

# Estudio de la expresión génica de los factores de crecimiento IGFI y EGFR en tejido placentario procedente de gestaciones con retraso de crecimiento intrauterino

M.T. Calvo<sup>a</sup>, A. Romo<sup>b</sup>, J.I. Gutierrez<sup>a</sup>, E. Relación<sup>a</sup>, E. Barrio<sup>a</sup> y A. Ferrández Longás<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Genética Molecular. <sup>b</sup>Unidad de Neonatología. <sup>c</sup>Unidad de Endocrinología. Hospital Infantil Miguel Servet. Zaragoza.

## INTRODUCCIÓN

Todo proceso capaz de limitar, interrumpir o interferir durante la vida intrauterina el potencial de crecimiento del feto provocará un crecimiento intrauterino retardado (RCIU)<sup>1,2</sup>.

El RCIU es un problema muy importante de salud pública en la mayoría de los países desarrollados. Las causas son múltiples e interactivas y su importancia relativa varía con el tiempo, lugar y población<sup>3,4</sup>.

El crecimiento fetal debe estar controlado a nivel celular y tisular por los nutrientes proporcionados y/o por factores activos localmente por ejemplo los IgF<sup>5,6</sup>, la GH placentaria<sup>7,8</sup> y otros factores de crecimiento. El hecho de que factores de crecimiento de origen placentario: EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas), IGF (factor de crecimiento similar a la insulina), TGF $\alpha$  (factor de crecimiento transformador tipo  $\alpha$ ) actúen localmente favoreciendo el desarrollo y diferenciación de la placenta, y que desde el punto de vista general, actúen se centra en competencias inmunológicas, hacen que se otorgue a la placenta funciones importantes en el desarrollo y regulación del crecimiento fetal.

Todos los tejidos fetales incluida la placenta expresan mRNA mensajero de IGFI<sup>9,10</sup>. La concentración de IGFI en plasma materno correlaciona con el crecimiento fetal<sup>11,12</sup>. IGFI, IGFI y insulina materna aunque no cruzan la placenta, por lo que no tienen efecto directo en el crecimiento fetal, si que poseen influencia directa en la función placentaria<sup>13,14</sup>.

Existen en la bibliografía diferentes trabajos confirmando que la concentración de IGFI en sangre fetal y cordón umbilical se correlaciona con el tamaño del feto. Por otra parte, cuando se trasplantan embriones de ratón que

producen gran cantidad de IGFI en embriones de ratón normal se produce un estímulo del crecimiento superior a cuando al ratón normal se le trasplantan embriones con una secreción escasa en IGFI<sup>15</sup>.

El factor de crecimiento epidérmico (EGF), es un polipéptido de cadena única, con un peso molecular de aproximadamente 6.000, estimula la proliferación y diferenciación en muchas clases de células y tejidos<sup>16-18</sup>. El EGFR, glicoproteína de 170.000 dalton, ha sido también intensamente estudiada y localizado en el cromosoma 17, en la región p13-q22.

El receptor de crecimiento epidérmico EGFR es un receptor celular de superficie, con un dominio externo, un dominio transmembrana y un dominio intracelular con actividad tirosinkinasa. Perteneció al grupo de receptores transmembrana homólogos con actividad tirosinkinasa como c-erbB2, c-erbB3 y c-erb B4. Los ligandos de este receptor incluyen el EGF, factor alfa de crecimiento transformación (TGF $\alpha$ , la amphiregulina, cripto EGF y EGF que se une a la heparina. De éstos, EGF y TGF $\alpha$  están implicados en la carcinogénesis. *In vitro*, EGFR y sus ligandos están implicados en la transformación maligna vía autocrina y paracrina del mecanismo del crecimiento. *In vivo*, la sobreexpresión de EGFR se ha reportado en numerosos cánceres, especialmente en el carcinoma de células escamosas, y se cree que se relacione con el mal pronóstico. Sin embargo, existen publicaciones que muestran que algunos tejidos normales expresan EGFR a más altas concentraciones que sus homólogos malignos<sup>19,20</sup>.

El mecanismo primario que regula el nivel de EGFR es la abundancia de su mRNA. Está codificado por un gen con dos transcritos de RNA de 10,5 kb y 5,8 kb. Parece que cada transcrito se expresa de forma diferente durante diversos estadios del desarrollo placenta-

rio, y además hay otro transcrito putativo del EGFR de 1,8 kb que codifica solo el dominio de unión del receptor<sup>21,22</sup>.

Se han realizado numerosos estudios con EGF y EGFR, y los aspectos biológicos han alcanzado mucho interés. El importante papel de EGF se ha demostrado en el crecimiento fisiológico y neoplásico de tejido mamario y en la espermatogénesis del ratón. Se ha demostrado que el nivel de EGF se incrementa en glándula submandibular y plasma durante el embarazo y que su deficiencia causa aborto y RCIU en ratón. También se ha demostrado que EGFR y su mRNA se incrementa durante el embarazo en placenta humana y en células trofoblásticas aisladas y sugieren que EGF juegue un papel en el desarrollo fetoplacentario<sup>23</sup>.

Se expresa fuertemente en placenta humana y se incrementa la expresión a lo largo de la gestación. La diferente expresión de EGFR y sus ligandos sugieren un papel diferente de los ligandos de EGF a lo largo de la gestación. Al comienzo parece estimular la proliferación y poder de invasión del citotrofoblasto implicado en la implantación. Mas tarde, a partir de la 6ª semana EGF estimula la diferenciación del citotrofoblasto a sincitiotrofoblasto.

## OBJETIVO

El objetivo de este trabajo ha sido el análisis de la expresión de los genes del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF1) y el receptor de crecimiento epidérmico (EGFR) en tejido placentario de gestaciones normales y de retrasos de crecimiento intrauterino (RCIU) en un intento de aportar explicaciones a la etiología del proceso. Se ha utilizado la RT-PCR relativa como método más sensible del estudio comparativo.

## MATERIAL

Grupo control: Constituido por 42 muestras de placenta procedentes de gestaciones normales, sin antecedentes familiares ni personales de interés.

Grupo CIR: Se recogieron 31 muestras de tejido placentario de gestaciones con fetos CIR en los que se descartó el origen genético, malformativo, etc. del retraso de crecimiento.

## MÉTODO

### Recogida de la muestra

En todas las ocasiones, la muestra placentaria se obtuvo inmediatamente después de producirse el período expulsivo, en el propio paritorio o en quirófano cuando la finalización del parto fue por cesárea.

Se tomaron dos muestras de unos 3 mm<sup>3</sup> (aproximadamente 30-35 mg) Con ayuda de tijeras de disección, se profundizó 1 o 2 cm de la superficie de la placenta para evitar la capa más superficial donde, por el desgarro ge-

nerado al desprenderse del endometrio, las células pueden estar dislaceradas y, por consiguiente, el RNA mas degradado. El lugar de la muestra se eligió a unos 2 cm desde la inserción del cordón umbilical e intentado evitar las zonas de gran acúmulo sanguíneo.

Rápidamente se lavaron en Na<sub>2</sub>Cl estéril y frío para hemolizar hematíes y después se sumergieron en un protector del RNA (RNA later. Ambion) que permite conservarlo hasta 1 semana a temperatura ambiente. No obstante, siempre que fue posible, se procedió seguidamente a la extracción del RNA, o se congeló hasta su extracción en la misma jornada laboral.

*Extracción del RNA:* Se siguieron las instrucciones del fabricante del kit Qiagen. Este método está basado en hacer pasar a través de una matriz incluida en unas columnas, las células del tejido que previamente ha sido homogeneizado. El RNA queda atrapado en dicha matriz y, después de una serie de lavados, se libera y eluye en agua destilada o TE. Se comprueba la cantidad y calidad del RNA extraído en un gel de agarosa al 2% y se procede seguidamente a la reacción de RT-PCR y el resto de la muestra se conserva a -20 °C.

*RT-PCR.* Se ha utilizado el kit Ambion siguiéndose las indicaciones del fabricante.

Se mezclan aproximadamente 1-2 mg de RNA con 4 ml de DNTP y 2 ml de oligodecámeros en un pequeño volumen de agua destilada estéril y se colocan a 70-85 °C durante 3 min. e inmediatamente se para la reacción introduciendo el tubo en hielo. Se añade un inhibidor de la RNasa y el enzima la transcriptasa reversa con su buffer. Permanecerá durante 1 hora a 42-44 °C y luego a 92 °C durante 10 min, para detener la acción del enzima. En este punto, en el tubo ya tenemos cDNA que podremos conservar casi indefinidamente a -20 °C o continuar con la reacción de la PCR.

### RT-PCR relativa

La RT-PCR relativa compara la abundancia de transcrito entre múltiples muestras por coamplificación de un control interno con el cADN en estudio, lo que permite una normalización para diferentes cantidades de ARN de las muestras. Para ello se utiliza QuantumRNA Competimer (Ambion). Se utiliza con el control interno 18srRNA como ideal para la mayoría de los experimentos, así se diseña una PCR múltiplex con los primers de 18s, Competimer y específicos del gen en estudio<sup>25,26</sup>.

Primers IGF1: 5'- CACGGCTGGACCGGAGACGC-3'  
 5'- GACCCAGAAGGAAGTACATTTG-3'  
 EGFR: 5'- GGAGGAAAAGAAAGTTTGCCAAGG-3'  
 5'- GAAATTTACAGGAAATCCTGCATGG-3'

La PCR se realizó en un volumen final de 25 ml con 1-2 ml de cDNA, 1,2 U de Taq polimerasa, 1-2 ml de la mezcla 18S/competimer y 1-2,5 ml del primer específico.

El programa consistió en 5 min. a 95 °C, 30 ciclos de 20 s a 94 °C, la hibridación fue a 59 °C durante 30 seg. Y la extensión de 72 °C durante 40 seg. seguidos de una extensión final de 5 min a 72 °C.

El producto PCR se hizo correr en un gel de agarosa al 2% y los resultados se analizaron con un programa informático de análisis de geles que compara áreas de las bandas.

### Análisis estadístico

Se utilizó el análisis comparativo de proporciones entre la intensidad de la banda del control interno y la muestra aplicando el test  $\chi^2$  de Pearson. Se consideró significativa una  $p < 0,05$ .

### RESULTADOS

La RT-PCR relativa<sup>26</sup> es un método más sensible que Northern blot o protección de nucleasas para la valoración de la expresión génica. Es capaz de detectar transcritos moderadamente expresados, incluso con muy pocas células. La RT-PCR requiere que los primers para el gen en estudio sean compatibles con los del control interno y que la tasa de amplificación de ambos genes esté dentro de un rango lineal. Estas condiciones pueden resultar difíciles de optimizar dado que los controles internos comunes se expresan típicamente a un nivel mayor que el transcrito en estudio.

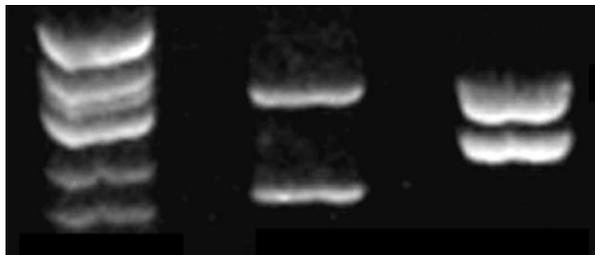
Teóricamente, la cuantificación relativa por RT-PCR puede establecer diferencias en la abundancia de un transcrito particular entre distintas muestras si se controla la cantidad de cDNA que se utilice, y si se usa el número de ciclos en la PCR necesarios sin llegar a sobrepasar la fase exponencial de la amplificación.

Como control interno se ha elegido el RNA ribosómico 18S (rRNA). Sin embargo, como se trata de un transcrito extraordinariamente abundante, es necesario frenar su expresión con un competidor que amplifique con una pareja de primers similares especialmente modificados. Ajustando el porcentaje de 18S/competidor se logra que la coamplificación de lugar a una intensidad de bandas del control y del gen en estudio idéntica.

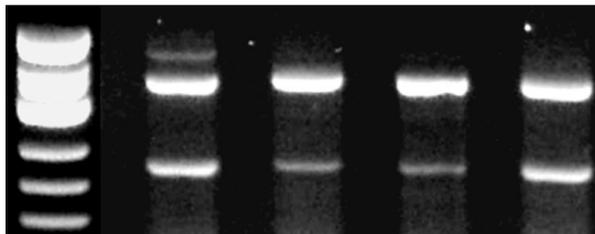
En gel de electroforesis de la figura 1, en la línea 1 corrió el marcador de peso molecular  $\phi$  X174 RF DNA Hinf. III. En la línea 2 se optimizó la proporción 18S/competidor con la expresión de IGFI normal. En el carril 3 se compara control interno con EGFR.

En la figura 2 se muestran los resultados de la amplificación de IGFI de tres placentas CIR (carriles 2, 3 y 4) evidentemente disminuidas en comparación con la de una placenta normal (carril 5). En la línea 1 el marcador de peso molecular  $\phi$  X174 RF DNA Inf. III.

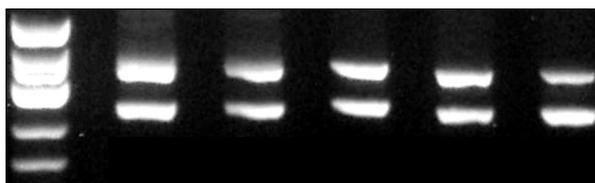
En la figura 3, de igual modo, en las líneas 2, 3 y 4 son muestras de placentas CIR y la 5 es una placenta de gestación normal. No existen diferencias en la expresión entre ellas.



**Figura 1.** 18s: 495 pb. IGFI: 289 pb. EGFR: 363 pb.



**Figura 2.** Línea 1: marcador  $\phi$  X174 RF DNA Hinf. III. Control interno 18S a 495 pb e IgFI a 289 pb.



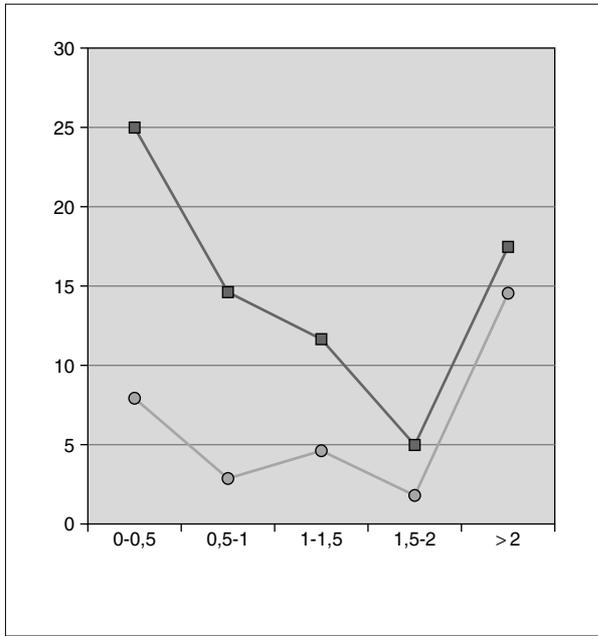
**Figura 3.** Línea 1: marcador  $\phi$  X174 RF DNA Hinf. III. Control interno 18S a 495 pb e EGFR a 363 pb.

El programa informático de análisis de geles, además de otros parámetros determina la altura exacta de la banda en comparación con el marcador de peso molecular, la intensidad de la tinción por bromuro de etidio de la banda, el área de la misma, y posteriormente, halla la razón entre el valor de la banda de 18S y el valor de la banda de IGFI o EGFR de cada muestra.

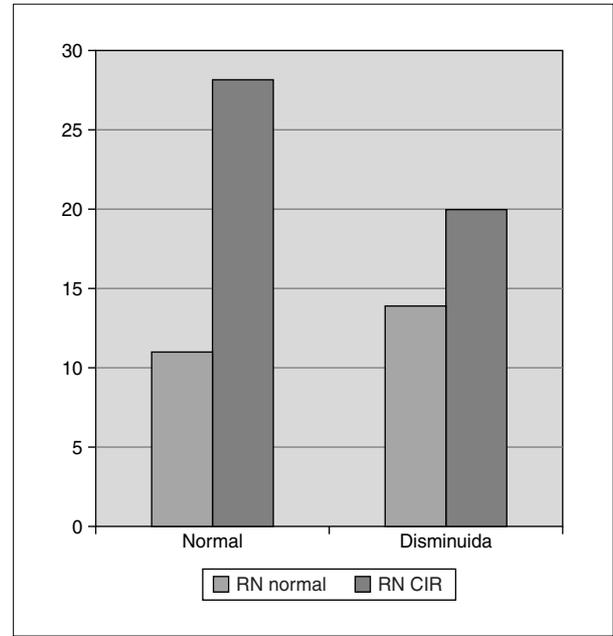
### Expresión de IGFI

Se determinó en cada muestra la razón entre el área de la banda del control interno e IGFI y se consideró como valor de corte 1. Es decir que aquellas muestras con valores de 1 o más de 1 se tomaron como pertenecientes a una expresión disminuida de IGFI. Aquellas placentas cuyo cociente era inferior a 1 fueron consideradas con expresión de IGFI normal (figs. 4 y 5).

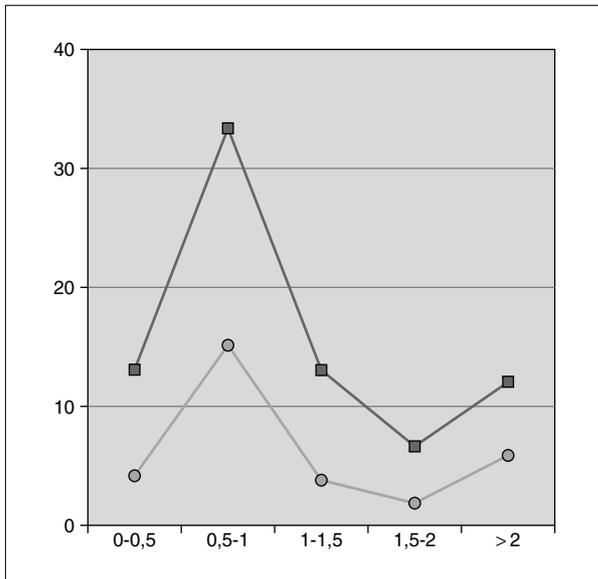
Como puede apreciarse en la figura 5, y considerando las columnas gris claro los recién nacidos normales y las gris oscuro los RCIU, se calculó que con una  $p$  significativa de 0,008 las placentas procedentes de gestaciones RCIU presentan una disminución de expresión de IgFI.



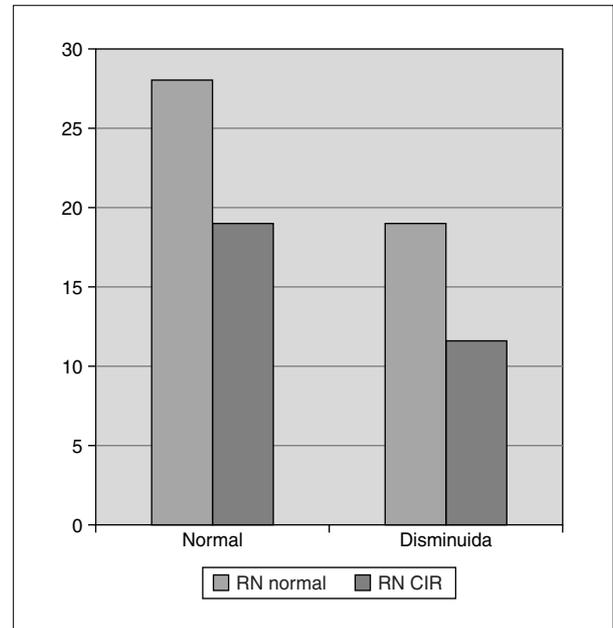
**Figura 4.** Agrupación de las muestras según el cociente expresión de 18S/expresión IGFI.  
Línea gris claro: placentas normales.  
Línea gris oscuro: placentas RCIU.



**Figura 5.** Expresión IGFI.



**Figura 6.** Agrupación de las muestras según el cociente expresión de 18S/expresión EGFR.  
Línea gris claro: placentas normales.  
Línea gris oscuro: placentas RCIU.



**Figura 7.** Expresión de EGFR.

### Expresión de EGFR

En las figuras 6 y 7 del mismo modo se muestran los resultados obtenidos al analizar la expresión de EGFR frente al control 18S. No se han encontrado diferencias significativas entre la expresión de este gen entre unas y otras.

### CONCLUSIONES

Hemos querido estudiar dentro de las posibles causas del retraso de crecimiento fetal la expresión de factores de crecimiento, para lo cual se eligieron IGFI por ser un factor que se produce en la propia placenta, que como el resto de IGF no la atraviesan y con evidencias claras de

que son responsables de la regulación de crecimiento fetal y placentario por lo que se asume su origen en la unidad fetoplacentaria y no a la circulación materna.

Respecto a EGFR existen trabajos anteriores relacionando un déficit en particulares situaciones como eclampsia, madres fumadoras, etc.<sup>30-32</sup> En el presente estudio se ha encontrado una expresión similar en el grupo control de recién nacidos normales y el grupo de RCIU.

El presente estudio es parte integrante de la colaboración de un amplio grupo de investigadores y colaboradores para no sólo analizar causas génicas de la grave situación que para la sociedad significa el nacimiento de un niño con retraso de crecimiento intrauterino, sino que se intenta incidir en las gestantes para que con un seguimiento adecuado del embarazo, una nutrición correcta y eliminación de sustancias deletéreas como alcohol y tabaco colaboren a que el niño siga una curva de crecimiento intrauterino óptima. Está establecida la relación estrecha que existe entre el síndrome X del adulto con complicaciones metabólicas: diabetes, obesidad, hipotiroidismo y un claro retraso intelectual con los antecedentes personales de un retraso de crecimiento intrauterino.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bauer M, Harding J, Basstt N, Breier B, Oliver M, Gallaher B, et al. Fetal growth and placental function. *Mol Cell Endocrinol* 1998;25,140:115-20.
- Gluckman PD. Intrauterine growth retardation: future research directions. *Acta Paediatr Scand* 1993;388:96-9.
- Carrera JM, Izquierdo M, López Lacal S. Etiología del crecimiento intrauterino retardado. Crecimiento normal y patológico. Barcelona. Masson SA, 1997;225-48.
- Alsats E, Guibourdenche J, Couturier A, Evain-Brion D. Physiological role of human placental growth hormone. 1998;140:121-7.
- Gluckman PD. The endocrine regulation of fetal growth in late gestation: the role of insulin-like growth factors. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80,4:1047-50.
- Iwashita M. Physiological significance of IGF-1 and its binding proteins on fetal growth and maturation. *Acta Obst Gynaec Jpn* 1994;46,8:660-72.
- Alsats E, Guibourdenche J, Luton D, Frankenne F, Evain-Brion D. Human placental growth hormone. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:1526-34.
- Caufriez A, Frankenne F, Hennen G, Copinschi G. Regulation of maternal IGF-I by placental GH in normal and abnormal human pregnancies. *Am J Physiol* 1993;265 (Endocrinol Metab 28572-577).
- Han VKM, Lund PP, Lee DC, D'ERCOLE AJ. Expression of somatomedin/insulin like growth factor messenger ribonucleic acids in the human fetus. Identification, characterization and tissue distribution. *J Clin Endocrinol Metab*, 1988;66:422-9.
- Caufriez A, Frankenne F, Hennen G, Copinschi G. Regulation of maternal IGF-I by placental GH in normal and abnormal human pregnancies. *Am J Physiol* 1993;65 (Endocrinol Metab 28572-577).
- Mirlesse V, Frankenne F, Alsats E, Poncet M, Hennen G, Evain-Brion D. Placental growth hormone levels in normal pregnancy and in pregnancies with intrauterine growth retardation. *Pediatr Res* 1993;34,4:439-42.
- Lytras A, Bock M, Dodd J, Cattini P. Detection of placental growth hormone variant and chorionic somatomammotropin ribonucleic acid expression in human trophoblastic neoplasm by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Endoc* 1994;134,6:2461-7.
- Rall LB, Scott J, Bell GI. Human Insulin-like growth factor I y II messenger RNA: isolation of complementary DNA and analysis of expression. *Methods in enzymology*, 1987;146:239-41.
- Lasarre C, Hardouin S, Daffos F, Forestier F, Frankenne F, Bijoux M. Serum insulin-like factors and insulin-like growth factors binding proteins in human fetus. Relationships with growth in normal subjects and in subjects with intrauterine growth retardation. *Ped Res* 1991;29:219-25.
- Kroonsberg C, McCutcheon SN, Siddiqui RA, Mackenzie DDS, Blair HT, Ormsby JE. Reproductive performance and fetal growth in female mice from lines divergently selected on the basis of plasma IGF1 concentrations. *J Reprod Fert*, 1989;87:349-53.
- Evain-Brion D, Alsats E. Epidermal growth factor receptor and human fetoplacental development *J PedEndocrinol* 1994;7,4:295-302.
- Faxen M, Nasiell J, Black A, Nisell H, Lunell N. Altered mRNA expression pattern of placental epidermal growth factor receptor (EGFR) in pregnancies complicated by preeclampsia and/or intrauterine growth retardation. *Am J Perinatol* 1998;15,1:9-13.
- Ferrandina G, Lanzone A, Scambia G, Caroso A, Benedetti Pacini P, Mancuso S. Epidermal growth factor receptors in placenta and fetal membranes from hypertension-complicated pregnancies. *Human Reproduction*. 1995;10,7:1845-9.
- Ulrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, et al. Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature*, 1984;309:418-25.
- Xu Y, Ishii S, Clark AJL, Sullivan M, Wilson RK, Ma D, et al. Human epidermal growth factor receptor cDNA homologous to a variety of RNAs overproduced in A431 carcinoma cells. *Nature* 1984;209:806-10.
- Reiter JL, Maihle NJ. A 1,8 kb alternative transcript from the human epidermal growth factor receptor gene encodes a truncated form of the receptor. *Nucleic Acids Res* 1996;24(20):4050-6.
- Ilekis J, Stark B, Scoccia B. Possible role of variant RNA transcripts in the regulation of epidermal growth factor receptor expression in human placenta. *Mol Repr Develop* 1995;41:149-56.
- Balaram P, John M, Rajalekshmy TN, Nair B, Schultz G, Nair K. Expression of epidermal growth factor receptor in gestational trophoblastic diseases. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997;123:161-6.
- Huch G, Hopn HP, Denker HW. Identification of differentially expressed genes in human trophoblast cells by differential-display RT-PCR. *Placenta* 1998;19:557-67.
- Le Bouc Y, Dreyer D, Jaeger F, Binoux M, Sondermeyer P. Complete characterization of the human IGF-I nucleotide sequence isolated from a newly constructed adult liver cDNA library. *Febs Letters* 1986;196,1:108-12.
- Xu Y, Richert N, Ito S, Merlino GT, Pastan I. Characterization of epidermal growth factor receptor gene expression in malignant and normal cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:7308-12.
- Tapanainen P, Bang P, Wilson K, Unterman T, Vreman H, Rosenfeld R. Maternal Hypoxia as a Model for Intrauterine Growth Retardation: Effects on Insulin-like Growth factors and their binding proteins. *Pediatr Res* 1998;36:152-8.

28. Erel C, Dane B, Calay Z, Kaleli S, Aydinli K. Apoptosis in the placenta of pregnancies complicated with IUGR Intern J Gyn & Obst 2001;73:229-35.
29. Gabriel R, Alsat E, Evain-Brion D. Alteration of epidermal growth factor receptor in placental membranes of smokers: relationship with intrauterine growth retardation. Am J Obstet Gynecol. 1994;170:1238-43.
30. Fujita Y, Kurachi H, Morishige K, Amemiya K, Terakawa N, Miyake A, et al. Decrease in Epidermal growth factor receptor and its messenger ribonucleic acid levels in intrauterine growth-retarded and diabetes mellitus-complicated pregnancies. J Clin Endocrinol Metab 1991;72,6:1340-45.
31. Erel C, Dane B, Calay Z, Kaleli S, Aydinli K. Apoptosis in the placenta of pregnancies complicated with IUGR Intern J Gyn & Obst 2001;73:229-35.
32. Gabriel R, Alsat E, Evain-Brion D. Alteration of epidermal growth factor receptor in placental membranes of smokers: relationship with intrauterine growth retardation. Am J Obstet Gynecol. 1994;170:1238-43.