circulan en la sangre principalmente como un complejo ternario con IGFBP-3 y ALS, lo que permite prolongar su vida media. Los IGFs actúan a través de su receptor con actividad tirosina quinasa, IGF-IR.

Hemos estudiado la expresión génica y proteica de los componentes del eje somatotrófico en placentas humanas de término de recién nacidos pequeños (PEG), adecuados (AEG) y grandes (GEG) para su edad gestacional. Esta investigación se realizó en placentas provenientes de 30 niños PEG, 35 niños AEG y en 28 niños GEG, estudiando la expresión génica y contenido proteico, tanto en la placa coriónica como en la basal, de IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, ALS e IGF-IR.

El resultado de nuestros estudios demuestra que, tanto la expresión génica como el contenido proteico de IGF-I, IGFBP-3, ALS e IGF-IR, se encuentran aumentados en las placentas de niños PEG en comparación con las placentas de niños GEG. Las diferencias encontradas en la expresión y/o contenido de los componentes del eje somatotrófico podrían representar un mecanismo de adecuación de la placenta en respuesta a una alteración del crecimiento fetal.

Introducción

El crecimiento embrionario y fetal comienza con la proliferación, organización y diferenciación del embrión, para luego continuar con el crecimiento y la maduración funcional de los distintos tejidos y órganos fetales. Este proceso depende tanto de la carga genética del embrión como de la unidad

materno-feto-placentaria responsable de aportar el oxígeno y los nutrientes necesarios para el desarrollo fetal. También se deben considerar como elementos importantes en el crecimiento fetal condiciones como el peso inicial y la ganancia de peso de la madre durante la gestación, además de las características hormonales de la madre y del feto.

Alrededor del 85% de los recién nacidos tienen un peso al nacimiento dentro de rangos normales, 2.500 – 4.000 g (niños nacidos adecuados para su edad gestacional [AEG]) considerando gestaciones a término (37-41 semanas). Alrededor de un 7- 8% de los recién nacidos tienen un peso por debajo de lo esperado para su edad gestacional (pequeños para la edad gestacional [PEG]), es decir bajo el percentil 10 (< 2.500 g en gestaciones a término)^{1,2}. Por otro lado, alrededor de un 8% de los recién nacidos tiene un peso al nacimiento mayor al percentil 90 (grandes para la edad gestacional [GEG], >4.000 g en gestaciones a término). Las alteraciones en el crecimiento fetal conducen al nacimiento de niños PEG o GEG, los que pueden exhibir un aumento en su morbilidad y mortalidad neonatal, así también con un aumento en el riesgo de patologías en la vida adulta, tales como enfermedades cardiovasculares, obesidad y diabetes tipo 2³.

Eje somatotrófico

El eje somatotrófico está conformado por la hormona del crecimiento y su factor liberador hipotálamico, así como por los factores de crecimiento similares a insulina (IGF-I e IGF-II), los que median acciones tanto mitogénicas como metabólicas⁴. Los IGFs circulan unidos a proteínas ligantes de IGFs (IGFBPs), que regulan la vida media y las acciones biológicas de los IGFs. Posnatalmente estas proteínas son producidas principalmente por el hígado, siendo también producidas localmente

por el riñón, hueso y tejido adiposo, entre otros órganos. Hasta el momento se han caracterizado 6 IGFBPs (IGFBP-1 a IGFBP-6), siendo la IGFBP-3 la más abundante. Esta proteína se une con similar afinidad a IGF-I e IGF-II. Por otro lado, la subunidad ácido lábil (ALS) es una glicoproteína de alrededor de 85 kDa que se produce fundamentalmente en el hígado. Su principal acción es permitir la formación de un complejo ternario con IGF-I e IGFBP-3, lo que permite prolongar la vida media de IGF-I de algunos minutos a varias horas⁵ (Fig.1).

Los IGFs actúan a través de un receptor tirosina quinasa (IGF-IR) que está ubicado en la superficie celular (Fig. 1). Este receptor consiste en un heterotetrámero compuesto de 2 subunidades alfa extracelulares y 2 subunidades beta de transmembrana, en cuya porción citoplasmática se encuentra su dominio quinásico. Si bien es cierto existe una alta homología entre la insulina y el IGF-I y, además, entre el receptor de insulina (IR) y el de IGFs (IGF-IR), la afinidad IGF-I por su receptor es 100 a 1.000 veces mayor que la de insulina⁶.

Después de la autofosforilación IGF_IR, la proteína SHC (proteína que contiene SH2) es reclutada para el receptor y se fosforila en residuos de tirosina. La proteína activada SHC se une al adaptador de GRB2 (receptor del factor de crecimiento proteína unidad-2), lo que permite el reclutamiento de SOS por el IRS. Este complejo permite la fosforilación de

RAS. Una vez activado RAS, se inician una serie de cascadas de fosforilación secuencial que implican la serina / treonina quinasa Raf, MEK 1/2 (MAP quinasa quinasa), y ERK1/2 (quinasas reguladas por señales extracelulares). Esta vía de señalización IGF-IR ha sido más estrechamente asociada con la diferenciación celular y la migración pero, en algunos casos, también puede regular el mecanismo de la apoptosis.

Paralelamente, la activación de IGF-IR lleva a la fosforilación del sustrato para el receptor de insulina (IRS-1). Esta proteína contiene sitios específicos de fosforilación de tirosina, que son responsables de su asociación con diversas proteínas citoplasmáticas con dominio SH2, dando lugar a la activación de múltiples vías de señalización. Estas incluyen la vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3 K), la que a través de una serie de fosforilaciones permite la activación de la proteína quinasa B/AKT. Esta vía de señalización de IGF-IR se ha relacionado principalmente con señales metabólicas como captación de glucosa y síntesis de glicógeno y proteínas⁷.

Por otro lado, la placenta es un órgano fetal ubicado en la interfase de la circulación materno-fetal. La placenta puede actuar como un sustituto de los órganos fetales, cuando éstos no han alcanzado su plena madurez, con el propósito de mantener el desarrollo fetal⁸.

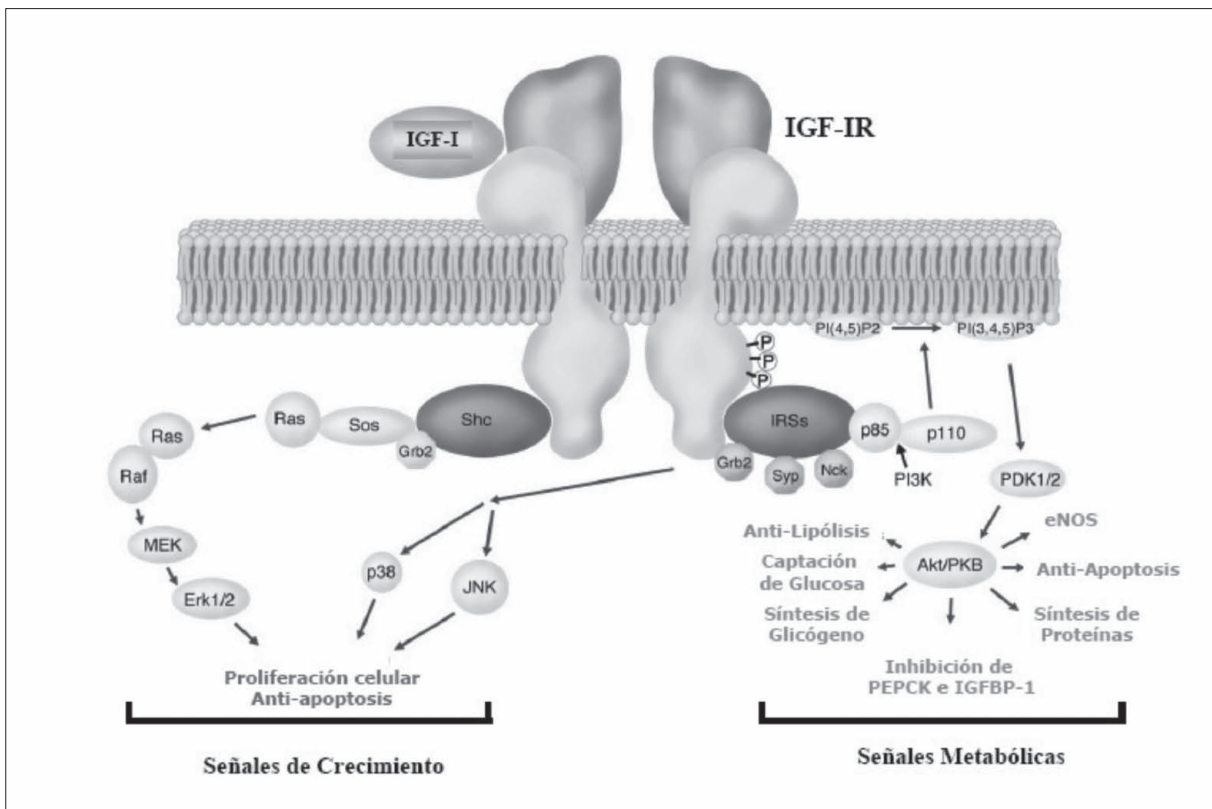


Figura 1. Señalización para receptor tipo 1 de IGF-I

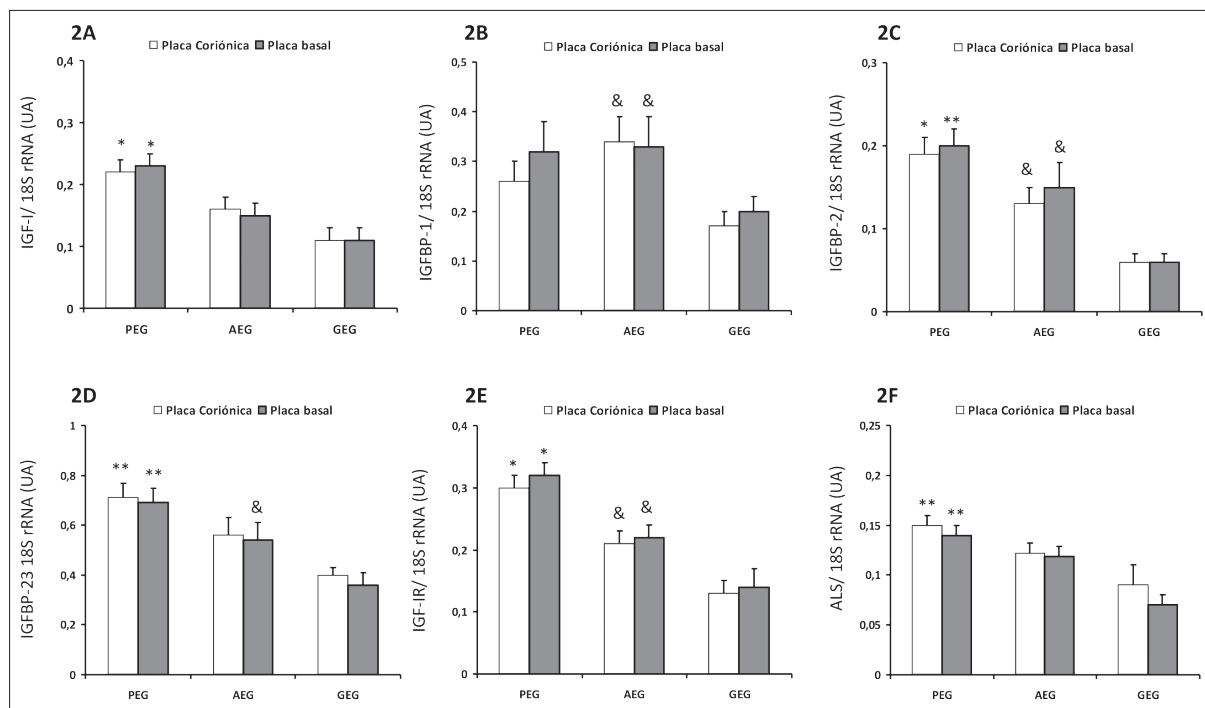


Figura 2. Expresión génica de IGF-I (A), IGFBP-1 (B), IGFBP-2 (C), IGFBP-3 (D), IGF-IR (E) y ALS (F) en placentas humanas de término. Se muestran los contenidos de los mRNA tanto en la placa coriónica como basal de las placentas PEG, AEG y GEG. Los resultados se expresan como promedio ± error estándar.

* p<0.05 PEG vs AEG y GEG; ** p<0.05 PEG vs GEG; & p<0.05 AEG vs GEG.

Una de las principales funciones de la placenta es el transporte de nutrientes maternos al feto, modulando la transferencia de casi todos los nutrientes y gases entre la madre y el feto. Además, es capaz de producir una gran variedad de hormonas y factores de crecimiento⁹, ya que diversos componentes del eje somatotrófico son expresados por la placenta humana¹⁰.

Una expresión prenatal alterada de IGFs y/o su receptor puede influir sobre el crecimiento fetal. Polimorfismos de *igf1* se han relacionado con el peso y talla de nacimiento y mutaciones en IGF-IR se han documentado en niños nacidos PEG^{11, 12}. En ratones, se ha mostrado que deleciones para *igf1* o *igf2* se asocian con pesos de nacimiento un 40% inferior a lo normal¹³. En la especie humana, deleciones en *igf1* o mutaciones en el receptor se han asociado con restricción del crecimiento intrauterino^{11,14}. Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado en detalle el papel del eje somatotrófico placentario sobre el crecimiento fetal en el ser humano. Por este motivo, nos planteamos estudiar la expresión y contenidos de IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, ALS e IGF-IR en placentas humanas de término de recién nacidos normales y con alteraciones del crecimiento fetal.

Expresión placentaria de los mRNA de *igf1*, *igf2*, *igfbp1*, *igfbp2*, *igfbp3*, *als* e *igfir*

Estudiamos la expresión de los distintos componentes del eje somatotrófico placentario en 30 niños PEG, 35 niños AEG y en 28 niños GEG, clasificados de acuerdo a las tablas de peso de nacimiento vigentes en Chile¹⁵. Las placentas recogidas se procesaron dentro de una hora y se obtuvieron trozos de la placa basal (materna) y de la placa coriónica (fetal)¹⁶. La expresión génica fue estudiada en las placentas mediante RT-PCR. Encontramos que la expresión del mRNA para IGF-I es alrededor de un 33% mayor, tanto en la placa basal como en la placa coriónica, de las placentas PEG en comparación a las placentas AEG y en alrededor de un 50% mayor en comparación con las placentas GEG¹⁷ (Fig. 2A).

La expresión del mRNA para IGF-II fue un 34% mayor en la placa basal de las placentas PEG en comparación con las GEG, no encontrando diferencias en la placa coriónica¹⁷. La expresión del mRNA de IGFBP-1 fue similar entre las placentas PEG y AEG, pero fue mayor en las placentas AEG comparadas con las GEG, tanto en la placa coriónica como en la basal (Fig. 2B). Por otro lado, la expresión del mRNA de IGFBP-2 e IGFBP-3 fue mayor, tanto en la placa coriónica como en la placa basal, de las placentas PEG en comparación con las placentas GEG (Figs. 2C-D). El contenido del mRNA para IGF-IR fue un 50% mayor en las placentas PEG comparadas con las GEG y el contenido en las placentas AEG fue un 35% mayor al encontrado en las placentas GEG (Fig. 2E).

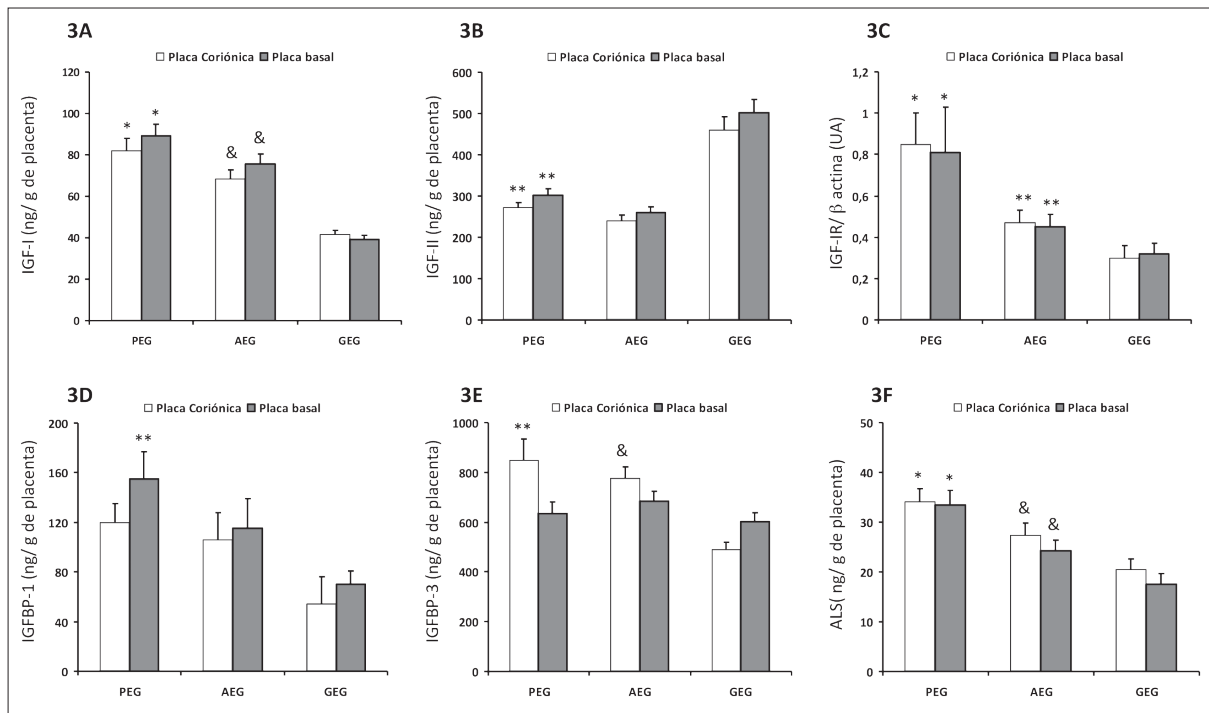


Figura 3. Contenido proteico de IGF-I (A), IGF-II (B), IGF-IR (C), IGFBP-1 (D), IGFBP-3 (E) y ALS (F) en placentas humanas de término. Se muestran los contenidos proteicos tanto de la placa coriónica como basal de las placentas PEG, AEG y GEG. Los resultados se expresan como promedio \pm error estándar.

* $p < 0.05$ PEG vs AEG y GEG; ** $p < 0.05$ PEG vs GEG; & $p < 0.05$ AEG vs GEG.

Más recientemente hemos descrito, por primera vez, que la placenta humana es capaz de expresar el mRNA para ALS¹⁸, encontrando además que el contenido del mRNA para ALS es mayor tanto en la placa coriónica como en la placa basal de las placentas AEG. Además, la expresión del mRNA de ALS es mayor en las placentas PEG en comparación a las placentas GEG (Fig. 2F). Estos resultados demuestran que la placenta humana expresa los principales componentes del eje somatotrófico y que la expresión del mRNA de estos genes varía de acuerdo al peso al nacimiento.

Contenido proteico placentario de IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3, ALS e IGF-IR

Una vez determinada la expresión génica de estos componentes del eje somatotrófico en la placenta humana, hemos estudiado sus contenidos proteicos placentarios e investigado si existen diferencias de acuerdo al peso al nacimiento. Para realizar estos estudios realizamos homogeneizados tanto de la placa coriónica como de la basal en las placentas y determinamos los contenidos proteicos utilizando inmunoensayos para IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-2, IGFBP-3 y ALS mediante *Western blot* para IGF-IR.

El resultado de estos estudios indica que el contenido proteico placentario de IGF-I, en concordancia a

lo encontrado para su mRNA, es mayor tanto en la placa coriónica como basal de las placentas PEG respecto a las placentas AEG y GEG¹⁷ (Fig. 3A). Sin embargo, el contenido placentario de IGF-II es mayor en las placentas GEG comparadas con las placentas PEG (Fig. 3B). El contenido placentario de IGF-IR fue mayor tanto en la placa coriónica como en la basal de las placentas PEG en comparación con las placentas GEG (Fig. 3C). Por otro lado, el contenido de IGFBP-1 es mayor tanto en la placa basal como en la coriónica de las placentas PEG comparadas con las placentas GEG (Fig. 3D). Sin embargo, no encontramos diferencias en el contenido de IGFBP-2 entre las placentas PEG y AEG. El contenido proteico placentario de IGFBP-3 es particularmente alto en la placa coriónica de las placentas PEG comparadas con las GEG (Fig. 3E). De manera similar, el contenido proteico placentario de ALS fue mayor sólo en la placa coriónica de las placentas PEG en comparación con las GEG (Fig. 3F).

Conclusiones

Los resultados de nuestros estudios demuestran que la placenta humana expresa el mRNA y la proteína para diversos componentes del eje somatotrófico. Nuestros resultados demuestran que IGF-I, IGFBP-3, ALS e IGF-IR tienen una mayor expresión y contenido en las placentas PEG en comparación a las placentas GEG, particularmente en su placa

coriónica. Esto nos permite postular que variaciones en la expresión y contenido de los componentes del eje somatotrófico podrían representar un mecanismo compensatorio de la placenta en respuesta a una restricción del crecimiento fetal. Este mecanismo compensatorio se podría traducir en un aumento de la captación de glucosa y un incremento en el transporte de aminoácidos para el feto con crecimiento inadecuado. De igual manera, los contenidos menores hallados en las placentas GEG en comparación a las AEG, podrían representar un mecanismo de readecuación en respuesta al mayor crecimiento fetal de los niños GEG.

Bibliografía

- Ergaz Z., Avgil M., Ornoy A. Intrauterine growth restriction; etiology and consequences: what do we know about the human situation and experimental animal models. *Reprod Toxicol.* 2005, 20: 301–322.
- Ornoy A. Prenatal origin of obesity and their complications: gestational diabetes, maternal overweight and the paradoxical effects of fetal growth restriction and macrosomia. *Reprod Toxicol.* 2011, 32:205-212.
- Calkins K, Devaskar SU. Fetal origins of adult disease. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 2011, 41:158-176.
- Tricoli JV, Rall LB, Scott J, Bell GI, Shows TB. Localization of insulin-like growth factor genes to human chromosomes 11 and 12. *Nature* 1984, 310:784-786.
- Domené HM, Hwa V, Jasper HG, Rosenfeld RG. Acid-labile subunit (ALS) deficiency. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011, 25:101-113.
- Blakesley VA, Scrimgeour A, Esposito D, Le Roith D. Signaling via the insulin-like growth factor-I receptor: does it differ from insulin receptor signaling? *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996, 7:153-159.
- Braun S, Bitton-Worms K, LeRoith D. The link between the metabolic syndrome and cancer. *Int J Biol Sci.* 2011, 7:1003-1015.
- Desoye G, Gauster M, Wadsack C Placental transport in pregnancy pathologies. *Am J Clin Nutr.* 2011, 94(6 Suppl):1896S-1902S.
- Paolini CL, Marconi AM, Ronzoni S, Di Noio M, Fennessey PV, Pardi G, Battaglia FC Placental transport of leucine, phenylalanine, glycine, and proline in intrauterine growth-restricted pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001, 86:5427-5432.
- Han VK, Bassett N, Walton J, Challis JR. The expression of insulin-like growth factor (IGF) and IGF-binding protein (IGFBP) genes in the human placenta and membranes: evidence for IGF-IGFBP interactions at the feto-maternal interface. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996, 81:2680-2693.
- Abuzzahab MJ, Schneider A, Goddard A, Grigorescu F, Lautier C, Keller E, Kiess W, Klammt J, Kratzsch J, Osgood D. IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation. *N Engl J Med.* 2004 349: 2211–2222.
- Walenkamp MJE, van der Kamp HJ, Pereira AM, Kant SG, van Duyvenvoorde HA, Kruithof MF, Breuning MH, Romijn JA, Karperien M, Wit JM. A variable degree of intrauterine and postnatal growth retardation in a family with a missense mutation in the insulin-like growth factor I receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 2006, 91: 3062–3070.
- Novitskaya T, Baserga M, de Caestecker MP. Organ-specific defects in insulin-like growth factor and insulin receptor signaling in late gestational asymmetric intrauterine growth restriction in Cited1 mutant mice. *Endocrinology.* 2011, 152:2503-2516.
- Woods KA, Camacho-Hübner C, Savage MO, Clark AJ. Intrauterine growth retardation and postnatal growth failure associated with deletion of the insulin-like growth factor I gene. *N Engl J Med.* 1996, 335: 1389-1391.
- González RP, Gómez RM, Castro RS, Nien JK, Merino PO, Etchegaray AB, Carstens MR, Medina LH, Viviani PG, Rojas IT. Curva nacional de distribución de peso al nacer según edad gestacional: Chile, 1993 a 2000. *Rev Med Chile* 2004, 132: 1155-1165.
- Wyatt SM, Kraus FT, Roh CR, Elchahal U, Nelson DM, Sadovsky Y. The correlation between sampling site and gene expression in the term human placenta. *Placenta.* 2005, 26:372-379.
- Iñiguez G, González CA, Argandoña F, Kakarieka E, Johnson MC, Cassorla F. Expression and protein content of IGF-I and IGF-I receptor (IGF-IR) in placentas from small, adequate and large for gestational age newborns. *Horm Res Paediatr* 2010, 73:320 -327.
- Iñiguez G, Argandoña F, Medina P, González C, San Martín S, Kakarieka E, Johnson MC, Cassorla F. Acid-labile subunit (ALS) gene expression and protein content in human placentas: differences according to birth weight. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011, 96:187-191.