

ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO RS4966035 DEL GEN IGF1R CON EL CRECIMIENTO POSTNATAL

Agner Russo Parra Sánchez (1), María Esther Macías Martínez (2), Marion Velázquez Villafaña (2),
Dr. Rubén Rangel Salazar (2), Rosa Edith Arenas Lugo (2), Dra. Martha Alicia Hernández González
(3), Dra. María Luisa Lazo de la Vega Monroy (2).

1 Médico Cirujano, Universidad del Zulia, Venezuela | Dirección de correo electrónico: arparras@gmail.com

2 Departamento de Ciencias Médicas, División de Ciencias de la Salud, Campus León, Universidad de Guanajuato | Dirección de correo electrónico: marialuisaqfb@yahoo.com.mx

3 HGZ con UMF 21, IMSS, León, Guanajuato.

Resumen

Introducción: La recuperación del crecimiento en los primeros meses de vida es deseable en niños con peso bajo al nacimiento, pero se ha relacionado con adiposidad, resistencia a la insulina y enfermedades cardiovasculares. La variabilidad genética en el sistema IGF juega un papel importante en la génesis de estas alteraciones. El IGF1 y su receptor IGF1R son los componentes del sistema que mejor se relaciona con el peso del feto, observándose alteraciones en su concentración circulante en condiciones en las cuales el crecimiento fetal se ve comprometido. **Objetivo:** Analizar la frecuencia de polimorfismos de un solo nucleótido en el gen IGF1R (rs4966035) en infantes nacidos a término de madres sanas, y evaluar su asociación con el peso al nacimiento y el crecimiento postnatal en población mestiza mexicana del Bajío. **Materiales y métodos:** Se seleccionaron 57 pacientes de 9 a 13 meses de edad productos de embarazos sanos. Se genotipificó la presencia o ausencia del polimorfismo y se asoció con crecimiento postnatal temprano. **Resultados y discusión:** Se observó una correlación negativa entre el número de alelos A (el de menor frecuencia, o "alelo de riesgo") y el crecimiento a los 5-7 meses con tendencia de peso bajo al nacimiento cuando los pacientes presentan el alelo de riesgo. **Conclusiones:** La presencia del alelo A del polimorfismo rs4966035 se asocia con menor crecimiento postnatal temprano.

Abstract

Introduction: The recovery of growth in the first months of life is desirable in children with low birth weight but has been linked to adiposity, insulin resistance and cardiovascular disease. Genetic variability in the IGF system plays an important role in the genesis of these disorders. The IGF1 and its receptor IGF1R are highly correlated to fetal weight, observing alterations in circulating concentration under conditions in which fetal growth is compromised. **Objective:** To analyze the frequency of a single nucleotide polymorphism in the IGF1R gene (rs4966035) in infants born at term from healthy mothers, and evaluate its association with birth weight and postnatal growth in Mexican population of Bajío. **Materials and Methods:** 57 patients, aged 9 to 13 months old products of healthy pregnancies were selected. The presence or absence of polymorphism was genotyped and was associated with early postnatal growth. **Results and discussion:** a negative correlation between the number of alleles A (the lower frequency, or "risk allele") and growth at 5-7 months with a tendency of low birth weight was observed when patients have allele risk. **Conclusions:** The presence of the A allele of the rs4966035 polymorphism is associated with decreased early postnatal growth.

Palabras Clave

IGF1R, Crecimiento Postnatal, Polimorfismo.

INTRODUCCIÓN

El crecimiento compensatorio o “catch up” se define como la velocidad de crecimiento mayor que la media, dada para una edad cronológica y para el sexo. Se presenta principalmente en niños que nacen con un déficit en el desarrollo, principalmente en peso durante los primeros dos años de vida [1]. La ganancia de peso en recién nacidos, principalmente los nacidos con bajo peso al nacer, es un aspecto muy importante y deseable, principalmente en ciudades en desarrollo, en donde la ganancia rápida de peso puede ser un factor de protección para los recién nacidos contra la alta incidencia de infecciones durante la etapa postnatal. Cuando este crecimiento compensatorio se presenta con una velocidad mayor de la normal, o con una ganancia de peso por arriba de la media estipulada, los infantes presentan una predisposición mayor a presentar obesidad y una disminución en la sensibilidad a la insulina en años posteriores. [2] Durante estos últimos años, se han publicado diversos trabajos en donde se relaciona el rápido crecimiento compensatorio con la disminución de sensibilidad a la insulina y aumento de grasa visceral [1]. La ganancia excesiva de peso en infantes, que se define como la ganancia de peso por arriba del percentil 90, a las 6 semanas, 3 meses y 6 meses se ha asociado con un aumento en el riesgo de padecer obesidad a los 7 y 8 años. [2]

Durante las primeras semanas posteriores al nacimiento, los niños con SGA presentan bajas concentraciones de insulina, IGF-I e IGFBP3 sugiriendo que las hormonas que promueven el crecimiento *in útero* desvían los nutrientes para el desarrollo y supervivencia de órganos vitales, en vez de usarlos para el crecimiento somático. La normalización de estos parámetros ocurre dentro de los primeros 3 meses de la etapa postnatal. Durante el desarrollo fetal, los tejidos se encuentran expuestos a una baja concentración de insulina e IGF-I, en cambio, poco tiempo después del nacimiento, estas concentraciones aumentan de forma importante lo que puede llevar a una resistencia a la insulina como un mecanismo protector para evitar la hipoglucemia. [1]

En estudios realizados con un escáner de absorciometría de doble energía de rayos X (DXA) reveló que entre los 2 y 4 años los niños que nacen con SGA ganan más grasa abdominal y

grasa total corporal y menos tejido magro que los niños nacidos con peso adecuado (AGA, por sus siglas en inglés Anormal for Gestational Age) [3]. Este fenómeno de recuperación de masa grasa predomina sobre la reconstitución del tejido muscular y se presenta también en pacientes que se recuperan de pérdidas de peso severas. A la misma edad, los niveles de insulina en ayuno se encuentran disminuidos, así como los niveles de IGF-I. De los 2 a los 4 años los niveles de IGF-I se normalizan con los niveles de concentración que presentan los niños con AGA. [4]

Los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF's) constituyen una familia de péptidos que dependen, en parte de la hormona del crecimiento (GH), y que intervienen en muchas de las funciones en el crecimiento de la misma hormona. IGF-I es un péptido que consta de 70 aminoácidos, muy parecido al IGF-II. Ambos comparten una estructura similar a la de la Insulina, con una homología de hasta un 50%. Los niveles de IGF1 varían continuamente tanto en tejidos como en suero. Se regulan principalmente por hormonas y factores nutricionales. Siendo GH el mayor estimulador postnatal de IGF. En sangre fetal, los niveles de IGF-1 se encuentran relativamente bajos y están relacionados positivamente con la edad gestacional y el peso al nacimiento [5]. Los IGF's se sintetizan en el hígado, y en múltiples tejidos por la acción de la GH. Tienen la acción estimuladora del crecimiento, potencian la acción de la insulina y regulan la proliferación celular. Aunque la expresión de IGF-I es ubicua, el origen de mayor parte del IGF circulante es hepático. [6]

IGF-1 se une a su receptor (El cual es muy parecido al receptor de insulina) 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 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 [5]. IGF-I (Insulin-like growth factor I) y sus proteínas transportadoras (IGFBP's, Insulin-like growth factor binding proteins) se producen en los tejidos fetales desde etapas tempranas del desarrollo y son estimuladores importantes de la división y

diferenciación celular. El IGF-I es el factor de crecimiento que mejor se relaciona con el peso del feto durante la gestación, observándose alteraciones en su concentración circulante en condiciones en las cuales el crecimiento fetal se ve comprometido. [7] Se ha identificado el papel que tienen estas proteínas y sus receptores en el crecimiento fetal.

Desde el descubrimiento de la familia de IGF's se ha ampliado un marco de investigación en cuanto al origen genético que determina algunas características del crecimiento humano [8]. La variabilidad genética es un factor importante en la comprensión de la asociación entre el peso al nacimiento y los padecimientos de la vida adulta. La susceptibilidad genética es importante tanto para el peso al nacimiento como para la diabetes tipo 2, y los genes que reducen la secreción de insulina o aumentan su resistencia podrían predisponer a los nacidos con SGA a enfermedades metabólicas. De manera general, la explicación a la relación entre ambas entidades clínicas se basa en que la secreción de insulina y su acción son los mecanismos que tienen un papel importante en la regulación de los carbohidratos y en el crecimiento fetal [9]. La reproducción de asociaciones entre variantes genéticas comunes y la talla al nacimiento ha sido posible gracias a la asociación del genoma completo (GWA, por sus siglas en inglés Genome-wide association). Estos estudios son capaces de tipificar alrededor de 2.5 millones o más de polimorfismos de un solo nucleótido para ser analizados en miles de individuos en un solo experimento [10]. Los Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP's) de IGF1R son más comunes en niños con talla baja al nacimiento independientemente de su edad gestacional. Las variaciones de estos genes han sido descritas sólo en muy pocos casos, por esta razón la atención se ha enfocado en el estudio funcional de genes promotores involucrados en el crecimiento, buscando nuevos elementos reguladores y factores que pudieran alterar la expresión del gen [11]. La expresión de IGF1R se encuentra disminuida significativamente en las placentas de recién nacidos SGA [12]. El polimorfismo rs4966035 para IGF1R tiene una relación significativa con la diferencia del peso al nacimiento acorde con hallazgos en donde el alelo menor (A-) es más prevalente entre los niños que nacieron con SGA. Este alelo también ha sido asociado con la talla baja y con una mayor susceptibilidad para el nacimiento pre término. De

igual forma, ese polimorfismo se ha relacionado con el índice de secreción de insulina [11]

Por el momento solo algunos casos de polimorfismos de IGF1R se han descrito. La restricción del crecimiento intrauterino y postnatal sin completar el crecimiento compensatorio es la característica central de todos los pacientes que presentan este tipo de variación genética. [13]

Este estudio permite el análisis genético y antropométrico del desarrollo de los infantes para sustentar las bases de un nuevo enfoque de investigación en el sistema IGF como se ha visto en otros países. Este tipo de estudios no se ha realizado en población mexicana, un aspecto de importancia debido a que en México las alteraciones metabólicas tanto en la niñez como en la vida adulta, ya se han catalogado como un grave problema de salud pública. De igual forma, sustenta las bases para un nuevo enfoque en la medicina individualizada, conocer más sobre la genética del desarrollo en la región del bajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se llevó a cabo de acuerdo a los lineamientos establecidos de forma internacional en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Se incluyeron 57 pacientes mestizos mexicanos de la ciudad de León de 9 a 13 meses de edad. Para la realización de este trabajo, se contó con el consentimiento informado de las madres. Los pacientes fueron captados en el departamento de Enfermería Materno Infantil del Hospital General de Zona UMF 21 del IMSS. Se recolectaron datos del peso, talla, perímetro cefálico y edad gestacional al momento del nacimiento por medio del expediente en una hoja de captura de datos. Se ubicaron los pacientes en el percentil correspondiente para la edad gestacional de acuerdo a las gráficas de crecimiento intrauterino de Jurado-García reportadas en la NOM-007-SSA2-1993 [15] y a las tablas de distribución de percentiles del peso al nacimiento de Flores y Martínez [16]. Se excluyeron a los pacientes cuyas madres presentaron enfermedades metabólicas durante el embarazo o cuya muestra no pudo ser genotipificada por cuestiones técnicas (p. ej. degradación de DNA). Se obtuvieron muestras de raspado bucal. Se depositaron en buffer de lisis TSNT, de las que se extrajo el ADN con proteinasa

K, fenol saturado, Sevag, TE 1X, etanol puro y etanol al 70%. La pureza del ADN fue evaluada por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Para la Genotipificación se utilizaron 3µL de ADN genómico para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligos fueron diseñados en la plataforma de Primer-Blast con la secuencia obtenida de la base de datos en NCBI. Se amplificó un segmento de 598 pb el cual contiene un sitio de corte para la enzima de restricción TaqI (Invitrogen™), en la secuencia 5'- T↓CG A-3'. Se tomaron 10 µL de PCR obtenida para digerir con 1 U de la enzima de restricción TaqI en un volumen total de 20 µL, se incubó 60 min a 65°C. Se evaluó la existencia de amplificación por electroforesis en geles de agarosa al 2% y la digestión por electroforesis en geles de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio. Si existe la digestión, se obtienen fragmentos de 439 y 158 pb lo que indica como la presencia del SNP y el genotipo GG. Mientras que de no haber digestión se confirma la presencia del genotipo de riesgo AA. Para alelos heterocigotos AG se observa un patrón de tres bandas de 598pb, 439pb y 158pb. (Figura 1)

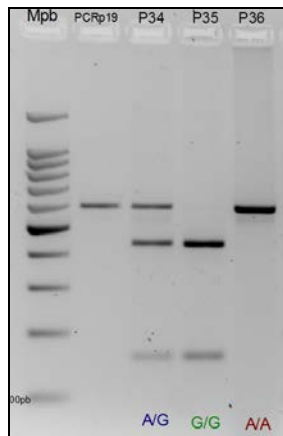


Figura 1: Digestión enzimática con TaqI para el SNP rs4966035. Se observan los tres genotipos y su patrón de bandas.

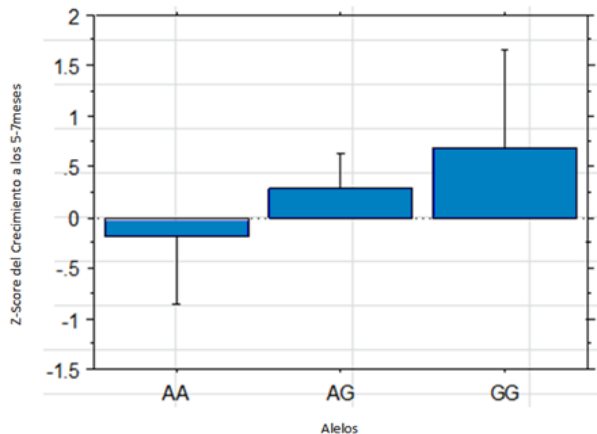


Figura 2: Comparación entre genotipo y diferencia entre peso al nacimiento (W/A) y peso a los 5-7meses.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

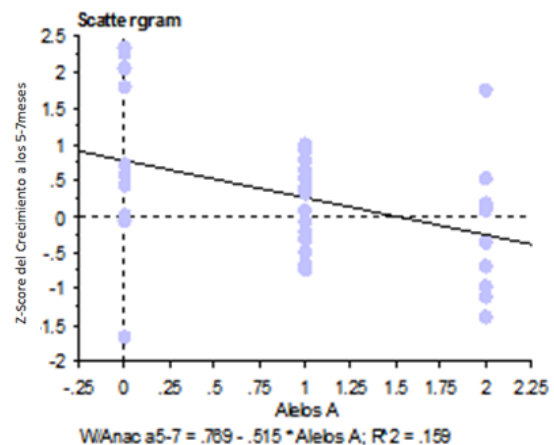
Los individuos reclutados, fueron en promedio de 9.14 meses de edad. Del total de los individuos 40% fueron del sexo masculino y 60% del sexo femenino; producto de embarazos de madres de 27.3 años de edad en promedio. La población de pacientes estudiada es perteneciente la ciudad de León. Se ha reportado que, en población americana descendientes de mexicanos, la menor frecuencia alélica (MAF) pertenece al alelo ancestral (A) con un 0.47 [9]. De acuerdo a la población estudiada, como se observa en la Tabla 1, efectivamente tenemos una MAF para el alelo A. Las frecuencias alélicas se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg ($p > 0.05$).

Tabla 1. Frecuencias alélicas y equilibrio de Hardy-Weinberg para el polimorfismo rs4966035.

Genotipo	AA	AG	GG
Observados	14	26	17
Esperados	12.79	28.42	15.79
Frecuencia H-W	-22.44%	-49.86%	-27.70%
Frecuencia Alélica	A= 54 (47.37%)	G= 60 (52.63%)	P=0.5201

Se realizó un análisis tomando como variables dependientes el peso al nacimiento y el crecimiento postnatal a los 5 – 7 meses y como variable independiente el SNP y se compararon las diferencias en la frecuencia por medio de la prueba de análisis de varianza (ANOVA). Se observó que en relación al peso al nacimiento y

posteriormente a una edad de 5 – 7 meses, los pacientes con el alelo A, muestran un crecimiento menor mientras que los pacientes con el alelo G, muestran un crecimiento mayor. Figura 2. Estos resultados se corresponden con lo encontrado en



un estudio realizado en población europea [14] donde el alelo A fue significativamente más frecuente entre SGA y asociado con menor longitud al nacer ($p = 0,000378$) y el peso al nacer (asociación más débil), independiente de la edad gestacional. Lo que podría sugerir en que el SNP influye en el funcionamiento del receptor IGF1R, alterando el curso del crecimiento tanto pre como postnatal mediado por el sistema IGF.

También fue comparado el genotipo con el peso al nacer, así como el porcentaje de masa grasa, sin embargo, no hubo ninguna diferencia significativa en presencia o no del alelo de riesgo.

CONCLUSIONES

Es necesario aumentar el número de individuos para corroborar los resultados, sin embargo, este estudio preliminar indica que el polimorfismo podría estar teniendo efecto en el crecimiento postnatal temprano, lo cual sienta una base importante para posteriores estudios en población mexicana.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Guanajuato, por la oportunidad. A todo el equipo de laboratorio, especialmente a la Dra. María Luisa Lazo y al Dr. Rubén Rangel Salazar, gracias por toda la ayuda

prestada para el desarrollo de la investigación. Al Instituto Mexicano de Seguro Social, la Dra. Martha Hernández y la colaboración técnica de la Enf. Emma Cruz Patlán. Este proyecto fue apoyado por PRODEP UGTO-PTC-443.

REFERENCIAS

[1] Vandana, J. S., Atul (2012). "Catch up growth in low birth weight infants: Striking a healthy balance." *Rev Endocr Metab Disord* 13: 141-147.

[2] Gerthe Kerkof, K. H., Anita C.S. (2012). "Rate of neonatal weight gain and effects on adult metabolic health. *Nature Reviews, Endocrinology*." *Nature Reviews, Endocrinology* 8: 689-692.

[3] AG Dulloo, J. J., J Seydoux, J-P Montani (2006). " The thrifty catch-up2 phenotype: its impact on insulin sensitivity during growth

trajectories to obesity and metabolic syndrome." *International Journal of Obesity*. 30: 23-35.

[4] Ibañez, L. O., Ken; Dunger, David B.; Zegher Francis (2006). "Early Development of Adiposity and Insulin Resistance after Catch-Up Weight Gain in Small-for-Gestational-Age Children." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91(6): 2153-2158.

[5] Cohen, P. (2006). "Overview of IGF-I System." *Horm Res* 658: 3-8

[6] Granada-Ybern, M. L. (2006). "Factor de crecimiento similar a la insulina y sus proteínas de transporte." *Endocrinol Nutr* 53(7): 467-475

[7] Tillmann Wallborn, S. W., Jugen Klammt, Tassilo Kruis, Jugen Kratzsch, Gabriele Schmidt, Marina Shlick, Eva Muller, Hildegard Schmitz van de Leur, Wieland Kiess, Roland Pfaffle (2010). "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." *J Clin Endocrinol Metab* 95(5): 2316-2324.

[8] Ogata, T. (2003). "Genetics of Human Growth." *Clin Pediatr Endocrinol* 15(2): 45-53.

[9] M.F. Faienza, F. M., A.M. Ventura, M. Wasniewska, M. Valenzise, A. Valletti, M.F. Caratozzolo, S. Cornacchia, E. Sbisà, L. Cavallo, A. Tullo. (2011). "Regulation of IGFBP3 gene expression in short children born small for gestational age." *Growth Hormone & IGF Research* 21: 349-355.

[10] Yaghoobkar, H. F., Rachel M (2012). "Genetic origins of low birth weight." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 15: 258-264.

[11] María Luisa Lazo de la Vega Monroy, M. G. D., Leonel Daza Benítez, Gloria Barbosa Sabanero. (2015). "Expresión del receptor de IGF1R y la vía de Akt en la placenta de recién nacidos pequeños para la edad gestacional." *Rev Mex Endocrinol Metab Nutr* 2: 5-10.

[12] Landmann, E. K., Barbara; Kreuder, Joachim Gerhard; Blum, Werner Friedrich; Kronenberg, Florian; Rudloff, Silvia (2012). "Influence of Polymorphisms in Genes Encoding for Insulin-Like Growth Factor (IGF)-1, Insulin, and IGF-Binding Protein (IGFBP)-3 on IGF-I, IGF-II, and IGFBP-3 Levels in Umbilical Cord Plasma." *Hormone Research in Paediatrics* 77: 341-350.

[13] 26. W.A. Ester, A. C. S. H.-K. (2008). "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* 22(3): 415-431.

[14] 21. L.C.G. de Graaff, A. J. L. C., M. Tauber, M.B. Ranke, L.B. Johnston, J. Caliebe, C. Molinas, N. Amin, C. Van Duijn, H. Wollmann, H. Wallaschofski, M.O. Savage, A.C.S. Hokken-Koelega (2013). "Association Analysis of Ten Candidate Genes in a Large Multinational Cohort of Small for Gestational Age Children and Children with Idiopathic Short Stature" *Horm Res Paediatr* 80: 466-476.

[15] Capurro H, Konichezky S, Fonseca D, Caldeyro-Barcia R. A simplified method for diagnosis of gestational age in the newborn infant. *J Pediatr* 1978; 93: 120-2.

[16] Flores-Huerta, S. M.-S., Homero (2004). "Peso al nacer de los niños y niñas derechohabientes del Instituto Mexicano del Seguro Social." *Bol Med Hosp Infant Mex* 69(1): 30-39.