



00387
**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

**RELACION DEL PESO AL NACER CON
INDICADORES DEL CRECIMIENTO FETAL
EN LA PREECLAMPSIA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. EN C. EULISES DIAZ DIAZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. ALI HALHALI BAGHDAD



MEXICO, D. F.

FEBRERO, 2005

COORDINACIÓN

m 340937



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 9 de agosto del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTOR EN CIENCIAS del alumno a EULISES DÍAZ DÍAZ con número de cuenta 99834890 y número de expediente 3992004, con la tesis titulada: "RELACIÓN DEL PESO AL NACER CON INDICADORES DEL CRECIMIENTO FETAL EN LA PREECLAMPSIA", bajo la dirección del Dr. Ali Halhali Baghdad.

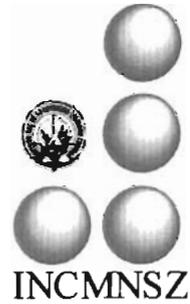
Presidente:	Dr. Fernando Larrea Gallo
Vocal:	Dr. Edelmiro Santiago Osorio
Vocal:	Dr. Federico Martínez Montes
Vocal:	Dra. Verónica Guamer Lans
Secretario:	Dr. Ali Halhali Baghdad
Suplente:	Dra. María Elena Álvarez-Buylla Roces
Suplente:	Dr. Armando Roberto Tovar Palacio

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 3 de noviembre del 2004.

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado



*El presente trabajo se llevó a cabo en el
Departamento de Biología de la Reproducción
del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y
Nutrición Salvador Zubirán bajo la dirección
del Dr. Ali Hakhali Baghdad.*

Dedicatoria

A mis padres que me apoyaron durante tantos años de estudios y que hoy pueden ver con orgullo la conclusión de otra etapa de mi vida profesional.

A mis buenos compañeros y amigos por su solidaridad y su apoyo desinteresado.

A mi esposa, mi cómplice de tantos momentos buenos y malos, mi amiga y compañera. A mis hijos Diego y Andrés, que son mi mayor tesoro y mi estímulo para emprender cualquier empresa por difícil que sea.

Agradecimientos

Al Dr. Ali Halhali Baghdad, mi tutor, por sus sabios consejos, por su solidaridad, confianza, y apoyo. Por los conocimientos que compartió conmigo y por la seriedad con que tomo mi preparación profesional. A quién le agradezco más que nada, su comprensión y amistad.

Al Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, en especial al jefe de departamento, Dr. Fernando Larrea Gallo, por las facilidades y apoyos recibidos para la culminación de este proyecto, por sus consejos y sus observaciones oportunas que contribuyeron al mejoramiento de mi desempeño profesional.

Al comité tutorial conformado por los doctores: Ali Halhali Baghdad, Fernando Larrea Gallo y María Elena Álvarez-Buylla Roces por sus observaciones oportunas y sus recomendaciones para el mejoramiento del proyecto y de mi propia formación profesional.

Al Departamento de Ginecología y Obstetricia del Hospital Dr. Manuel Gea González, por su apoyo en la captación de los pacientes y en la toma de muestras biológicas.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para la realización del presente trabajo (proyecto No.26238-M).

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (DGEP), por la Beca de Doctorado otorgada.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Páginas
1. Resumen	1
2. Abstract	6
3. Introducción	10
4. Objetivos	13
4.1. Objetivo General.....	14
4.2. Objetivos Específicos.....	14
5. Antecedentes	15
5.1. Fisiología del embarazo.....	16
5.2. Hipertensión inducida por el embarazo.....	17
5.3. Preeclampsia.....	18
5.3.1. Alteraciones de los reguladores de la presión arterial durante la preeclampsia.....	19
5.3.2. Alteraciones renales durante la preeclampsia.....	20
5.3.3. Alteraciones hepáticas durante la preeclampsia.....	20
5.3.4. Alteraciones cerebrales durante la preeclampsia.....	21
5.3.5. Alteraciones cardiovasculares y pulmonares durante la preeclampsia.....	21
5.3.6. Alteraciones hematológicas durante la preeclampsia.....	22
5.3.7. Alteraciones útero-placentarias durante la preeclampsia.....	22
5.4. Placenta, estructura y función.....	23
5.5. Factores relacionados con el crecimiento fetal durante el embarazo.....	29
5.5.1. IGF-I e IGFbPs en el embarazo normal y la preeclampsia.....	30

5.5.1.1. Regulación de la expresión génica de IGF-I y sus IGFBPs.....	30
5.5.1.2. Síntesis y regulación de IGF-I durante el embarazo.....	34
5.5.1.3. Síntesis de IGF-I durante la vida posnatal.....	35
5.5.1.4. Transporte de IGF-I en la circulación.....	36
5.5.1.5. Funciones biológicas del IGF-I.....	36
5.5.1.6. Regulación de la actividad biológica del IGF-I por sus IGFBPs.....	37
5.5.1.7. Relación entre IGF-I, IGFBPs y el retraso del crecimiento fetal.....	38
5.5.2. Insulina en el embarazo normal y la preeclampsia.....	40
5.5.3. Leptina en el embarazo normal y la preeclampsia.....	43
5.5.4. Hormonas esteroides durante el embarazo normal y la preeclampsia; relación con el crecimiento fetal.....	45
5.5.5. Zinc en el embarazo normal y la preeclampsia.....	48
5.5.5.1. Fuentes, distribución y funciones biológicas del zinc.....	48
5.5.5.2. Zinc y retraso del crecimiento intrauterino.....	49
6. Metodología.....	51
6.1. Diseño experimental.....	52
6.2. Sujetos.....	52
6.3. Criterios de selección de la población.....	52
6.3.1. Criterios de inclusión.....	52
6.3.2. Criterios de exclusión.....	53
6.3.3. Criterios de eliminación.....	53
6.4. Tamaño de la muestra.....	53
6.5. Toma de muestras.....	55
6.6. Métodos.....	55

6.6.1. Estudio de la relación del peso al nacer con las concentraciones circulantes de indicadores del crecimiento fetal durante el embarazo normal y la preeclampsia.....	55
6.6.1.1. Cuantificación de las concentraciones de IGF-I.....	55
6.6.1.2. Determinación de las IGFBPs.....	56
6.6.1.3. Cuantificación de la concentración de insulina.....	57
6.6.1.4. Cuantificación de la concentración de glucosa.....	58
6.6.1.5. Cuantificación de la concentración de leptina.....	58
6.6.1.6. Cuantificación de la concentración de lactógeno placentario.....	58
6.6.1.7. Cuantificación de la concentración de estradiol.....	59
6.6.1.8. Cuantificación de la concentración de progesterona.....	59
6.6.1.9. Cuantificación de la concentración de testosterona.....	59
6.6.1.10. Cuantificación de la concentración de cortisol.....	59
6.6.1.11. Cuantificación de las concentraciones de zinc.....	60
6.6.2. Estudio de la producción " <i>in situ</i> " de IGF-I y de la expresión génica de IGF-I, IGFBP-1 e IGFBP3 en el tejido placentario.....	61
6.6.2.1. Estudio de la producción " <i>in situ</i> " de IGF-I en el tejido placentario.....	61
6.6.2.2 Estudio de la expresión génica de IGF-I, IGFBP-1 e IGFBP3 en el tejido placentario.....	63
6.6.2.2.1. Aislamiento de los ARN totales del tejido placentario por ultracentrifugación diferencial en gradiente de cloruro de cesio.....	63
6.6.2.2.2. Preparación de las sondas específicas por RT-PCR.....	64
6.6.2.2.3. Secuencias iniciadoras y protocolos de PCR utilizados para la amplificación de los ADNc de interés.....	65

6.6.2.2.4. Separación electroforética de los ARN totales y transferencia por capilaridad.....	68
6.6.2.2.5. Hibridación por Northern Blot de IGF-I, IGFBP-1 e IGFBP-3.....	68
6.6.2.2.6. Separación electroforética y transferencia de los ADNc de IGF-I y ciclofilina.....	70
6.6.2.2.7. Hibridación simultánea de IGF-I y ciclofilina por Southern Blot.....	71
6.6.3. Estudio de la afinidad y la densidad superficial de los receptores de IGF-I e insulina en la membrana citoplasmática del tejido placentario...	71
6.6.3.1. Aislamiento de las membranas citoplasmáticas del tejido placentario.....	71
6.6.3.2. Ensayo de radiorreceptores de IGF-I.....	72
6.6.3.3. Marcaje de insulina humana.....	74
6.6.3.4. Ensayo de radiorreceptores de insulina.....	75
6.7. Análisis estadístico.....	76
7. Resultados.....	77
7.1. Relación del peso al nacer con las concentraciones circulantes de indicadores del crecimiento fetal durante el embarazo normal y la preeclampsia.....	78
7.1.1. Datos clínicos de los grupos NT y PE.....	78
7.1.2. Concentraciones de IGF-I, lactógeno placentario y leptina de los grupos NT y PE.....	80
7.1.3. Perfil de las IGFBPs en los grupos NT y PE.....	81
7.1.4. Concentraciones de insulina, glicemia e índice de resistencia a la insulina de los grupos NT y PE.....	83
7.1.5. Concentraciones de progesterona, estradiol, testosterona y cortisol	

de los grupos NT y PE.....	84
7.1.6. Concentraciones circulantes y placentarias de Zn en los grupos NT y PE.....	85
7.1.7. Relación del peso al nacer con la presión arterial y la edad gestacional en los grupos NT y PE.....	86
7.1.8. Relación del peso al nacer con las variables bioquímicas estudiadas en los grupos NT y PE.....	88
7.1.9. Relación entre las variables bioquímicas estudiadas en los grupos NT y PE.....	91
7.2. Estudio de la producción " <i>in situ</i> " de IGF-I y de la expresión génica de IGF-I, IGFBP-1 e IGFBP3 en el tejido placentario.....	92
7.2.1. Estudio de la producción " <i>in situ</i> " de IGF-I en el tejido placentario.....	92
7.2.2. Estudio de la expresión génica de IGF-I, IGFBP-1 e IGFBP3 en el tejido placentario.....	100
7.2.2.1. Preparación de las sondas específica por RT-PCR.....	100
7.2.2.2. Northern Blot de IGF-I del tejido placentario.....	101
7.2.2.3. RT-PCR y Southern Blot de IGF-I en el tejido placentario.....	103
7.2.2.4. Northern Blot de IGFBP-1 en el tejido placentario.....	105
7.2.2.5. Northern Blot de IGFBP-3 en el tejido placentario.....	107
7.3. Relación del peso al nacer con la afinidad y/o número de receptores placentarios de IGF-I e insulina durante el embarazo normal y la preeclampsia.....	109
7.3.1. Datos clínicos de los grupos NT y PE.....	109
7.3.2. Relación del peso al nacer con el peso de las placentas.....	110

7.3.3. Aislamiento de las membranas citoplasmáticas del tejido placentario.....	111
7.3.4. Análisis del ensayo de radiorreceptores de IGF-I en el tejido placentario.....	112
7.3.5. Análisis del ensayo de radiorreceptores de insulina en el tejido placentario.....	114
7.3.7. Características de los receptores de IGF-I e insulina del tejido placentario de los grupos NT y PE.....	116
7.3.8. Relación del peso al nacer y del peso de las placentas con la afinidad y la concentración de los receptores de IGF-I del tejido placentario de los grupos NT y PE.....	118
7.3.9. Relación del peso al nacer y del peso de las placentas con la afinidad y la concentración de los receptores de insulina del tejido placentario de los grupos NT y PE.....	120
8. Discusión.....	122
9. Conclusiones.....	136
10. Bibliografía.....	138
11. Artículos publicados relacionados con la tesis.....	152

1. Resumen

1. RESUMEN

La preeclampsia es una enfermedad hipertensiva inducida por el embarazo, se diagnostica por la presencia simultánea de hipertensión y proteinuria. Debido a que una de las alteraciones asociadas a esta enfermedad consiste en la alta incidencia del bajo peso al nacer, lo que representa un factor de riesgo para la sobrevivencia del recién nacido, los objetivos del presente trabajo fueron: a) establecer si el peso al nacer se asocia con las concentraciones circulantes en el suero materno y en el cordón umbilical del factor de crecimiento relacionado con la insulina tipo 1 (IGF-I), sus proteínas transportadoras (IGFBPs), insulina, lactógeno placentario, leptina, estradiol, progesterona, testosterona, cortisol y zinc; b) establecer si la preeclampsia se asocia con alteraciones en la expresión placentaria de IGF-I, IGFBP-1 e IGFBP-3 y; c) establecer si el peso al nacer se asocia con la densidad superficial y/o la afinidad de los receptores de IGF-I e insulina en el tejido placentario. Para cada uno de estos objetivos, se establecieron dos grupos: un grupo problema constituido por mujeres con embarazo complicado con preeclampsia moderada (grupo PE) y un grupo testigo conformado por mujeres embarazadas normotensas (grupo NT).

Los resultados correspondientes al primer objetivo demostraron que el peso de los recién nacidos del grupo PE fue significativamente ($P = 0.01$) menor que el del grupo NT (2.83 ± 0.46 vs 3.31 ± 0.3 Kg). Las concentraciones de IGF-I en el grupo PE fueron significativamente menores que las del grupo NT, tanto en el suero materno (202 ± 62 vs 317 ± 73 ng/mL; $P < 0.001$) como en el cordón umbilical (60 ± 43 vs 101 ± 42 ng/mL; $P =$

0.02). Además, las concentraciones de IGFBP-1 y de IGFBP-3 fueron mayores y menores, respectivamente, en el grupo PE con respecto al NT. Las concentraciones en suero materno y en el cordón umbilical de insulina, lactógeno placentario, leptina, estradiol, progesterona, testosterona, cortisol y zinc, no mostraron diferencias significativas entre los grupos NT y PE. En el grupo PE, el peso de los recién nacidos presentó una asociación significativa con las concentraciones de IGF-I en suero materno (Rho = 0.76; P = 0.004) y en el cordón umbilical (Rho = 0.75; P = 0.005), con las de zinc placentario (Rho = 0.56; P = 0.04), así como con las de leptina en el cordón umbilical (Rho = 0.61; P = 0.02). El análisis de regresión múltiple paso a paso demostró que el IGF-I del cordón umbilical fue el mayor predictor del peso al nacer. En el grupo NT, el peso de los recién nacidos no se asoció significativamente con ninguna de las variables estudiadas.

Los resultados referentes a la expresión placentaria de IGF-I y de sus IGFBPs no mostraron diferencias significativas entre los grupos NT y PE. Asimismo los análisis de inmunohistoquímica no mostraron diferencias significativas en las características morfológicas del tejido placentario específicamente en la forma, tamaño y número de células que conforman los sinciotrofoblastos estudiados. Tampoco se encontró diferencias significativas en cuanto al porcentaje de células positivas y al porcentaje de áreas positivas a la inmunotinción específica para IGF-I, entre los grupos NT y PE.

Por último, los receptores de membranas aislados fueron capaces de unir sus ligandos específicos, pudiéndose realizar los análisis de desplazamiento en ambos grupos. En el grupo NT, la densidad de los receptores placentarios de IGF-I e insulina fueron de 215 ± 32 y 1181 ± 210 fmoles/mg de proteínas, respectivamente. No se

observaron diferencias significativas en la densidad de estos receptores en el grupo PE al ser comparados con el grupo NT. Además, la afinidad de los receptores de IGF-I no fue significativamente diferente entre los grupo NT y PE. En lo referido al receptor placentario de insulina, los resultados mostraron una menor afinidad (mayor constante de disociación (Kd) en el grupo PE comparado con el grupo NT (10.84 ± 2.44 vs $8.10 \pm 1.28 \cdot 10^{-10}$ M; $P = 0.02$).

En conclusión, la preeclampsia moderada se asocia con bajo peso al nacer, concentraciones de IGF-I y de IGFBP-3 bajas y concentraciones de IGFBP-1 altas. Además, los resultados mostraron que el bajo peso al nacer observado en el grupo PE, se asocia con las concentraciones de IGF-I del suero materno y del cordón umbilical, de zinc placentario, y de leptina del cordón umbilical. Sin embargo, el IGF-I del cordón umbilical es el mayor predictor del peso al nacer. Por otra parte, la ausencia de diferencia significativas en las concentraciones de insulina, lactógeno placentario, leptina, estradiol, progesterona, testosterona, cortisol y zinc, entre los grupos NT y PE descarta a estas hormonas como responsables del bajo peso al nacer observado en la preeclampsia. En el presente trabajo no se observaron diferencias significativas en la expresión placentaria del IGF-I, IGFBP-1 e IGFBP-3 entre los grupo NT y PE, lo que indica que la placenta no está implicada en las alteraciones de las concentraciones circulantes de estos factores de crecimiento en la preeclampsia, lo que sugiere que es la producción hepática materna y fetal, fuentes principales de producción endocrina de estos factores, las que parecen estar alteradas durante la preeclampsia. Por último, la menor afinidad del receptor placentario de insulina observado en el grupo PE pudiera reflejar una alteración en la capacidad de transporte de nutrimentos a través de la

placenta, lo que implicaría una menor estimulación del crecimiento fetal y por tanto el bajo peso al nacer.

2. Abstract

2. ABSTRACT

Preeclampsia (PE) is a pregnancy-induced hypertension disease. Its diagnostic is by the simultaneous presence of hypertension and proteinuria. One the more important aspect to consider in this disease is the high incidence of low newborn birth weight, which represents a high risk for the fetal survival. The aims of the present study were: a) establish if the birth weight is associated with the circulating concentration of the insulin-like growth factor type 1 (IGF-I), its binding proteins, insulin, leptin, placental lactogen, estradiol, progesterone, testosterone, cortisol and zinc; b) establish if the preeclampsia is associated with alterations in the placental expression levels of the IGF-I, IGFBP-1, IGFBP-3, and; c) establish if the birth weight is associated with the density and/or affinity of the IGF-I and insulin receptors in the placental tissue. For each aim, it was establish two experimental groups: one problem group of pregnant women complicated with moderate preeclampsia (PE group) and one control group of normotensive pregnant women (NT group).

The result bellowing to the first aim demonstrated that the birth weigh of the PE group was significantly ($P = 0.001$) lower compared with the NT group (2.83 ± 0.46 vs 3.31 ± 0.3 Kg, respectively). The concentration of IGF-I was lower in the PE group compared with the NT group, both in the maternal (202 ± 62 vs 317 ± 73 ng/mL; $P < 0.001$) and fetal (60 ± 43 vs 101 ± 42 ng/mL; $P = 0.02$) circulations. Moreover, the concentration of IGFBP-1 and IGFBP-3 were higher and lower, respectively, in the PE group compared with the NT group. The concentrations in maternal and fetal circulations of insulin, placental lactogen, leptin, estradiol, progesterone, testosterone, cortisol and

zinc, were not statistically different between the PE and NT groups. In the PE group, the newborn birth weight was associated with the concentration of IGF-I both in maternal (Rho = 0.76; P = 0.004) and fetal (Rho = 0.75; P = 0.005) circulation, with the placental zinc (Rho = 0.56; P = 0.04) and fetal leptin (Rho = 0.61; P = 0.02) concentration. The stepwise multiple regression tests show the IGF-I as the mayor predictor of the birth weight. In the NT, the newborn birth weight did not correlate with any of biochemical studied variables.

The results about the placental expression of IGF-I and its binding proteins did not show differences between the PE and NT group. In the other hands, the immunohistochemistry analysis did not show significantly difference between group, in the morphological characteristics of the placental tissue in order to form, size, and number of cell, neither in the percent of the positive cell or percent of positive area to IGF-I.

Finally, the receptors isolated from the placental tissue were able to binding both, IGF-I and insulin, so the scatchard analysis was performed. The density of placental IGF-I and insulin receptor were of 215 ± 32 and 1181 ± 210 fmoles/mg of protein, respectively in the NT group. There were not found statistical difference in the density of these two receptors between groups, neither in the affinity of IGF-I. The result regarding the affinity of insulin receptor show a lower affinity in the PE group compared with NT group ($K_d = 10.84 \pm 2.44$ vs $8.10 \pm 1.28 \cdot 10^{-10}$ M, P = 0.02).

In conclusion, the moderated preeclampsia is associated with low birth weight, low IGF-I and IGFBP-3 concentrations, and high concentration of IGFBP-1. Moreover, the results show that low newborn birth weight observed in the PE group correlated with

maternal and fetal IGF-I, placental zinc and fetal leptin, but the fetal IGF-I was the mayor predictor of the newborn birth weight. In other hand, the lack of statistical difference in zinc, leptin, insulin, placental lactogen, estradiol, progesterone, testosterone and cortisol concentrations between the PE and NT groups discard a this hormones as responsible of the low newborn birth weight observed in preeclampsia. In the present study was not observed statistical differences in the placental expression of IGF-I, IGFBP-1 e IGFBP-3 between the PE and NT groups, which indicate that the placental is not compromising in the alteration of the circulating concentration of this growth factors observed in preeclampsia, and suggest that is the maternal and fetal hepatic production, main sites of endocrinal production of these factors which is maybe altered during preeclampsia. In other hand the lower affinity of placental insulin receptor in the PE group may reflect an alteration in nutrients transport capacity through the placenta, therefore low stimulation in fetal growth and then low newborn birth weight.

3. Introducción

3. INTRODUCCIÓN

El embarazo es una etapa importante de la vida que garantiza la perpetuidad de la especie. Durante la gestación se establece una importante interrelación morfológica y fisiológica entre la madre y el feto en desarrollo. Esta interrelación, está finamente regulada por factores hormonales que aseguran el funcionamiento óptimo de la placenta y garantizan un adecuado aporte de nutrimentos y de factores de crecimiento necesarios para el desarrollo fetal (1-10).

La placenta produce muchos de estos factores hormonales, tanto de naturaleza esteroidea como proteínica, entre los que podemos mencionar la progesterona, el estradiol, la hormona gonadotropina coriónica (hCG), el lactógeno placentario (hPL), la leptina y varios factores de crecimiento. En la primera etapa del embarazo, la hCG y la progesterona son imprescindibles para el éxito del embarazo y evitar el aborto temprano. En la regulación del metabolismo materno, placentario y fetal participan el hPL, la leptina y factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-I) y sus proteínas transportadoras (IGFBPs) los cuales están involucrados en el crecimiento placentario y fetal. Otros factores hormonales que regulan el funcionamiento de la placenta y garantizan una condición adecuada para el crecimiento fetal no son producidos por la placenta, tal es el caso de la insulina, hormona producida por el tejido pancreático que estimula el transporte de nutrimentos desde la circulación materna hacia la circulación fetal. Los factores nutricionales tales como el aporte de proteínas, las calorías ingeridas y el Zinc (Zn) son también importantes para el desarrollo y crecimiento tanto placentario como fetal. Además de desempeñar un papel importante en el

mantenimiento del embarazo, las hormonas esteroides producidas por la placenta y las glándulas suprarrenales maternas y fetales regulan el metabolismo materno, estimulan la síntesis placentaria de factores proteínicos y favorecen la maduración del feto en desarrollo (1, 11-13).

Existen condiciones patológicas durante el embarazo, que no garantizan un adecuado crecimiento fetal, tal es el caso de la preeclampsia (PE). Esta enfermedad, es una complicación severa del embarazo, que se asocia con un alto índice de morbi-mortalidad materna y/o fetal y constituye la segunda causa de muerte materna en México. La preeclampsia se caracteriza por una disminución del flujo útero-placentario como consecuencia de la hipertensión propia de esta enfermedad, lo que se asocia directamente con el retraso del crecimiento intrauterino y el bajo peso al nacer (14-19).

Lo anterior nos suscitó el interés de llevar a cabo el presente estudio cuyos objetivos son los siguientes.

4. Objetivos

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Evaluar la relación entre indicadores del crecimiento fetal y el bajo peso al nacer observado en la preeclampsia.

4.2. Objetivos Específicos

a) Estudiar si el peso al nacer se asocia con las concentraciones circulantes de IGF-I, IGFBPs, insulina, lactógeno placentario, leptina, estradiol, progesterona, testosterona, cortisol y zinc, en el suero materno y del cordón umbilical durante el embarazo normal y la preeclampsia.

b) Establecer si la preeclampsia se asocia con alteraciones en la expresión placentaria de IGF-I, IGFBP-1 e IGFBP-3.

c) Estudiar si el peso al nacer se asocia con la densidad superficial y/o la afinidad de los receptores de IGF-I e insulina en el tejido placentario durante el embarazo normal y la preeclampsia.

5. Antecedentes

5. ANTECEDENTES

5.1. Fisiología del embarazo

El embarazo es una etapa importante de la vida, en especial del proceso de reproducción, que garantiza la perpetuidad de la especie. En el humano esta etapa tiene una duración de 40 semanas. Durante este período, se producen importantes cambios anatómicos, fisiológicos y bioquímicos en la mujer gestante. Tales cambios, se presentan en el útero para aceptar y permitir la implantación del blastocisto y el posterior desarrollo placentario y fetal, modificaciones en el metabolismo materno que garantizan un adecuado suministro de nutrimentos al feto en desarrollo, así como la preparación de las glándulas mamarias para la posterior etapa de lactancia.

La revisión de los datos obtenidos durante más de 20 años muestra que en promedio el peso corporal materno aumenta 12.5 Kg durante el embarazo (20). Del peso total incrementado, alrededor de 9 Kg corresponden al feto, la placenta, el líquido amniótico, el útero, la hipertrofia de los tejidos maternos, el aumento del volumen sanguíneo y la retención de líquido extravascular. Los 3.5 Kg restantes representan principalmente el almacenamiento de grasa materna. La mayor ganancia de peso ocurre en los últimos dos trimestres, cuando el crecimiento fetal se ve incrementado de manera significativa (21, 22). Por su lado el gasto cardíaco de la madre aumenta entre un 30 a 40% hacia la semana 27 de gestación, para luego sufrir una disminución gradual en las últimas 8 semanas de la gestación, sin alcanzar el valor que se presenta en la etapa de postparto. El volumen sanguíneo materno aumenta durante el embarazo siendo hasta de un 30% mayor de lo normal. Se presenta también un aumento en la filtración glomerular

y de la ventilación pulmonar de aproximadamente un 50%, produciéndose una disminución en la presión parcial de CO₂ de la sangre arterial. A pesar del aumento que se presenta en el volumen sanguíneo y en el gasto cardíaco, se observa una reducción en la presión arterial, debido a que se reduce la resistencia vascular periférica aproximadamente en un 40%, en comparación con los valores de las mujeres no embarazadas. Sin embargo en algunas ocasiones se presenta un incremento de la presión arterial (PA), estado patológico conocido como hipertensión inducida por el embarazo (1).

5.2. Hipertensión inducida por el embarazo

La hipertensión inducida por el embarazo se manifiesta en el 8 al 10% de las mujeres embarazadas y puede presentarse en diferentes formas (14).

-Hipertensión gestacional: Se caracteriza por hipertensión arterial (presión arterial sistólica ≥ 140 mm Hg o presión arterial diastólica ≥ 90 mm de Hg. Otro criterio utilizado es el aumento de al menos 15 mm Hg en la presión arterial diastólica o de 30 mm de Hg o más en la presión arterial sistólica).

-Preeclampsia: Caracterizada por la presencia de hipertensión arterial y marcada proteinuria (≥ 300 mg en orina de 24 h o ≥ 100 mg/dL en muestras al azar de orina medidas con tiras reactivas Bililabstix dando lecturas $\geq 2+$) con o sin edema. Se divide en preeclampsia moderada (PA $\geq 140/90$ y $< 160/110$ mm Hg) y preeclampsia severa (PA $\geq 160/110$ mm Hg)

-Eclampsia: Preeclampsia complicada por convulsiones.

-Síndrome HELLP: Se caracteriza por preeclampsia complicada por un cuadro que define las abreviaturas de su nombre HELLP (hemólisis, aumento en la concentración de enzimas hepáticas y disminución del número de plaquetas).

5.3. Preeclampsia

La preeclampsia (PE) es una enfermedad hipertensiva que se presenta durante el Embarazo (14), tiene asociado a ella un alto índice de morbi-mortalidad materna y/o fetal, representa un problema de salud pública en México, ya que afecta a alrededor del 7.4% de las mujeres embarazadas en hospitales generales y de un 10.5% de las atendidas en hospitales que manejan poblaciones de alto riesgo (15). También es una de las principales causas de partos iatrogénicos prematuros (23) y la segunda causa de muerte materna en México, con una tasa de 22.9 por cada 10 000 nacidos vivos (15). Una de las alteraciones más importantes observadas durante la preeclampsia es la disminución del flujo útero-placentario (19), como consecuencia de la hipertensión característica de esta enfermedad, lo que se asocia directamente con el retraso del crecimiento intrauterino y el bajo peso al nacer (16-18).

La preeclampsia se presenta después de la semana 20 de gestación y se diagnostica como moderada o severa según el grado de hipertensión y proteinuria. Su etiología es todavía desconocida y probablemente sea multifactorial, se han descrito factores familiares (24), hormonales (25), inmunológicos (26) y nutricios (27, 28). Algunos factores de riesgo para que se presente preeclampsia pueden ser: primer embarazo, historia familiar de preeclampsia, preeclampsia previa, edad (menor de 20 y mayor de 35 años), preexistencia de enfermedades hipertensivas, autoinmune o renal,

diabetes mellitus, gestación múltiple, trisomía del cromosoma 13 (29) y embarazos con polihidramnios (14, 30).

Muchos cambios metabólicos están asociados con la preeclampsia entre los cuales se pueden observar la reducción de la perfusión renal, hepática, útero-placentaria y cerebral que indica una vasoconstricción y un bajo rendimiento cardíaco.

5.3.1. Alteraciones de los reguladores de la presión arterial durante la preeclampsia

El control de la presión arterial se logra mediante el equilibrio entre la síntesis y liberación de sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras. Durante la preeclampsia, este equilibrio se ve afectado a favor de una mayor concentración circulante de vasoconstrictores y un aumento en la sensibilidad vascular a la angiotensina II. En efecto, mientras que las concentraciones de endotelina y tromboxanos, sustancias vasoconstrictoras, se encuentran aumentadas, las de prostaciclina y de óxido nítrico, sustancias vasodilatadoras, se encuentran disminuidas durante la PE.

El embarazo normal se caracteriza por una resistencia al efecto vasoconstrictor de la angiotensina II en la circulación periférica materna, garantizando un tono vascular adecuado que permite un flujo sanguíneo óptimo desde la circulación materna hacia la placenta, con el consiguiente aporte de nutrientes y oxígeno. Durante la preeclampsia sucede lo contrario, la resistencia a la acción vasopresora de la angiotensina II disminuye y se produce un aumento en la sensibilidad vascular al efecto de ésta, lo que se traduce en una mayor vasoconstricción. La combinación de lo anterior, junto con vasoespasmo y la aterosclerosis aguda, conlleva a la reducción en la perfusión y por tanto a la

disminución en el flujo sanguíneo, lo que puede causar un crecimiento inadecuado de la placenta, o bien, una reducción en su funcionalidad que a su vez se asocia directamente con el retraso del crecimiento fetal (14, 30).

5.3.2. Alteraciones renales durante la preeclampsia

La patología renal más característica de la preeclampsia es la endoteliosis glomerular capilar, donde se presenta inflamación endotelial y depósito de material amorfo en el citoplasma. Lo anterior produce un crecimiento, inflamación y engrosamiento de los capilares glomerulares, lo que estrecha el lumen del capilar. Ello conlleva a una reducción del riego sanguíneo y de la filtración glomerular, lo que puede provocar isquemia renal (31). Un indicador del daño renal es la presencia de proteínas en la orina como consecuencia de la pérdida en la capacidad del riñón de impedir la filtración de macromoléculas tales como las proteínas (14, 30).

5.3.3. Alteraciones hepáticas durante la preeclampsia

La lesión hepática característica de la preeclampsia severa es la necrosis hemorrágica periportal lobular, a consecuencia del depósito de fibrina en las arteriolas hepáticas. La disfunción hepática es más evidente en mujeres que presentan síndrome HELLP, en el cual se presenta un incremento en la concentración de enzimas hepáticas en la circulación materna (14, 30).

5.3.4. Alteraciones cerebrales durante la preeclampsia

En mujeres con preeclampsia severa puede observarse una serie de alteraciones cerebrales. Las manifestaciones clínicas que pueden presentarse incluyen isquemia cerebral y edema, así como pequeñas hemorragias cerebrales que pueden afectar a casi el 20% de las mujeres con preeclampsia severa o eclampsia. La circulación sanguínea cerebral es normal en pacientes con preeclampsia pero reducida en el coma eclámpico. El aumento en la resistencia vascular en el sistema nervioso central puede contribuir a alteraciones sensoriales en la preeclampsia, presentándose dolores de cabeza y alteraciones visuales (14, 30).

5.3.5. Alteraciones cardiovasculares y pulmonares durante la preeclampsia

El gasto cardíaco puede encontrarse normal, aumentado o reducido en la preeclampsia moderada, y generalmente se encuentra disminuido en la preeclampsia severa. Durante la preeclampsia se presenta vasoespasmos y vasoconstricción causando una disminución del flujo sanguíneo e hipertensión, respectivamente. Lo anterior puede agravarse y presentarse hemorragias subendoteliales, trombos de fibrina, necrosis focales y hemorragias miocárdicas. La complicación más común en la preeclampsia severa es el edema pulmonar agudo y neumonía bronquial hemorrágica difusa y grave. La causa de presentar edema pulmonar en mujeres con preeclampsia severa es aún desconocida (14, 30).

5.3.6. Alteraciones hematológicas durante la preeclampsia

Es común que mujeres con preeclampsia severa o con eclampsia presenten hemoconcentración ya que el volumen sanguíneo en las mujeres preeclámpticas se encuentra reducido en comparación al embarazo normal. El volumen sanguíneo para una mujer embarazada normotensa en las últimas semanas del embarazo se espera que sea alrededor de 5 L, mientras que en mujeres con eclampsia se ha observado reducciones de hasta 1.5 L. La alteración hematológica más común en la preeclampsia es la trombocitopenia. Puede encontrarse también un aumento en la concentración de fibronectina, una disminución de antitrombina III y un aumento en los niveles de β -trombomodulina y de antígeno relacionado con el factor VIII, lo que sugiere directamente la existencia de daño endotelial (14, 30, 32).

5.3.7. Alteraciones útero-placentarias durante la preeclampsia

En la preeclampsia no se da una migración completa del tejido trofoblástico a las arterias espirales maternas, manteniéndose parte de los componentes del tejido muscular y elástico presente antes del embarazo. Lo anterior no permite que se engrosen las arterias de forma adecuada, por lo que se observa una perfusión placentaria disminuida. Además las arterias espirales pueden ser obstruidas por material fibrinoide, plaquetas y macrófagos, lesión conocida como aterosclerosis aguda. Junto con lo ya mencionado, se presentan vasoespasmos que influyen en la reducción de la perfusión placentaria, provocando la disminución del aporte de nutrientes y oxígeno al feto, lo cual se asocia con un bajo crecimiento y desarrollo del feto (14, 30, 32).

5.4. Placenta, estructura y función

La placenta es un órgano temporal que se forma durante el período de gestación de los mamíferos y tiene múltiples funciones, entre las que podemos citar el intercambio de nutrimentos y gases, eliminación de toxinas, producción de factores hormonales que regulan el crecimiento y maduración fetal (1, 2). En todas las especies estudiadas, la relación entre el peso de la placenta y el peso fetal refleja la eficiencia con la cual la placenta garantiza la demanda nutricional para el crecimiento fetal (3, 4). Es sabido que el retraso del crecimiento intrauterino se acompaña de la reducción del tamaño de la placenta. De hecho, en todas las especies estudiadas la reducción del tamaño de la placenta es más marcada que la reducción de cualquier otro órgano fetal, incluso que la reducción del peso total del feto (4-8).

Después de 4 días de ocurrir la fertilización, el embrión en desarrollo forma una estructura llamada blastocisto, que se caracteriza por tener una masa de células interiores que dan lugar a la formación del feto, rodeada por una capa de células de tipo trofoblásticas, a partir de las cuales se forma la placenta. Las células periféricas trofoblásticas comienzan a producir la hormona gonadotropina coriónica (hCG) y acondicionan al endometrio que recubre el útero materno para que el tejido trofoblástico lo invada, a fin de garantizar una adecuada implantación del feto. El proceso de implantación es regulado por un sistema de señales químicas entre el trofoblasto que produce hCG y favorece la invasión y el endometrio que produce citocinas e inhibidores de proteasas que contrarrestan la capacidad de invasión del trofoblasto, estableciéndose un equilibrio que garantiza una adecuada implantación (2, 10, 11, 33).

Una vez anclada la placenta al endometrio, comienza la expansión y el crecimiento de su masa celular hasta formar las vellosidades coriónicas que son las

unidades funcionales básicas de la placenta, las que median la absorción de nutrimentos, la eliminación de sustancias de desechos y la producción de un conjunto de hormonas durante el embarazo. Las vellosidades coriónicas son estructuras formadas por un núcleo de tejido mesenquimatoso, embebido en capilares sanguíneos fetales envueltos por una capa de citotroblastos y de sinciotroblasto. Las vellosidades coriónicas están segmentadas y conforman los cotiledones, que a su vez forman a la placenta como un órgano definido. La placenta es un órgano temporal, es una extensión del feto en la madre y funciona como una interfase entre ambos (figura 1) (2, 10, 11, 33).

Durante la formación de la placenta, tiene lugar un proceso de diferenciación celular del tejido trofoblástico blastocístico, a partir de éste se genera una capa basal de células citotroblásticas llamada *células de Langhans*, las cuales tienen grandes núcleos eucromáticos y citoplasmas ligeramente basófilos, donde se observan predominantemente ribosomas libres y escaso retículo endoplasmático rugoso, su función fundamental es la de dar origen a través de cambios morfológicos y fisiológicos a la capa más externa, llamada capa periférica, la cual está formada por células sinciotroblásticas, que se caracterizan por tener pequeños núcleos heterocromáticos y citoplasmas fuertemente basófilos, con escasos ribosomas libres, pero abundantes retículos endoplasmáticos rugosos y vesículas del complejo de Golgi, que denotan una gran actividad de síntesis proteínica (figura 2) (2, 10, 11, 33).

Las células de la capa basal son células mononucleadas, que se encuentran en estrecha relación entre ellas y con las células del sinciotroblasto, a través de uniones de tipo desmosomas. Al principio del embarazo, esta capa es gruesa y a medida que va avanzando el mismo, se va transformando paulatinamente en el sinciotroblasto. Es por ello, que se va haciendo cada vez más delgada hasta casi desaparecer al final del

embarazo. Esta transformación de citotrofoblasto a sinciotrofoblasto es progresiva, estableciéndose capas intermedias que se caracterizan por tener intercambio de citoplasmas por fusión de membranas hasta llegar a la formación de la capa periférica, llamada sinciotrofoblasto, cuyas células son grandes y multinucleadas. Las células sinciotrofoblásticas están rodeadas por espacios intercelulares llamados lagunas o espacios intervellosos que comunican unas con otras y con los capilares y las venas maternas, estableciendo una vía directa de intercambio materno-fetal. Por otro lado, como lo denota la gran abundancia de retículo endoplasmático rugoso y de vesículas del aparato de Golgi, la capa periférica posee una actividad de síntesis de glicoproteínas más intensa que la capa basal. Es en la capa periférica donde más activamente se producen hormonas de naturaleza proteínica tales como gonadotropina coriónica (hCG), lactógeno placentario (hLP), hormona de crecimiento placentaria (GH placentaria), factores de crecimientos relacionados a la insulina (IGFs), tirotropina coriónica (TSH), adrenocorticotropina coriónica (ACTH), productos generados a partir de la proopiomelancortina (POMC) tales como lipotropina y β endorfina; péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTH-rP), calcitonina y relaxina; y una variedad de hormonas liberadoras e inhibidoras de tipo hipotalámicas, entre las que se incluyen la hormona liberadora de tirotropina (TRH), hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), hormona liberadora de corticotropina (CRH), así como hormonas esteroideas tales como estradiol y progesterona, todas de importancia para el desarrollo fetal (2, 10, 11, 33).

La capa basal de células citotrofoblásticas tienen además, la capacidad de diferenciarse en otros dos tipos de celulares: el trofoblasto extraveloso de anclaje y el trofoblasto invasivo. Las células del trofoblasto extraveloso de anclaje forman una

columna de anclaje de la placenta al endometrio del útero materno durante toda la gestación, además garantizan la unión de la membrana placentaria a la decidua. Para garantizar dicha unión, este tipo celular produce trofouteronectina (TUN) que parece mediar la unión al útero. El trofoblasto invasivo, es el responsable de invadir el tejido endometrial del útero hasta llegar a las arterias espirales maternas, permitiendo que la sangre fluya hacia los espacios intervillosos donde se ponen en contacto con la capa del sinciotrofoblasto veloso, a través de la cual se establece el intercambio de nutrimentos y sustancias de desechos con la sangre fetal, sin que haya mezcla de sangre (2, 10, 11, 33).

Existen anomalías en los procesos de anclaje e invasión trofoblástica que producen abortos, embarazos pretérminos, o retraso del crecimiento intrauterino, ya que no se crean condiciones adecuadas para el suministro eficiente de nutrimentos y para la eliminación de sustancias de desechos. Estas anomalías se observan en enfermedades tales como la preeclampsia, fundamentalmente en el trofoblasto invasivo lo que conlleva a una deficiente implantación. Alteraciones genéticas tales como la sobreexpresión del gen del colágeno tipo IV, que conlleva a una producción excesiva de esta proteína, dificulta el proceso de invasión. La presencia de abundantes linfocitos en la sangre materna como consecuencia de infecciones, conlleva a un incremento en la producción de citocinas que inhiben la invasión trofoblástica y afectan al proceso de implantación y por tanto al embarazo normal (2, 10, 11, 33).

La capa de tejido materno más cercano al sinciotrofoblasto se deriva del endometrio materno y se denomina decidua y tiene una gran actividad sintética de factores hormonales tales como la IGFBP-1, proteasas específicas, prostaglandinas,

entre otros, todos ellos importantes para la regulación del funcionamiento placentario, así como del crecimiento y desarrollo fetal y del proceso del parto (2, 10, 11, 33).

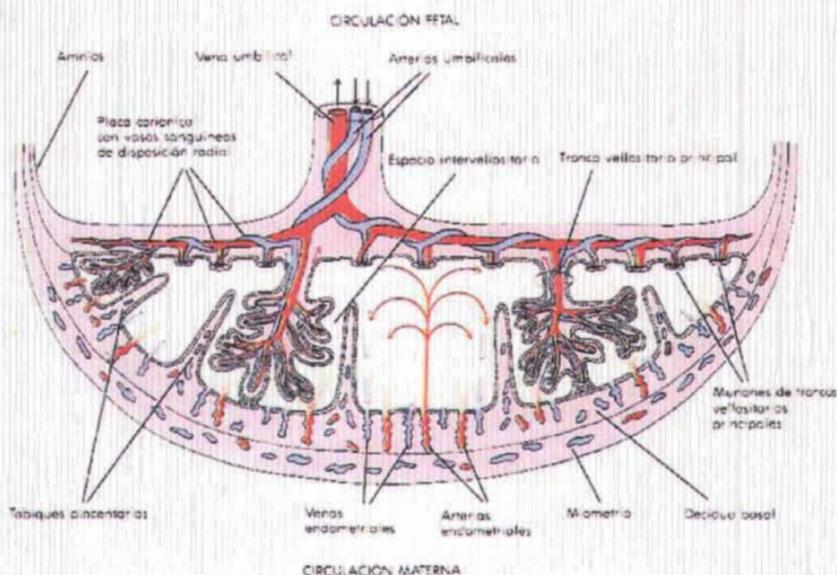


Figura 1. Esquema de una placenta humana madura. La placenta está subdividida en cotiledones mediante tabiques formados por invaginaciones de la decidua basal. La sangre materna llega a la placenta por numerosas arterias espiraladas del endometrio que perforan la placa basal. A medida que la sangre penetra en el cotiledón es dirigida hacia la profundidad del espacio intervillario (*flechas*). Luego fluye por la superficie de las vellosidades donde se produce el intercambio de gases y de productos metabólicos. Por último, la sangre materna abandona los espacios intervillarios y se introduce en las venas endometriales. La sangre fetal llega a la placenta a través de las arterias umbilicales que se dividen en varias arterias de disposición radial dentro de la placa coriónica. Ramas de estos vasos se introducen en los troncos principales de las vellosidades y allí forman extensas redes capilares. Las venas de las vellosidades transportan la sangre de nuevo al sistema venoso fetal a través de un sistema paralelo de arterias fetales. Como se mencionó antes el intercambio de gases y productos metabólicos se produce a través de la barrera placentaria al fluir la sangre materna sobre la superficie de las vellosidades, muy próximas a los lechos capilares placentarios fetales en el interior de ellas (Según Moore KL, Persaud TVN: *The Developing Human* 5ª. Ed. Filadelfia, WB Saunders, 1993 p 177).

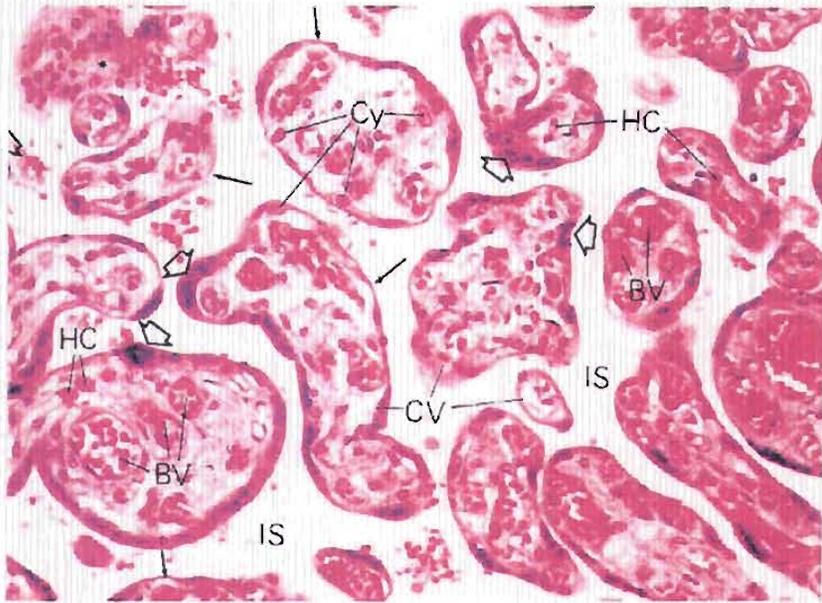


Figura 2. Corte de placenta humana, tinción Hematoxilina-Eosina (H-E: X 280). Se muestra un corte transversal de una placenta de término. Se distinguen las vellosidades coriónicas (CV) de diferentes tamaños y los espacios intervillosarios que las rodean (IS). El tejido conectivo de la vellosidad contiene ramas de las arterias umbilicales y tributarias de la vena umbilical (BV). Las vellosidades más pequeñas presentan solo capilares; las más grandes poseen, en forma congruente vasos sanguíneos de mayor calibre. Se pueden observar sitios donde los núcleos están agrupados en conglomerados (*puntas de flechas*), así como también regiones del sincicio relativamente libres de núcleos (*flechas*). Estos tramos del sincicio pueden estar tan adelgazados como para dar la impresión de que la superficie de la vellosidad carece de revestimiento. En las placentas más jóvenes, el citotrofoblasto (Cy) es una capa celular casi completa, ubicada inmediatamente por debajo del sinciotrofoblasto. En la capa del citotrofoblasto se produce la división celular y las células recién formadas se incorporan a la capa sincicial. En la placenta a término (como la de la foto) sólo se hallan células citotrofoblasticas ocasionales (Cy). Se observan además, otras células que son consideradas fagocíticas y se denominan células de Hofbauer. Las células de Hofbauer (HC) que se muestran en la figura no contienen ninguna inclusión citoplasmática distintiva.

5.5. Factores relacionados con el crecimiento fetal durante el embarazo

Durante la gestación se establece una importante interrelación morfológica y fisiológica entre la madre y el feto en desarrollo. Esta interrelación está finamente regulada por factores hormonales que aseguran el funcionamiento óptimo de la placenta y garantizan un adecuado aporte de nutrientes y de factores de crecimiento necesarios para el desarrollo fetal.

La placenta produce muchos de estos factores hormonales, tanto de naturaleza esteroidea como proteínica, entre los que podemos mencionar la progesterona, el estradiol, la hCG, el hPL, la leptina y varios factores de crecimiento. Todos estos factores hormonales, son imprescindibles para garantizar el éxito del embarazo y evitar el aborto temprano como es el caso de la progesterona y la hCG; para regular el metabolismo materno y así garantizar una disponibilidad de nutrientes que favorezca el crecimiento placentario y fetal como es el caso del hPL y la leptina. Los factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1 (IGF-I) y sus proteínas transportadoras (IGFBPs) son necesarios para la estimulación del crecimiento y diferenciación de la placenta, lo que garantiza el adecuado funcionamiento de la misma. El IGF-I y sus IGFBPs son también producidos por los tejidos maternos y fetales, fundamentalmente por el hígado y contribuyen a la regulación del metabolismo materno así como a estimular el crecimiento de los tejidos fetales en condiciones nutricionales adecuadas, siendo de gran importancia fundamentalmente a partir de la segunda mitad del embarazo donde ocurre el crecimiento fetal más importante (1, 11-13, 34-41).

Otros factores hormonales que regulan el funcionamiento de la placenta y que garantizan una condición adecuada para el crecimiento fetal no son producidos por la placenta, tal es el caso de la insulina, hormona producida por el tejido pancreático que

estimula el transporte de nutrimentos desde la circulación materna hacia la circulación fetal donde son utilizados por el feto en crecimiento. Los factores nutricionales tales como el aporte de proteínas, las calorías ingeridas y el Zn son también importantes para el desarrollo y crecimiento tanto placentario como fetal (1, 12). Asimismo, las hormonas esteroides producidas por la placenta y las glándulas suprarrenales maternas y fetales desempeñan un papel importante en el mantenimiento del embarazo, en la regulación del metabolismo materno, la estimulación de la síntesis placentaria de factores proteínicos, y en la maduración del feto en desarrollo (1, 11).

A continuación se describe el papel fisiológico de algunos de los más importantes factores relacionados con el crecimiento fetal durante el embarazo normal y la preeclampsia y que son objeto de estudio en el presente trabajo.

5.5.1. IGF-I e IGFbps en el embarazo normal y la preeclampsia

El factor de crecimiento relacionado a la insulina tipo 1 (IGF-I, del inglés Insulin-Like Growth Factor-I), así como sus 6 proteínas transportadoras conocidas como IGFbps (del inglés Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins) son proteínas de secreción, por lo que comparten los mismos mecanismos de biosíntesis y secreción de otras proteínas tales como albúmina, enzimas pancreáticas e insulina.

5.5.1.1. Regulación de la expresión génica de IGF-I y sus IGFbps

El gen que codifica para IGF-I se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 12 (42). Los genes que codifican para IGFbps-1 y para IGFbps-3 están localizados en el brazo corto del cromosoma 7, ambos están asociados con el gen HOXA; los que codifican para IGFbps-2 y para IGFbps-5 están localizados en el brazo

largo del cromosoma 2, asociados con el gen HOXD, el que codifica para IGFBP-4 se encuentra en el brazo largo del cromosoma 17, asociado con el gen HOXB y el que codifica para IGFBP-6 en el cromosoma 12 asociado con el gen HOXC (43).

El IGF-I es una hormona de naturaleza peptídica de bajo peso molecular. El gen del IGF-I abarca más de 45 kb del ADN genómico y está conformado por 6 exones y 5 intrones y posee al menos dos sitios promotores (44). El IGF-I es expresado por todos los tejidos adultos y fetales desde las primeras etapas de la vida. Se han descrito varios transcritos (ARNm) del gen producido por cortes y empalmes alternativos de los diferentes exones que lo conforman (44, 45). Debido a que las tallas moleculares reportadas por los diferentes autores no siempre coinciden, se han utilizado intervalos para su detección que van desde 0.9-1.2, 1.5-1.9, 4.7 y 7-7.5 kb. Todos estos transcritos producen, al final del proceso de maduración, un único producto proteínico de 7.6 kDa con estructura muy similar a la de la proinsulina. Al igual que la proinsulina, el IGF-I está formado por una simple cadena polipeptídica y posee tres puentes disulfuros intracatenarios. Tanto el IGF-I como la proinsulina poseen regiones hidrofóbicas idénticas, asimismo, las cadenas A y B del IGF-I son muy similares a las de la insulina. (46).

La expresión del IGF-I y de sus IGFBPs es regulada por factores hormonales tales como la hormona del crecimiento (GH) los esteroides sexuales, las hormonas tiroideas y la insulina. Los factores nutricionales tales como el consumo de proteínas, las calorías ingeridas y micronutrientes como el Zn son también importantes reguladores (47, 48).

El IGF-I puede tener actividades endocrinas, paracrinas y autocrinas (49, 50). La presencia de dos sitios promotores en el gen del IGF-I garantiza la expresión diferencial que ocurre entre el hígado y el resto de los tejidos. Se han descrito dos tipos

fundamentales de transcritos (ARNm) del IGF-I, identificados uno en el tejido hepático y el otro en el resto de tejidos, los cuales codifican para el mismo péptido maduro. Estos ARNm contienen diferentes regiones 5' no traducible debido al uso de diferentes sitios de iniciación en el exón 1 o en el exón 2. Los transcritos a partir del exón 2 son producidos por el hígado, son regulados fundamentalmente por la GH, el consumo de proteínas, las calorías ingeridas, así como micronutrientes tales como el Zn. Su producto proteínico está destinado a cumplir las funciones endocrinas del IGF-I. Los transcritos producidos a partir del exón 1 se encuentran en todos los tejidos extrahepáticos y su regulación no es por GH; en su lugar otras hormonas tales como los estrógenos sexuales y las hormonas tiroideas son las reguladoras fundamentales. El IGF-I producido en los tejidos extrahepáticos desempeña funciones autocrina-paracrinas (51) (figura 3).

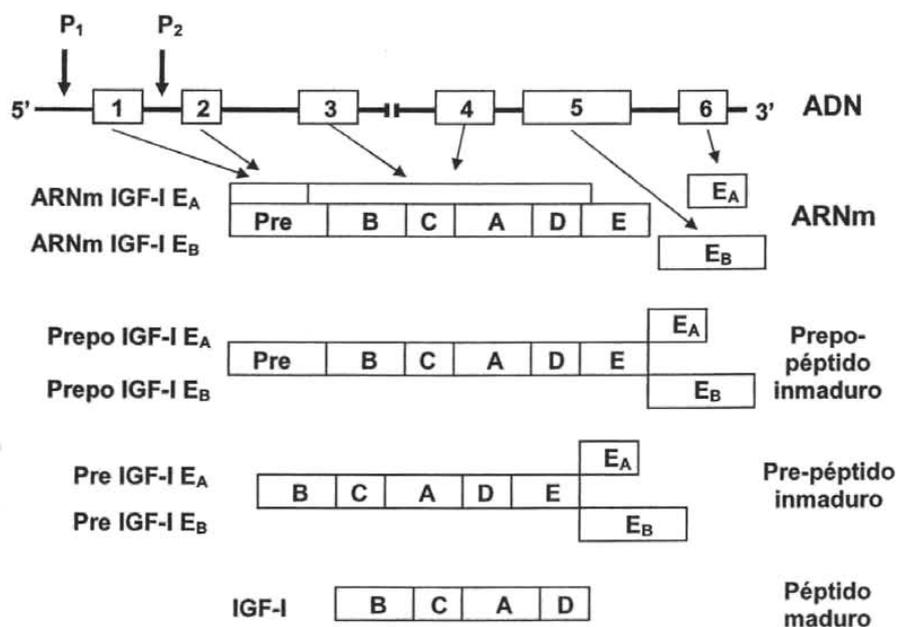


Figura 3. Representación esquemática del procesamiento del gen de IGF-I. Se muestra la distribución de los exones e intrones, los dos sitios promotores (P₁ y P₂), la región del péptido señal (Pre), los dominios A-E y la forma final del IGF-I maduro conteniendo los dominios A-D. [Adaptado de Rotwein P. Structure, evolution, expression and regulation of insulin-like growth factors I and II. Growth Factors 1991;5(1):3-18].

Durante la vida posnatal, el hígado representa la fuente de mayor producción de IGF-I y de sus IGFBPs y su síntesis está regulada por el estado nutricional y la GH, los cuales promueven la transcripción del gen del IGF-I (45, 52) y de algunas de sus IGFBPs, fundamentalmente de la IGFBP-3 (43). Los factores nutricionales tales como el aporte energético, proteínico y de Zn están también involucrados en la regulación de la

síntesis del IGF-I y de sus IGF-BPs, así como del crecimiento (47, 48, 53). El Zn es considerado como un factor de crecimiento, lo cual ha sido ampliamente comprobado, ya que la administración de este nutrimento a niños desnutridos estimula el crecimiento y se asocia con un incremento en los niveles de IGF-I (54). En experimentación animal, se ha demostrado que el Zn aumenta la expresión de IGF-I y modifica la producción de sus IGF-BPs (55). También se ha visto que la suplementación con IGF-I no es eficiente para garantizar el crecimiento en condiciones de deficiencia de Zn (56).

5.5.1.2. Síntesis y regulación de IGF-I durante el embarazo

Como hemos mencionado, la síntesis del IGF-I y de sus IGF-BPs es regulada por factores hormonales como la GH, las hormonas tiroideas, la insulina y por factores nutricionales tales como el consumo de proteínas, las calorías ingeridas y micronutrientes tales como el Zn (47, 48).

Durante el embarazo, la producción hipofisiaria de GH está disminuida, mientras que las concentraciones de IGF-I aumentan a lo largo del período de gestación, alcanzándose las mayores concentraciones al final del embarazo. Este aumento se asocia al incremento en la síntesis de GH placentaria cuya estructura es muy similar a la hipofisiaria pero es codificada por un gen diferente. La GH placentaria es secretada a la circulación materna, donde ejerce un efecto importante en la estimulación de la producción hepática de IGF-I en la madre. En el compartimiento fetal la GH placentaria no presenta efectos ya que no es capaz de cruzar la barrera placentaria. En el compartimiento materno, el IGF-I estimula los procesos anabólicos, lo que resulta en el aumento del tejido graso y del glucógeno hepático (57). La secreción de esta hormona a la circulación materna es menor en mujeres embarazadas con retraso del crecimiento

intrauterino. Lo anterior resulta en una menor producción hepática de IGF-I y por tanto en la disminución de los procesos anabólicos, lo que garantiza una mayor disponibilidad de nutrimentos en la circulación materna para ser transportados hacia el feto en crecimiento bajo condiciones desfavorables. Sin embargo, este mecanismo compensatorio no es suficiente para garantizar el adecuado crecimiento fetal, lo que sugiere la participación de otros factores.

El hPL, la hormona proteínica más abundantemente producida por la placenta pasa a la circulación materna y fetal, donde desempeña diversos papeles. En la circulación materna, el hPL presenta un efecto anti-insulínico lo que induce la acumulación de nutrimentos en la circulación materna, los cuales pueden ser transportados preferentemente hacia el feto a través de la placenta (13). En la circulación fetal, el hPL estimula la síntesis de IGF-I y de glucógeno hepático, además de estimular el crecimiento fetal al unirse a receptores tipo lactogénicos (34).

5.5.1.3. Síntesis de IGF-I durante la vida posnatal

En los primeros días posteriores al nacimiento, las concentraciones de IGF-I disminuyen con respecto a las concentraciones encontradas en la circulación fetal al final del embarazo. En los días posteriores al parto, las concentraciones circulantes de IGF-I aumentan y siguen incrementándose a lo largo de toda la niñez, alcanzando niveles máximos en la pubertad, lo que coincide con el incremento de los esteroides sexuales. A partir de los 25 años de edad y hasta los 60, las concentraciones séricas de IGF-I se mantienen constantes, observándose una disminución en dichas concentraciones a partir de los 60 años de edad (58).

5.5.1.4. Transporte de IGF-I en la circulación

Después de ser sintetizado, el IGF-I es liberado a la circulación donde es transportado por sus IGFBPs. Solamente el 1% del IGF-I circula en forma libre ya que el 75% circula unido a la IGFBP-3, formando un complejo macromolecular que no puede atravesar el endotelio vascular, aumentando su vida media de 10 min cuando está libre a 15 horas cuando está unido a la IGFBP-3. El otro 24% se encuentra unido al resto de las IGFBPs, fundamentalmente a la IGFBP-1 e IGFBP-2 que son de menor tamaño y sí son capaces de atravesar el endotelio vascular (43).

5.5.1.5. Funciones biológicas del IGF-I

El IGF-I es capaz de estimular el crecimiento del cartílago, la síntesis de ARN, de ADN y de proteínas; así como de estimular procesos anabólicos. Durante el embarazo, estimula la división celular y el crecimiento de los tejidos maternos, a la vez que estimulan los procesos anabólicos que dan como resultado el incremento del tejido graso, de las reservas de glucógeno hepático, así como estimular el desarrollo de las glándulas mamarias entre otras modificaciones. En esencia el IGF-I tiene efectos similares a los de la insulina sobre el músculo al estimular el transporte de aminoácidos y glucosa, así como inhibir la lipólisis en el tejido adiposo. Por otra parte, el IGF-I juega un papel importante en el crecimiento como lo demuestra la estrecha correlación entre las concentraciones circulantes de este factor y la velocidad de crecimiento de los niños (40).

5.5.1.6. Regulación de la actividad biológica del IGF-I por sus IGFBPs

Es muy bien conocido que los efectos del IGF-I son modulados por sus IGFBPs (43). Para que el IGF-I pueda ejercer su efecto anabólico y estimular el crecimiento y maduración fetal, es necesario que éste pase del torrente sanguíneo hacia el espacio extravascular y se ponga en contacto con su receptor específico sobre la superficie de sus células blanco. Para que esto ocurra son necesarios dos procesos: que el IGF-I se libere de la IGFBP-3, la que es considerada como el reservorio biológico de IGF-I en la circulación, que por su tamaño no puede atravesar el endotelio vascular, esto se logra a través de la degradación enzimática de la IGFBP-3, lo que produce una disminución entre 20-30 veces de su afinidad por el IGF-I (59), lo que se traduce en mayor concentración de IGF-I libre. Durante el embarazo se produce un incremento en la proteólisis de la mayoría de las proteínas transportadoras del IGF-I, fundamentalmente de la IGFBP-3. Se ha observado que el nivel de proteólisis de la IGFBP-3 es más marcado en mujeres con embarazo múltiple o en condiciones de insuficiencia útero-placentaria, donde la demanda fetal de IGF-I es mayor (60). Este fenómeno de proteólisis ha sido ampliamente descrito en el suero materno (61, 62), pero parece también producirse en alguna medida en el suero proveniente de fetos con retraso del crecimiento intrauterino; sin embargo, la regulación del ensamblaje de la IGFBP-3 con su subunidad sensible a condiciones ácidas, parece ser la forma fundamental de regular la concentración de la IGFBP-3 en la circulación fetal (63).

Otro mecanismo para modular la actividad biológica del IGF-I, es su transporte desde el torrente sanguíneo hasta el espacio intersticial por proteínas transportadoras de bajo peso molecular como las IGFBP-1, 2 y 4, las cuales son capaces de atravesar el endotelio vascular (64, 65) y ponerse en contacto con la superficie de las células blanco

como lo hace la IGFBP-1 a través de su receptor de tipo $\alpha 5\beta 1$ -integrina, lo que genera por un lado la acumulación de IGF-I sobre la superficie de las células blanco, a la vez que se produce cambios conformacionales en la molécula de IGFBP-1 que induce una disminución de la afinidad por el IGF-I, liberándose éste, pudiendo interactuar con su receptor específico y ejercer su efecto estimulador sobre el crecimiento (66). Por otro lado, se ha descrito que la unión de la IGFBP-1 a su receptor de tipo $\alpha 5\beta 1$ -integrina estimula el crecimiento de manera similar a la ejercida por el IGF-I (67, 68). Además existen varios reportes del efecto potenciador de la IGFBP-1 sobre las funciones del IGF-I (69, 70). No obstante, otros reportes también han demostrado un efecto inhibitorio de la IGFBP-1 sobre la respuesta celular a IGF-I "in vitro" (71-73).

5.5.1.7. Relación entre IGF-I, IGFbps y el retraso del crecimiento fetal

Durante el embarazo, el IGF-I y sus IGFbps son importantes para el crecimiento y diferenciación tanto de los tejidos maternos como fetales. Desde etapas muy tempranas del desarrollo, tanto la placenta como el resto de los tejidos fetales producen estos péptidos y expresan sus receptores específicos (50, 74-78). Las concentraciones de IGF-I tanto fetal (38, 79) como maternas (80), aumentan a lo largo del embarazo y al final del embarazo su concentración correlaciona positivamente con el peso al nacer (38, 81, 82).

Los recién nacidos que han sufrido de retraso del crecimiento intrauterino, como ocurre bajo condiciones nutricionales desfavorables, presentan menores concentraciones circulantes de IGF-I e IGFBP-3 y mayores concentraciones de IGFBP-1 que los recién nacidos con peso adecuado para la edad gestacional (83). De manera

similar, estudios recientes han descrito una menor concentración de IGF-I tanto en la circulación materna como del cordón umbilical (18, 84), así como alteraciones en las concentraciones circulantes de la IGFBP-1 y de la IGFBP-3 durante el embarazo complicado con preeclampsia, enfermedad característica por retraso del crecimiento intrauterino (18, 85).

La IGFBP-1 es la proteína transportadora predominante en el fluido amniótico (75) y una de las más abundantes en el plasma fetal (76, 86). La IGFBP-1 se incrementa a lo largo del embarazo en la circulación materna (87) y fetal (82, 88) y al final del embarazo su concentración se asocia negativamente con el peso al nacer, lo que sugiere un papel inhibitorio sobre el crecimiento fetal y un modulador local de la acción del IGF-I. El grado de fosforilación de la IGFBP-1 afecta la afinidad por el IGF-I, siendo las más fosforiladas las de mayor afinidad. Durante la vida posnatal, la IGFBP-1 se sintetiza y se mantiene en circulación como una única isoforma altamente fosforilada. Durante el embarazo, la IGFBP-1 de origen decidual y hepático se sintetiza también como una isoforma única altamente fosforilada. Sin embargo, en la circulación materna, fetal y el líquido amniótico la IGFBP-1 sufre cambios ya que se encuentra como una mezcla de isoformas altamente fosforiladas, de menor grado de fosforilación y desfosforiladas (89). Las isoformas que presentan menor grado de fosforilación tienen menor afinidad por el IGF-I y potencian los efectos biológicos del IGF-I, mientras que las isoformas altamente fosforiladas de la IGFBP-1 inhiben la actividad biológica del IGF-I (90, 91).

En 1998, Iwashita y col. (92) demostraron que los recién nacidos con bajo peso al nacer poseen igual cantidad de la forma no fosforilada de la IGFBP-1 que los recién nacidos con peso adecuado para la edad gestacional, pero la cantidad de la forma altamente fosforilada era mayor por lo que la relación isoforma no fosforilada / IGFBP-1

total era menor en los recién nacidos con bajo peso al nacer para la edad gestacional, lo que sugiere que no solamente la cantidad total de IGFBP-1 sino que la proporción de isoformas con diferentes grados de fosforilación son importantes para el crecimiento fetal.

Otro factor hormonal relacionado estructural y funcionalmente con el IGF-I y sus IGFbps y que juega un papel importante en el crecimiento fetal, es la insulina.

5.5.2. Insulina en el embarazo normal y la preeclampsia

La insulina es una hormona peptídica producida por las células β de los islotes pancreáticos. En el humano su secuencia está codificada por un gen localizado en el brazo corto del cromosoma 11. El producto proteínico del gen es un precursor peptídico de cadena larga conocido como preproinsulina con un peso molecular de 11 500 Da que se produce en el retículo endoplasmático rugoso. La acción de enzimas microsomales la desdoblan en la proinsulina con un peso molecular de alrededor de 9000 Da, casi inmediatamente después de su síntesis. La proinsulina se transporta al aparato de Golgi donde ocurre su empacamiento en los gránulos de secreción y la conversión de la proinsulina a insulina de 51 aminoácidos (a.a) y en un péptido más pequeño conocido como péptido C de 31 a.a, mediante la proteólisis en dos sitios a lo largo de la cadena polipeptídica. La insulina madura posee un peso molecular de 5808 Da y está conformada por dos cadenas A y B, las cuales están unidas por dos puentes disulfuros intercatenario, además, la cadena A posee un puente disulfuro intracatenario; todas estas interacciones le confieren estabilidad a la molécula de insulina.

La función fundamental de la insulina en el organismo es promover la entrada a la célula de nutrimentos necesarios para la síntesis de proteínas, glucógeno y lípidos. Además de estimular estos procesos anabólicos, la insulina inhibe las actividades catabólicas, particularmente la glucogenólisis y la lipólisis. A través de estos mecanismos, la insulina regula la homeostasis del metabolismo energético y estimula el crecimiento de los tejidos.

Durante el embarazo las necesidades nutricionales del feto inducen cambios en la homeostasis metabólica de la madre, que ocasionan cambios fisiológicos y morfológicos en el páncreas materno. El tamaño de los islotes pancreáticos aumentan y las células β secretoras de insulina presentan hiperplasia. Los valores basales de insulina se mantienen invariables al inicio del embarazo, pero se van incrementando a partir del segundo trimestre. A partir de entonces, el embarazo se convierte en un estado de hiperinsulinemia y de resistencia a los efectos metabólicos periféricos de la insulina. En efecto, el estado postprandial de la mujer embarazada se caracteriza por hiperglicemia, altas concentraciones séricas de aminoácidos, ácidos grasos, triglicéridos y colesterol (20, 37), así como por un estado de hiperinsulinemia y una mayor supresión de la producción y liberación de glucagón (20, 93). Se ha demostrado que el incremento en las concentraciones de insulina durante el embarazo es consecuencia de un incremento en la producción pancreática de insulina, ya que su vida media se mantiene constante durante el embarazo (20, 94). La finalidad del incremento de la producción de insulina y el estado relativo de resistencia a su efecto, observado durante el embarazo, es asegurar una provisión postprandial sostenida de glucosa, aminoácidos, ácidos grasos, triacilglicéridos y colesterol al feto. Los cambios observados en las células β

pancreáticas, en relación con la hipersecreción de insulina y el estado de resistencia a la insulina son regulados por el estradiol, la progesterona y el lactógeno placentario (95). El lactógeno placentario, por su lado es capaz de estimular la lipólisis con el consiguiente aumento de las concentraciones de los ácidos grasos libres en la circulación contribuyendo al estado de resistencia a la insulina (1, 13, 20).

Las concentraciones de insulina en la circulación fetal se asocian con el crecimiento fetal. Durante la diabetes gestacional se produce un transporte excesivo de nutrientes hacia el feto, en especial de glucosa, lo que origina una hipersecreción de insulina fetal y por ende el incremento de los procesos anabólicos. Lo anterior resulta en la aceleración del crecimiento dando como resultado la macrosomía fetal (96). En cambio, cuando el feto sufre del síndrome de insuficiencia fetal de insulina como consecuencia de diabetes mellitus congénita y disgenesia pancreática, las concentraciones de insulina son bajas, lo que resulta en retraso del crecimiento intrauterino (12).

Durante el embarazo complicado con preeclampsia severa, los primeros estudios han reportado que tanto la hiperinsulinemia relativa, como el estado de resistencia a la insulina puede verse agudizado (97-99). Recientemente Caruso y col. utilizando una metodología más apropiada han observado la agudización de la hiperinsulinemia y la resistencia a la insulina durante la hipertensión gestacional, pero no en la preeclampsia (100).

Otro factor hormonal relacionado con la insulina, la resistencia a la insulina y la regulación del metabolismo materno, es la leptina.

5.5.3. Leptina en el embarazo normal y la preeclampsia

La leptina es una hormona proteínica producida por el tejido adiposo. En el humano, el gen de la leptina está localizado en el cromosoma 7, y codifica para un producto proteínico de 167 a.a, que posee un puente disulfuro entre los residuos de cisteína 96 y 146 de la cadena polipeptídica, el cual le confiere estabilidad a la estructura proteínica.

Durante el estado de no embarazo, la expresión de leptina en el tejido adiposo cambia paralelamente con los cambios en las concentraciones de insulina asociados con los períodos de alimentación y ayuno (101) o con la infusión de insulina (102). La insulina incrementa la expresión y la liberación de leptina (102) en cultivos de adipocitos y de la grasa epididimal (103) y estimula el transporte de leptina desde el retículo endoplasmático hacia las vesículas de secreción (103).

El embarazo se caracteriza por concentraciones circulantes elevadas de leptina al compararse con el estado de no embarazo. Las altas concentraciones de leptina encontradas durante el embarazo parece actuar como señal para el almacenamiento de energía que es crítico para lograr una reproducción exitosa (35). Las concentraciones maternas de leptina se incrementan a lo largo del embarazo (104) fundamentalmente en el segundo y tercer trimestre y disminuye al momento del parto (105). La hiperleptinemia durante el embarazo es comparable a la encontrada en animales y humanos obesos (35). Debido a que la leptina exógena es rápidamente eliminada de la circulación, con una vida media de 1.6 horas (106), el estado de hiperleptinemia se debe a una producción sostenida de la hormona para mantener sus concentraciones elevadas durante el embarazo. Los cambios en las concentraciones de leptina que ocurre durante el embarazo correlaciona con las concentraciones maternas de estradiol y hCG (107),

sugiriendo una interrelación dinámica entre la leptina y los cambios en los niveles de estas hormonas. Asimismo, las concentraciones de leptina durante el embarazo se asocian con el peso de la placenta y del recién nacido lo que hace de esta hormona un indicador del crecimiento fetal (108).

El aumento de las concentraciones de leptina durante el embarazo no se asocia con la disminución del apetito y del metabolismo energético. La hiperleptinemia puede deberse a la hiperinsulinemia inducida por el embarazo, asociación similar a lo observado durante la obesidad. En la primera etapa del embarazo, la sensibilidad de los adipocitos a la insulina está incrementada, lo que promueve la acumulación de lípidos. Sin embargo, durante el segundo y tercer trimestre del embarazo el tejido adiposo se hace resistente a la insulina (109, 110), períodos en los cuales se presenta un estado de hiperleptinemia (105). Durante el embarazo la placenta constituye un sitio adicional de síntesis de leptina cuya magnitud es similar a la del tejido adiposo (111). La síntesis placentaria de leptina es considerada como una señal para el transporte de nutrimentos hacia el feto. Datos recientes sugieren que la producción placentaria de leptina es regulada por la insulina, ya que la placenta contiene gran número de receptores de insulina y responde agudamente a la hiperinsulinemia con un transporte incrementado de glucosa y con una fosforilación incrementada de la misma (112); por lo que es posible que la producción placentaria de leptina, similarmente a lo que ocurre con el tejido adiposo, sea regulada por la insulina. La observación de que el tratamiento con insulina de mujeres diabéticas embarazadas, incrementa de 3-5 veces la expresión placentaria de leptina (113), apoya esta afirmación.

Durante la preeclampsia y de forma similar a lo descrito para la hiperinsulinemia relativa y la resistencia a la insulina, los resultados relativos a las concentraciones de

leptina son contradictorios. Algunos autores han informado que las mujeres con preeclampsia presentan concentraciones de leptina más elevadas en la circulación materna (114-117), mientras que otros investigadores no encuentran diferencias significativas (114, 118). Asimismo, en el cordón umbilical se ha informado la presencia de mayores concentraciones de leptina (115), mientras que otros reportes no muestran diferencias con respecto a los valores encontrados durante el embarazo normal (116).

Otro conjunto de hormonas, de naturaleza no proteica, también son importantes moduladores de la actividad biológica del IGF-I, imprescindibles para el mantenimiento del embarazo y en la maduración del feto en desarrollo, estas son las hormonas esteroides sexuales y los glucocorticoides.

5.5.4. Hormonas esteroides durante el embarazo normal y la preeclampsia; relación con el crecimiento fetal

Durante el embarazo, la unidad feto-placentaria es responsable del incremento en la producción de hormonas esteroides sexuales y glucocorticoides: estradiol, progesterona y cortisol fundamentalmente (41, 119, 120). La síntesis de esteroides sexuales placentarios se realiza partir del colesterol presente en la circulación materna, el cual es transportado por las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (121, 122). La capacidad de unión específica de las LDL-Colesterol (LDL-C) a los tejidos estereoidogénicos feto-placentarios, se incrementa a lo largo de la gestación, fundamentalmente en el segundo y tercer trimestre. El incremento de la captación de LDL-C por los tejidos estereoidogénicos feto-placentarios está acompañado de un incremento en la expresión de su receptor específico (123). La unidad feto-placentaria se complementa para lograr la síntesis de hormonas esteroides, ya que la placenta

carece de las actividades 17-hidroxilasa y 17,20-desmolasa por lo que es incapaz de convertir los esteroides C₂₁ (progestinas) a esteroides C₁₉ (andrógenos), por lo que la formación de estrógenos (estradiol y estrona) depende de los precursores androgénicos provenientes de las adrenales maternas y fetales.

En condiciones normales, las concentraciones de las hormonas esteroides: estradiol, progesterona y cortisol se incrementan a medida que transcurre el embarazo. El estradiol y la progesterona tienen un efecto vasodilatador demostrado y contribuyen a la estimulación del flujo útero-placentario, facilitando el aporte de nutrientes al feto. Además, estos tres tipos de hormonas están involucradas en la estimulación del crecimiento fetal al regular la síntesis de factores de crecimiento tales como el IGF-I y sus IGFbps.

El estradiol estimula la síntesis de IGF-I y de algunas de sus proteínas transportadoras como la IGFbp-4 (124-126). Algunos autores han observado que mujeres embarazadas que viven a 3000 metros sobre el nivel del mar, presentan concentraciones circulantes de estradiol y estriol más bajas a lo largo de todo el embarazo que aquellas que viven en altitudes más bajas, debido a una reducida oxigenación de la placenta, condición similar a la hipoxia que se observa en la preeclampsia (127). En este estudio, se observó que el grupo de mujeres que sufrían de hipertensión y proteinuria, y padecían por tanto de preeclampsia, mostraron una marcada disminución de estradiol y un aumento en las concentraciones de progesterona (127). Otros autores han reportado una disminución de la concentración del estradiol conjugado, sin variación en la concentración del estradiol libre, ni de progesterona durante la preeclampsia (128).

Durante la preeclampsia severa, algunos autores han reportado altos niveles de progesterona (127), una mayor capacidad de síntesis placentaria (129), y una mayor expresión de los receptores de progesterona en el tejido placentario (130). Ya que la progesterona, ha resultado ser un potente estimulador de la producción "in vitro" de IGFBP-1 (131) se pudiera pensar que el incremento de IGFBP-1 observado en la preeclampsia pudiera ser debido a las altas concentraciones de progesterona reportadas.

Durante el embarazo, las concentraciones de testosterona se encuentran bajas debido a la activa aromatización de ésta en estradiol, siendo el estradiol quien desempeña un papel importante en la estimulación del crecimiento y maduración fetal. Sin embargo, algunos autores han observado un aumento en las concentraciones de testosterona durante la preeclampsia (132, 133), al parecer debido a una pobre aromatización a estradiol provocado por la hipoxia relativa que caracteriza a la preeclampsia. Ya que ha sido reportado un estado de hiperandrogenismo relativo durante la hipertensión gestacional, asociado a un estado de resistencia a la insulina (134), condición ésta que ha sido sugerida también durante la preeclampsia (97-99), no se puede descartar un posible papel estimulador de la testosterona sobre el desarrollo de la resistencia a la insulina reportada durante la preeclampsia.

Finalmente, se sabe que los glucocorticoides, fundamentalmente el cortisol, inhiben la síntesis de IGF-I (135), estimulan la proteólisis de las IGFBPs, fundamentalmente de la IGFBP-3 (136) y la síntesis y secreción de IGFBP-1 (137, 138) efectos que están relacionados con el crecimiento fetal.

Además de los factores hormonales, los factores nutricionales como el zinc están involucrados en la regulación de la actividad del IGF-I, sus IGFBPs y el crecimiento fetal.

5.5.5. Zinc en el embarazo normal y la preeclampsia

El zinc (Zn), es considerado un factor nutricional estimulador del crecimiento somático tanto durante la vida posnatal como intrauterina. Su efecto trófico es atribuido tanto a mecanismos directos o indirectos mediados por la acción del IGF-I.

5.5.5.1. Fuentes, distribución y funciones biológicas del zinc

El Zn es un nutrimento inorgánico distribuido ampliamente en los organismos vivos tanto del reino animal como vegetal. Las fuentes de Zn en la dieta provienen de la carne, pescado, mariscos, aves, hígado, leche y productos lácteos, los cuales proporcionan el 80% de total, el resto se encuentra en nueces y cereales de grano entero. El Zn proveniente de la dieta es absorbido en el intestino y transportado en el plasma sanguíneo en un 95% por la albúmina, la cual es su principal transportador (139). El hígado, páncreas, riñón, hueso y músculos voluntarios son los órganos donde su concentración es más elevada. En la célula el Zn se encuentra en todos los organelos, pero la mayor parte del Zn intracelular está localizado en el citosol. Las concentraciones circulantes de Zn en el plasma de humano son de 70-110 $\mu\text{g/dL}$. El cuerpo humano contiene cerca de 2 g de Zn, se estima que 1.5 g en la mujer adulta, 2.5 g en el hombre adulto y de 60 mg en el recién nacido (140).

El Zn es indispensable para los seres vivos. Tiene muchas acciones biológicas ya que participa en diversas reacciones metabólicas al actuar como cofactor enzimático de más de 200 enzimas involucradas en los procesos de síntesis y degradación. Asimismo, el Zn juega un papel importante en la estabilización de la estructura de los ácidos nucleicos y ribosomas, es un componente de las biomembranas (141, 142) y favorece el

reconocimiento y la interacción de determinadas moléculas proteínicas con el ADN (143, 144), garantizando los procesos de regulación de la expresión génica; desempeñando un papel importante en los procesos de duplicación y diferenciación celular. Por lo que la deficiencia de este nutrimento inorgánico influye negativamente en el proceso de crecimiento (145).

5.5.5.2. Zinc y retraso del crecimiento intrauterino

Durante el embarazo, las deficiencias de Zn pueden causar numerosas anomalías como el aborto espontáneo, embarazo relacionados con enfermedades hipertensivas tales como la preeclampsia, embarazos pretérminos, malformaciones y retardo en el crecimiento intrauterino (146). Varios estudios han demostrado que las bajas concentraciones de Zn en la circulación materna durante el embarazo son causa de desnutrición fetal y por tanto, de bajo peso al nacer (147). En cambio, la suplementación con Zn a mujeres con bajas concentraciones de este micronutriente inorgánico, contrarresta el retraso del crecimiento intrauterino (27, 54).

La deficiencia de Zn no solo se ha asociado con el retraso del crecimiento intrauterino, sino que se ha observado además una disminución en el crecimiento posnatal en individuos con deficiencia de este nutrimento inorgánico (148, 149). Se ha observado que la dieta deficiente de Zn provoca una disminución significativa en las concentraciones circulantes de IGF-I, un retardo en el crecimiento y por lo tanto, bajo peso corporal en ratas (53). Además, se ha visto que en estas condiciones la expresión hepática del IGF-I se encuentra disminuida (150). Esta condición de deficiencia de Zn es capaz además de inducir la disminución de los receptores hepáticos de la GH, así como modificar las actividades biológicas de las IGF-BPs y de la proteína transportadora de la

GH (148, 151). En mujeres sanas la ingesta deficiente de Zn se asocia con bajas concentraciones circulantes de IGF-I, siendo esto independiente del aporte de proteínas. En efecto, el Zn es considerado como un factor de crecimiento, lo cual ha sido ampliamente comprobado, ya que la administración de este nutrimento a niños desnutridos estimula el crecimiento y se asocia con un incremento en los niveles de IGF-I (54). Este tipo de estudio ha sugerido que el IGF-I puede ser regulado de manera importante por el Zn (152).

Durante la preeclampsia, las placentas de mujeres preeclámplicas tienen menor concentración de Zn que las mujeres testigos, y que la deficiencia de este nutrimento inorgánico se asocia con un incremento en la presión arterial (146). Asimismo se ha visto que la frecuencia de embarazos relacionados con preeclampsia moderada es de 5.6% en mujeres con bajas concentraciones de Zn en suero, mientras que en mujeres con concentraciones normales la frecuencia es de solo 0.7% (153). Otros estudios no encuentran relación entre las bajas concentraciones en plasma de Zn y la hipertensión inducida por el embarazo (154).

6. *Metodología*

6. METODOLOGÍA

6.1. Diseño experimental

El presente estudio es de tipo transversal y comparativo.

6.2. Sujetos

Las mujeres reclutadas para el estudio, fueron pacientes embarazadas que acudieron al servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital General "Dr. Manuel Gea González". Todas pertenecían a la población urbana del Distrito Federal, con características socioeconómicas similares. Para la realización de este estudio se contó con la aprobación del Comité Institucional de Investigación Biomédica en Humanos del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" y del Comité de Ética del Hospital General "Dr. Manuel Gea González".

El diagnóstico de la preeclampsia se llevó a cabo tomando en cuenta los criterios de hipertensión y proteinuria previamente establecidos por el grupo de trabajo para el Estudio de la Hipertensión Durante el Embarazo del Programa Nacional de Educación sobre Hipertensión de los Estados Unidos de Norteamérica (14).

6.3. Criterios de selección de la población

6.3.1. Criterios de inclusión

-Edad biológica: 18 a 35 años.

-Embarazadas preeclámpticas (Grupo PE); presión arterial: $\geq 140/90$ mm de Hg y proteinuria: ≥ 100 mg/dL de orina.

-Embarazadas normotensas controles (Grupo NT): presión arterial: $\leq 140/90$ mm de Hg y proteinuria: trazas o negativa.

6.3.2. Criterios de exclusión

-Presencia de enfermedades crónicas.

-Necesidad de reposo por más de dos semanas.

-Estar en tratamientos con medicamentos hormonales que pudieran interferir con la síntesis de IGF-I.

6.3.3. Criterios de eliminación

-Aborto u óbito

-Embarazo gemelar o múltiple.

-Aparición de enfermedades endocrinológicas o de otro tipo con excepción de preeclampsia para el grupo PE.

6.4. Tamaño de la muestra

El cálculo del número de muestra (n) se realizó según la ecuación para muestras independientes:

$$n \geq \frac{2S^2 (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2}{\Delta^2}$$

En donde:

S= Desviación estándar de la concentración de IGF-I en el grupo testigo. Se utilizaron los datos reportados por Halhali y col. (18). En este estudio se reportó una concentración de

IGF-I de 383 ± 74 ng/mL en el grupo normotenso control (NT) y de 265 ± 74 ng/mL en el grupo preecláptico (PE).

Δ = Diferencia mínima entre las concentraciones de IGF-I esperada entre los grupos NT y PE. Para el cálculo del número de muestra (n), se utilizó una diferencia mínima esperada de 118 ng/mL. Considerando $Z\alpha = 1.96$ (que corresponde a un valor de $\alpha = 0.05$) y $Z\beta = 0.84$ (que corresponde a un poder de la prueba de 80%)

$$n \geq \frac{2(74)^2 (1.96 + 0.84)^2}{(118)^2}$$

$$n \geq \frac{2(5476)(7.84)}{13924}$$

$$n \geq 6$$

Se establecieron dos grupos experimentales, el grupo PE conformado por 15 mujeres preeclápticas y el grupo NT de 11 de mujeres normotensas controles, todas con embarazo a término, reclutadas al momento del parto. La selección de la muestra poblacional se realizó de manera consecutiva, según acudían al servicio de Ginecología y Obstetricia. El reclutamiento se realizó con el consentimiento previo de las pacientes, siguiendo los criterios de selección establecidos.

6.5. Toma de muestras

En todos los casos se tomó una muestra de 10 mL de sangre materna y una de 10 mL de sangre del cordón umbilical, en tubos plásticos que contenían una solución de inhibidores de proteasas, para evitar la degradación de los factores proteicos de interés para el estudio. Una vez separados los sueros por centrifugación a 3000 rpm durante 15 min a 4°C durante 15 min, estos fueron correctamente identificados y conservados a -70°C hasta el momento de ser utilizados. Se tomaron explantes de tejido placentario para la determinación de la concentración de proteínas totales, de Zn placentario y para la determinación de los ARN mensajeros de los factores proteicos de interés; estos fueron lavados con solución fisiológica, congelados en nitrógeno líquido, y conservados a -70°C hasta el momento de ser analizados. Otros explantes placentarios se lavaron con solución fisiológica y se conservaron unos en etanol y otros en formaldehído hasta ser utilizados en los análisis de inmunohistoquímica. En todos los casos se tomaron los datos clínicos y personales de la madre y de los recién nacidos.

6.6. Métodos

6.6.1. Estudio de la relación del peso al nacer con las concentraciones circulantes de indicadores del crecimiento fetal durante el embarazo normal y la preeclampsia

6.6.1.1. Cuantificación de las concentraciones de IGF-I

La cuantificación de las concentraciones de IGF-I tanto en el suero materno, como del cordón umbilical, se realizó por un método radioinmunométrico (IRMA) utilizando un estuche comercial (Diagnostic System Laboratories, Webster, Texas, USA), después de la separación de sus proteínas transportadoras en medio etanol-ácido

clorhídrico. La sensibilidad del método fue de 0.8 ng/mL. Los coeficientes de variación intra e interensayos fueron menores de 5% y 10%, respectivamente.

6.6.1.2. Determinación de las IGFbps

La determinación de las IGFbps se realizó a través de la técnica de Western Ligand Blot (WLB), para ello las muestras de suero fueron centrifugadas durante 15 min a 3,500 rpm para eliminar restos de fibrina. Se preparó una mezcla de los sueros provenientes del grupo NT y una de los sueros provenientes del grupo PE. Para ello se mezclaron 20 μ L de cada uno de los sueros obtenidos. Posteriormente a 20 μ L de cada mezcla le adicionó 280 μ L de amortiguador de carga (Tris 62.5 mM pH 6.8, Glicerol 4%, SDS 2%, 25 mM de azul de bromofenol) conteniendo 100 mM de diotreitil (DTT). Se tomaron 10 μ L de un marcador de peso molecular marcado con carbono 14 (Rainbow C¹⁴-methylated protein molecular weight markers, high molecular weight, Code CFA 756, Amersham Pharmacia Biotech, London, UK) y se mezclaron con 40 μ L del amortiguador de carga pero sin DTT. Las muestras y el patrón fueron incubadas a 95°C en un baño de agua durante 3 min, se colocó posteriormente en hielo y se aplicaron 50 μ L de las muestras en cada carrilera con ayuda de puntas finas y largas. Se llevó a cabo la separación electroforética en un gel de poliacrilamida al 11% con SDS a 200 V hasta que las muestras entraron en el gel separador y posteriormente a 300 V durante 18 horas a 4°C, utilizando el amortiguador Tris-glicina-SDS (Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS 0.1%) pH: 8.3, como amortiguador de corrida y una cámara de electroforesis del tipo PROTEAN II xi CELL (Bio-Rad Laboratorios Inc., Hercules, California, USA). Se utilizó una fuente de poder modelo 1000/500 de la misma firma.

Las proteínas separadas en los geles fueron electrotransferidas a una membrana de PVDF (Bio-Rad Laboratorios Inc., Hercules, California, USA) de 0.22 μm , especial para fijar proteínas, con ayuda de un sistema TRANS-BLOT CELL, utilizando el sistema Tris-glicina-metanol (Tris 0.25 M, glicina 1.92 M, metanol 20% V/V) pH 8.3, como amortiguador de transferencia el cual garantiza además de la transferencia la fijación de las proteínas a la membrana de PVDF.

Posteriormente la membrana de PVDF fue incubada con 50 mL del amortiguador SAL 1X (10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH: 7.4) con gelatina al 0.5%, toda la noche a 4°C para bloquear la membrana. Posteriormente se incubó con 10 mL de tampón SAL 1X con 0.15% de gelatina que contenía 800 000 CPM de I¹²⁵-IGF-I, (actividad específica ≥ 2000 Ci/mmoL, Amersham Pharmacia Biotech, London, UK), durante 24 h con agitación pendular a 4°C y posteriormente fue lavada 2 veces con 50 mL del amortiguador SAL 1X con Tween 0.1% durante 15 min y 2 veces con el amortiguador SAL 1X. Una vez seca la membrana se colocó en un cassette para autorradiografía y se incubó durante 4 días a -70°C, posteriormente se reveló la placa y se realizó el análisis densitométrico con ayuda de un analizador de imágenes modelo EAGLE EYE II (Stratagene Laboratory Equipment, La Jolla, California, USA). La intensidad de las manchas fue proporcional a la cantidad de las IGFBPs en cada muestra, pudiéndose comparar las cantidades entre los grupos experimentales (155).

6.6.1.3. Cuantificación de la concentración de insulina

La cuantificación de la concentración de Insulina se realizó por radioinmunoanálisis (RIA) utilizando un estuche comercial (ICN Pharmaceuticals Inc., Orangeburg,

New York, USA). La sensibilidad del método fue de 1.3 $\mu\text{U/mL}$. Los coeficientes de variación intra e interensayos fueron menores de 5% y 10%, respectivamente.

6.6.1.4. Cuantificación de la concentración de glucosa

La cuantificación de la concentración de glucosa se realizó por el método de glucosa oxidasa-peroxidasa (GOD/POD) utilizando un juego de reactivos enzimáticos SERA-PAK^R Glucosa (Bayer Corporation, Tarrytown, New York, USA) y se empleó un analizador automático Technicon KA-50. La señal fue medida a 505 nm.

6.6.1.5. Cuantificación de la concentración de leptina

La cuantificación de la concentración de leptina se realizó por RIA utilizando un estuche comercial (Linco Research Inc., St. Luis, MO, USA). La sensibilidad del método fue de 0.5 ng/mL. Los coeficientes de variación intra e interensayos fueron menores de 5% y 10%, respectivamente.

6.6.1.6. Cuantificación de la concentración de lactógeno placentario

La cuantificación de la concentración de lactógeno placentario se realizó por RIA en fase sólida utilizando un estuche comercial COAT-A-COUNT HPL (Diagnostic Products Corporation, DPC^R, Los Angeles, CA, USA). La sensibilidad del método fue de 0,12 $\mu\text{g/mL}$. Los coeficientes de variación intra e interensayos fueron menores de 5% y 10%, respectivamente.

6.6.1.7. Cuantificación de la concentración de estradiol

La cuantificación de la concentración de estradiol se realizó por RIA utilizando un estuche comercial (WHO Matched Reagent Program). La sensibilidad del método fue de 0.5 pg/mL. Los coeficientes de variación intra e interensayos fueron menores de 5% y 10%, respectivamente.

6.6.1.8. Cuantificación de la concentración de progesterona

La cuantificación de la concentración de progesterona se realizó por un método inmunoenzimático (EIA) utilizando un estuche comercial (Immunometrics, London, UK). La sensibilidad del método fue de 0.12 ng/mL. Los coeficientes de variación intra e interensayos fueron menores de 10% y 15%, respectivamente.

6.6.1.9. Cuantificación de la concentración de testosterona

La cuantificación de la concentración de testosterona se realizó por un método quimioluminiscente IMMULITE^R total testosterone (Diagnostic Products Corporation, DPC^R, Los Angeles, CA, USA). Se utilizó un analizador automático IMMULITE^R. La sensibilidad del método fue de 0,2 ng/mL. Los coeficientes de variación intra e interensayos fueron menores de 10%.

6.6.1.10. Cuantificación de la concentración de cortisol

La cuantificación de la concentración de cortisol se realizó por RIA utilizando un estuche comercial (WHO Matched Reagent Program). La sensibilidad del método fue de 11.5 ng/mL. Los coeficientes de variación intra e interensayos fueron menores de 5% y 10% respectivamente. Es necesario destacar que no hubo diferencias estadísticas

en la hora del parto, ni en la hora de toma de la muestra para la determinación del cortisol.

6.6.1.11. Cuantificación de las concentraciones de zinc

La cuantificación de las concentraciones de zinc en el suero materno y del cordón umbilical, así como del tejido placentario se realizó por el método de espectrofotometría de absorción atómica utilizando un equipo Perkin Elmer 2380, Norwalk Connecticut, USA. La cuantificación de las concentraciones zinc en el tejido placentario se realizó después de la digestión del tejido en ácido nítrico utilizando un aparato de microondas (Microwave Sample Preparation System MDS 2000, CEM Corporation, Matthews, North Carolina, USA). Para lo cual, se tomó un cubo de 0.5 cm³ de tejido placentario, se enjuagó en solución salina procurando quitar toda la sangre y se guardó en un tubo Eppendorf estéril a -70°C hasta su uso.

Posteriormente se pesó la muestra de placenta y se secó en un horno con vacío a 50°C por 90 min, pudiéndose establecer el porcentaje de humedad por pesada analítica diferencial. Luego se digirió aproximadamente 100 mg de trofoblasto (peso seco) de cada muestra en el horno de microondas a 90% de su poder, con 5 mL de ácido nítrico al 70% y 2 mL de agua desionizada, posteriormente se completó el volumen a 25 mL con H₂O desionizada y se determinó la concentración por espectrofotometría de absorción atómica.

La concentración de Zn en las muestras de suero se determinó diluyéndolo 1:10 con agua desionizada.

6.6.2. Estudio de la producción "*in situ*" de IGF-I y de la expresión génica de IGF-I, IGFBP-1 e IGFBP3 en el tejido placentario

6.6.2.1. Estudio de la producción "*in situ*" de IGF-I en el tejido placentario

La evaluación de la producción "*in situ*" de IGF-I en el tejido placentario de mujeres normotensas y preeclámpicas se llevó a cabo a través de un estudio de inmunohistoquímica siguiendo el procedimiento de Sternberger (156, 157). Brevemente: El tejido colectado de 9 placentas NT y 9 PE se fijó en etanol al 100% y se incluyó en parafina. Se cortaron secciones de 5 μm en un micrótopo y se montaron sobre laminillas de vidrio. Las secciones así preparadas se desparafinaron en xileno y se rehidrataron en una serie de alcoholes en concentraciones descendientes hasta acabar en agua destilada. Posteriormente se incubaron en una solución al 3% de peróxido de hidrógeno por 15 minutos para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena. Las secciones se lavaron con el amortiguador fosfato salino al 0.05 M (PBS, pH 7.6) y se incubaron con el primer anticuerpo anti-IGF-I diluido 1:10 en PBS (producido en cabra, Santa Cruz, Biotechnology Inc., California, LA, USA) suplementado con 1% (v/v) de suero normal de cabra, a temperatura ambiente durante toda la noche en cámara húmeda. Posteriormente se realizaron lavados con PBS y se cubrieron con 100 μL de anticuerpo anti-IgG de cabra biotinilado, diluido 1:250 en PBS (producido en conejo, Vectastain Elite PK6105, Vector laboratorios, London, UK) como segundo anticuerpo. Se incubaron una hora a temperatura ambiente. Se lavaron con PBS y se incubaron durante 30 min con 100 μL del complejo biotina-avidina-peroxidasa (Vectastain ABC System, Vector laboratorios, London, UK) a una dilución de 1:20 en PBS. La reacción del complejo biotina-avidina-peroxidasa se visualizó con la adición de 3,3'-diaminobenzidina (DAB,

Sigma-Aldrich Corporation, St Louis, Missouri, USA), la cual se transformó en un producto insoluble de color café-rojizo, que permitió visualizar los sitios donde hubo reacción específica con el anticuerpo anti-IGF-I. Los controles negativos consistieron en una serie paralela de laminillas procesadas exactamente de la misma manera como se describió anteriormente, pero en ausencia del primer anticuerpo. Se utilizó suero normal de cabra en su lugar. La inmunotinción realizada permitió identificar la presencia intracelular del IGF-I sintetizado "*in situ*" por el tejido placentario. La comparación se realizó por análisis visual al microscopio óptico. Cortes de cada placenta se tiñeron con Hematoxilina-Eosina para revelar los núcleos que quedaron teñidos de color azul y el citoplasma de color rosado.

Este estudio se llevó a cabo en cortes de placenta provenientes de 9 mujeres normotensas y 9 preeclámpticas, los cuales fueron observados bajo microscopía óptica (Olimpos BX51, Olympus Industrial America Inc., New York, USA), utilizando una cámara digital CoolSNAP™-Pro *ef* Digital Kit. Las imágenes obtenidas fueron digitalizadas utilizando el programa Imagen Pro^R Plus (Media Cybernetics, San Diego, California, USA), el cual además fue utilizado para el análisis cuantitativo de los cortes. Se determinó el diámetro de las vellosidades, el número de células totales, el porcentaje de células positivas y el porcentaje de áreas positivas a la inmunotinción específica para IGF-I.

El diámetro de las vellosidades coriónicas, fue determinado en imágenes de cortes teñidos con Hematoxilina-Eosina aumentados 40X; se analizaron 3 campos por cada corte de placenta. El número de células totales fue determinado en imágenes de cortes teñidos con Hematoxilina-Eosina aumentados 10X, para ello se contaron todos los núcleos celulares; se analizaron 2 campos por cada corte de placenta. El porcentaje de

células positivas y de áreas positivas a la inmunotinción específica para IGF-I fue determinado en imágenes aumentadas 40X; se analizaron cinco campos por cada corte de placenta.

6.6.2.2 Estudio de la expresión génica de IGF-I, IGFBP-1 e IGFBP3 en el tejido placentario

6.6.2.2.1. Aislamiento de los ARN totales del tejido placentario por ultracentrifugación diferencial en gradiente de cloruro de cesio

Los ácidos ribonucleicos totales (ARN totales) se purificaron a partir del tejido placentario por el método de ultracentrifugación diferencial en gradiente de cloruro de cesio, según el método de Aviv y col. (158). Para ello, todas las soluciones empleadas y los materiales en contacto con el ARN, fueron preparadas y lavados, respectivamente, con agua tratada con pirocarbonato de dietilo al 0.05% (H₂O-DEPC).

Un gramo de cada muestra de tejido placentario que había sido conservado en nitrógeno líquido no por más de 48 h, fue homogenizado en 8 mL de GITC (25 mM de citrato de sodio pH 7.0, 4 M guanidina isothiocyanate, 0.7% 2-mercaptoetanol). Se le adicionó 400 µL de 10% sarcosyl al homogenado, se agitó gentilmente y se centrifugó durante 10 min a 14,000 rpm (12,000 g) a 4°C en una centrífuga J2-MI con un rotor JA 25.5 de Beckman (Beckman Coulter™ Inc., Fullerton, California, USA). El sobrenadante se transfirió a tubos Beckman de polialómero de 12 mL que habían sido llenados previamente con 4mL de solución de cloruro de cesio (5.7 M CsCl, 25 mM de acetato de sodio pH 5.2) y se ultracentrifugó a 32,000 rpm (113,000 g) a 18°C durante 18 h en una ultracentrífuga XL-90 con un rotor SW40 Ti de Beckman. Después de 18 h, el sobrenadante es descartado y el precipitado (ARN totales) fue lavado cuidadosamente

dos veces con 300 μL de $\text{H}_2\text{O-DEPC}$ cada vez y finalmente resuspendido con 300 μL de $\text{H}_2\text{O-DEPC}$, cargando y descargando varias veces la pipeta automática; luego se incubó 5 min a 65°C y se agitó en un agitador para garantizar su total disolución. Se tomaron 4 μL de los ARN totales y se disolvieron en 1mL de $\text{H}_2\text{O-DEPC}$ y se estimó su concentración por un análisis espectrofotométrico en un equipo Beckman DU^R 650 (Beckman CoulterTM Inc., Fullerton, California, USA) a 260 nm con base en que una unidad de densidad óptica = 40 ng/mL de ARN. Como criterio de pureza se utilizó la relación de absorbancia 260/280 nm, considerando óptima si era superior a 1.8.

Para su conservación fueron preparadas alícuotas de 100 μg de ARN en tubos Eppendorf a las que se les adicionó 1mL de alcohol isopropílico y se conservaron a -70°C hasta ser utilizadas. Al momento de ser utilizados, los ARN fueron precipitados por centrifugación a 12,000 rpm a 4°C en una centrifuga Eppendorf, posteriormente se lavaron con etanol al 75% y se reprecipitaron por centrifugación a 7,500 rpm, este procedimiento se realizó dos veces. Finalmente los ARN fueron resuspendidos en 30 μL de $\text{H}_2\text{O-DEPC}$, recuantificados y analizados por electroforesis en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes con formaldehído.

6.6.2.2.2. Preparación de las sondas específicas por RT-PCR

A partir de los ARN totales extraídos de la placenta de una mujer embarazada normotensa control, se sintetizaron los ácidos desoxirribonucleicos complementarios (ADNc) a los ARN mensajeros, a través de la técnica de transcripción reversa (RT) utilizando el sistema SuperScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR (InvitrogenTM life technologies, Carlsbad, California, USA). Posteriormente los ADNc totales se utilizaron como moldes para amplificar los ADNc específicos para cada

producto de interés, a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés: Polimerase Chain Reaction). Para ello se utilizó un juego de secuencias iniciadoras (primers, sintetizados por Invitrogen) adecuado para cada gen de interés, diseñado correctamente con auxilio de un programa de computo utilizando la secuencia de los genes reportados en el GenBank. Las sondas específicas fueron preparadas utilizando aproximadamente 25 µg de los ADNc sintetizados enzimáticamente por la técnica de RT-PCR, los cuales fueron marcados con 50 µCi de [α - 32 P]dCTP (PerkinElmer^R, Life and Analytical Sciences, Boston, Massachusetts, USA) por el método de Random Primers utilizando el sistema RadPrime (InvitrogenTM life technologies, Carlsbad, California, USA).

6.6.2.2.3. Secuencias iniciadoras y protocolos de PCR utilizados para la amplificación de los ADNc de interés

Las secuencias iniciadoras (primers) utilizadas para amplificar el ADNc de IGF-I fueron diseñadas a partir de la secuencia del IGF-I reportada en el GenBank con número de acceso M37484, dichas secuencias iniciadoras amplifican un fragmento del ADNc de 229 pb, que comprende la secuencia desde la posición 92 hasta la 321. Las utilizadas para amplificar el ADNc de la IGFBP-1 fueron diseñadas teniendo en cuenta la secuencia de la IGFBP-1 reportada en el GenBank con número de acceso A128347 y amplifican un fragmento del ADNc de la IGFBP-1 de 209 pb, que comprende la secuencia desde la posición 62 hasta la 271. Mientras que las secuencias iniciadoras para amplificar el ADNc de la IGFBP-3 se diseñaron tomando como referencia la secuencia reportada en el GenBank con número de acceso X64875 y amplifican un

fragmento del ADNc de la IGFBP-3 de 747 pb, que comprende la secuencia desde la posición 624 hasta la 1371. También se utilizaron unas secuencias iniciadoras para ciclofilina (gen constitutivo empleado en la normalización del Southern Blot) que amplifican un fragmento del ADNc de la ciclofilina humana de 453 pb. Todas estas secuencias iniciadoras se pueden observar en la tabla 1.

Tabla 1. Secuencias iniciadoras empleadas para amplificar los ADNc

ADNc	Secuencias iniciadoras empleadas	Orientación
IGF-I	5' TCA CAT CGG CCT CAT AAT ACC 3' 5' AAA TAA AAG CCC CTG TCT CCA 3'	Sentido Antisentido
IGFBP-1	5' AGT GTA CAT TTA ACA GGT GG 3' 5' CGT CTG TTT TTA AAG AGC AT 3'	Sentido Antisentido
IGFBP-3	5' GTT CCA CCC CCT CCA TTC A 3' 5' ACA CAG CCG CCT AAG TCA CAA 3'	Sentido Antisentido
Ciclofilina	5' CCC CAC CGT GTT CGA CAT 3' 5' GCT GGT CTT ATT CCT GGA 3'	Sentido Antisentido

Estas secuencias iniciadoras fueron empleadas en la técnica de PCR para amplificar sus correspondientes ADNc, utilizando las condiciones de temperatura, tiempo y número de ciclos que se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Protocolos de PCR utilizados para amplificar los ADNc

ADNc	T.D. (t)	T.A. (t)	T.P. (t)	Nº Ciclos
IGF-I	94 (45)	56.4 (45)	72 (30)	30
IGFBP-1	94 (45)	54 (45)	72 (45)	35
IGFBP-3	94 (45)	57 (90)	72 (120)	30
Ciclofilina	94 (45)	56.4 (45)	72 (30)	30

T.D.: temperatura de desnaturalización; T.A.: temperatura de alineación; TP.: temperatura de polimerización (elongación); t: tiempo en segundos. Las temperaturas están expresadas en grados Celsius.

6.6.2.2.4. Separación electroforética de los ARN totales y transferencia por capilaridad

En todos los casos se separaron electroforéticamente 30 µg de los ARN totales extraídos del tejido placentario de mujeres normotensas y preeclámpticas en geles de agarosa al 1.2% (Invitrogen™ life technologies, Carlsbad, California, USA) bajo condiciones desnaturalizantes con formaldehído. La separación electroforética se realizó utilizando amortiguador MOPS 1X (MOPS 20 mM, NaAc 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.2) a 6 V/cm (50 V) durante 2.5 h, en un sistema de electroforesis horizontal (Mdicell EC350, E-C Apparatus Corporation, Holbrook, New York, USA), se empleó una fuente de poder (Power Pac 200, Bio-Rad Laboratorios Inc., Hercules, California, USA). Posteriormente los geles fueron lavados 30 min con H₂O-DEPC y equilibrados durante 1 h con solución 10X SSC (1.5 M NaCl, 0.15 M citrato de trisodio heptahidratado). Después de equilibrados los geles, los ARN fueron transferidos por capilaridad a una membrana de nylon marca Zeta-Probe GT (Bio-Rad Laboratorios Inc., Hercules, California, USA). La transferencia se realizó durante toda la noche a T.A. utilizando como fase móvil una solución de 10X de SSC. Una vez terminada la transferencia, las membranas fueron lavadas brevemente con solución 2X SSC y los ARN fueron fijados a las membranas con luz ultravioleta utilizando un UV Stratalinker 1800 (Stratagene Laboratory Equipment, La Jolla, California, USA).

6.6.2.2.5. Hibridización por Northern Blot de IGF-I, IGFBP-1 e IGFBP-3

La membrana fue prehibridizada con 25 mL de la solución de hibridización: amortiguador fosfato de sodio (J.T.Baker) 500 mM pH 7.2, SDS 7% (Quantum),

durante 2 h a 65°C en un horno de hibridación (Hybaid Instruments, Holbrook, New Cork, USA) con una velocidad de rotación de 7 rpm. Se tomó la sonda marcada con [α -³²P]dCTP (PerkinElmer^R, Life and Analytical Sciences, Boston, Massachussets, USA) y se desnaturalizó por incubación 5 min agua hirviendo, posteriormente se enfrió en hielo durante 2 min y se adicionó a 7.5 mL de solución de hibridación limpia. Se desechó la solución utilizada para prehibridar la membrana y se le adicionó los 7.5 mL de solución de hibridación conteniendo la sonda desnaturalizada y se hibridó durante toda la noche a 65°C. La membrana fue lavada dos veces con 25 mL de la solución fosfato 40 mM pH 7.2, SDS 5% y dos veces con 25 mL de solución fosfato 40 mM pH 7.2, SDS 1%, durante 30 min cada vez a 65°C. Se sacó la membrana y se secó con papel absorbente con cuidado para quitar el exceso de líquido, se envolvió en papel estirable y autoadherible, se colocó en un cassette de autoradiografía y se le puso una placa de rayos X durante 18 h a -70°C. La placa después de revelada fue analizada en un analizador de imágenes Eagle Eye II (Stratagene Laboratory Equipment, La Jolla, California, USA).

El protocolo general descrito es para el estudio de la expresión de la IGFBP-1 y la IGFBP-3; para el estudio de los ARN mensajeros del IGF-I, la temperatura de prehibridación, hibridación y lavados es 60°C en lugar de 65°C.

Para el análisis de la expresión placentaria del IGF-I, además de la técnica de Northern Blot, se realizó un RT-PCR y al producto sintetizado se le realizó un Southern Blot. La expresión de IGF-I se normalizó con respecto a la expresión de ciclofilina.

6.6.2.2.6. Separación electroforética y transferencia de los ADNc de IGF-I y ciclofilina

Se corrieron electroforéticamente 10 μ L de cada uno de los ADNc previamente amplificados para IGF-I y para ciclofilina. Los que se aplicaron en el mismo gel, poniendo en la parte superior del gel los amplificados para IGF-I y a la mitad del gel los amplificados para ciclofilina, guardando el mismo orden para que en un mismo carril corrieran los productos de RT-PCR obtenidos a partir de la misma muestra de ARN. La separación electroforética se realizó en un gel de agarosa al 1.2% (Invitrogen™ life technologies, Carlsbad, California, USA) con TAE 1X (Tris 40 mM, NaAc 20 mM, 1 mM EDTA, pH 7.4) a 6 V/cm (50 V) durante 1 h, en un sistema de electroforesis horizontal (Midicell EC350, E-C Apparatus Corporation, Holbrook, New York, USA), empleando una fuente de poder (Power Pac 200, Bio-Rad Laboratorios Inc., Hercules, California, USA). Posteriormente el gel fue equilibrado durante 15 min con 0.25 M de HCl para despurinizar el ADN y facilitar su transferencia. Después fue incubado con agitación pendular en 0.5 M NaOH, 1 M NaCl durante 30 min a T.A. para desnaturalizar los ADNc. Una vez desnaturalizados, el gel fue sumergido en 0.5 M Tris-HCl, pH 7.4, 3 M NaCl durante 30 min a T.A. con agitación pendular para neutralizar su pH. Una vez equilibrado el gel, los ADNc fueron transferidos por capilaridad a una membrana de nylon marca Zeta-Probe GT (Bio-Rad Laboratorios Inc., Hercules, California, USA). La transferencia se realizó durante toda la noche a T.A. utilizando como fase móvil una solución de 10X de SSC. Una vez terminada la transferencia, la membrana fue lavada brevemente con solución 2X SSC y los ADNc fueron fijados a la membrana con luz ultravioleta utilizando un UV Stratalinker 1800 (Stratagene Laboratory Equipment, La Jolla, California, USA).

6.6.2.2.7. Hibridización simultánea de IGF-I y ciclofilina por Southern Blot

Para la hibridización simultánea de IGF-I y ciclofilina, se siguió el mismo procedimiento descrito en el capítulo 6.6.2.2.5 con la excepción de las temperaturas de prehibridización, hibridización y lavado que fueron de 60°C en lugar de 65°C.

6.6.3. Estudio de la afinidad y la densidad superficial de los receptores de IGF-I e insulina en la membrana citoplasmática del tejido placentario

6.6.3.1. Aislamiento de las membranas citoplasmáticas del tejido placentario

El análisis de las características cinéticas de los receptores de superficie del IGF-I y de la insulina se llevó a cabo preparaciones de membranas citoplasmáticas de explantes del tejido placentario proveniente de mujeres embarazadas normotensas y preeclámpticas obtenidos al momento del parto. Para ello los explantes del tejido placentario fueron lavados en solución salina (NaCl 0,9%), para eliminar el exceso de sangre. Posteriormente fueron congelados en nitrógeno líquido y conservados a -70°C hasta el momento de su utilización. Fue entonces, que se pesaron 5 g de tejido placentario por duplicado y se añadieron a tubos falcon de 50 mL, que contenían 20 mL del tampón de homogenización [Tris-HCl 50 mM pH: 7.7, 0.25 M de sacarosa, EDTA 5 mM, bacitracina 0.05%, PMSF 20 µg/mL, conteniendo un cóctel de inhibidores de proteasas (1 tableta del Complete Protease Inhibitor Cocktail por cada 50 mL del tampón, Roche Diagnostics Corporation, Indianápolis, USA)] y se cortaron con una tijera estéril en pequeños pedazos. Posteriormente el tejido cortado fue homogenizado en baño de hielo utilizando un homogenizador de cuchilla tipo Polytron, durante 15 seg 3 veces a máxima velocidad. El homogenizado fue centrifugado a 600 g (2,250 rpm en tubos Beckman, cat.

35700 y rotor JA-25 en centrifuga Beckman J2-M1) durante 10 min a 4⁰C. El sobrenadante fue filtrado en gasas estériles y el precipitado fue desechado. El sobrenadante filtrado fue centrifugado una vez más a 10,500 g (9,300 rpm en tubos Beckman, cat. 35700 y rotor JA-25 en centrifuga Beckman J2-M1) durante 30 min a 4⁰C. El precipitado fue nuevamente desechado y el sobrenadante fue transferido a 6 tubos de polialomero de 5.2 mL (Beckman, cat. 326819) y ultracentrifugado a 37,000 g (18,000 rpm en ultracentrifuga Beckman XL-900 y rotor SW 50.1) durante 30 min a 4⁰C. El sobrenadante fue desechado y el precipitado de cada tubo fue resuspendido con 3 mL del tampón de conservación (Tris-HCl 50 mM, pH: 7.7, EDTA 5 mM, Bacitracina 0.05%, PMSF 20 µg/mL, conteniendo un cóctel de inhibidores de proteasas) y homogenizado en frío (baño de hielo) con un homogenizador de pistón tipo Potter 5 veces. Se completó el volumen y se repitió el proceso de ultracentrifugación dos veces más para lavar las membranas y eliminar resto de hemoglobina y de proteasas intracelulares que pudieran dañar la integridad de las proteínas de membranas. Finalmente, el precipitado fue resuspendido en 3.1 mL del tampón de conservación. Una alícuota fue evaluada por el método de Bradford (159) para determinar la concentración total de proteínas. El resto fue conservado a -70⁰C hasta su utilización.

6.6.3.2. Ensayo de radiorreceptores de IGF-I

El ensayo de radiorreceptores de IGF-I se llevó a cabo utilizando las preparaciones de membranas citoplasmáticas provenientes de los tejidos placentarios obtenidos de mujeres normotensas y preeclámpticas aisladas por el procedimiento antes descrito. Para el ensayo se utilizaron tubos de borosilicato de 12x75 mm. Se emplearon 60 µL por tubo de la preparación de membranas. Se utilizó IGF-I marcado comercial (Amersham

Pharmacia Biotech, London, UK) con actividad específica de 2000 Ci/mmol (263 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, PM: 7.6 kD). El ^{125}I -IGF-I liofilizado, fue resuspendido con 100 μL de 0.1% de ácido acético y se diluyó con tampón de ensayo Tris-HCl 50 mM pH: 7.7, bacitracina 0.05%, PMSF 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, MgCl_2 10 mM, BSA 0.5%, hasta 8 000 CPM por cada 100 μL , que representó 0.0175 ng de ^{125}I -IGF-I. Se utilizaron 100 μL de una curva estándar de IGF-I frío (Invitrogen™ life technologies, Carlsbad, California, USA) de 0.81, 1.62, 3.25, 6.5, 13, 26, 52 ng/mL (0.036-2.28 nM), la unión específica máxima se obtuvo incubando 100 μL de ^{125}I -IGF-I (8 000 CPM), 140 μL de tampón de ensayo y 60 μL de la preparación de membranas. La unión inespecífica se obtuvo al incubar 100 μL de ^{125}I -IGF-I (8 000 CPM), 100 μL de una solución de 208 ng/mL (9.12 nM), 40 μL de tampón de ensayo y 60 μL de la preparación de membrana. El volumen final del ensayo fue de 300 μL , se mezclaron todos los tubos y fueron incubados con agitación a 4⁰C durante toda la noche. Al día siguiente se le adicionó a cada tubo excepto a los totales, 1 mL del tampón de precipitación (Tris-HCl 50 mM pH: 7.7, bacitracina 0.05%, PMSF 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, MgCl_2 10 mM, BSA 0.5%, PEG-8000 8%), se mezclaron y se centrifugaron durante 30 min a 3,000 rpm a 4⁰C. Posteriormente se desechó el sobrenadante, se secaron los bordes de los tubos y se contaron los precipitados presentes en el fondo de los tubos en un contador de radiaciones gamma a un minuto por tubo (Cristal Plus, Multidetector RIA System. Packard, USA).

6.6.3.3. Marcaje de insulina humana

Se utilizó insulina humana recombinante comercial (Novolin^{MR}R, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark), la cual fue dializada durante 72 h en tampón fosfato de sodio 0.05 M, pH: 7.4, para eliminar las trazas de fenol que se utilizan como preservativo y que pueden interferir con la reacción de marcaje con I^{125} . Luego de la diálisis, se determinó la concentración de insulina por RIA (ICN Pharmaceuticals Inc., Orangeburg, New York, USA). Una alícuota de la insulina dializada se utilizó para marcar con I^{125} por el método de cloramina T. Se utilizaron 2.5 μ g de insulina en 25 μ L de tampón fosfato de sodio 0.05 M, pH: 7.4, se mezclaron con 10 μ L de NaI^{125} (1 mCi), 15 μ L de cloramina T (5 mg/mL de tampón fosfato de sodio 0.05 M, pH: 7.4), se mezcló y se incubó por 1 min a temperatura ambiente. Se le adicionó 50 μ L de metabisulfito de sodio (15 mg/mL de tampón fosfato de sodio 0.05 M, pH: 7.4) y se mezcló para detener la reacción. La hormona marcada se separó por cromatografía de gel filtración en una columna de 1,1 X 19 cm de Sephadex G-25 equilibrada con tampón fosfato de sodio 0.05 M, pH: 7.4 y se utilizó este mismo tampón como fase móvil. Se recolectaron alícuotas de 3 mL por tubo. Una alícuota de 1 mL del tubo correspondiente al pico de la insulina marcada se pasó nuevamente por una columna de 1,1 X 29 cm de Sephadex G-100 equilibrada con tampón Tris-HCl 50 mM pH: 7.7 y se utilizó este mismo tampón como fase móvil, el cual es el mismo tampón empleado en los ensayos de radiorreceptores. Se logró obtener una insulina marcada con I^{125} con una actividad específica de aproximadamente 260 μ Ci/ μ g (1625Ci/mmol, PM: 6 kD).

6.6.3.4. Ensayo de radiorreceptores de insulina

Para el ensayo, se utilizaron tubos de borosilicato de 12X75 mm. Se emplearon 60 μL por tubo de la preparación de membranas. Se utilizó la insulina marcada según el procedimiento antes descrito y se diluyó con tampón de ensayo (Tris-HCl 50 mM pH: 7.7, bacitracina 0.05%, PMSF 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, MgCl_2 10 mM, BSA 0.5% hasta 24 000 CPM por cada 100 μL , que representó 0.0383 ng de insulina- ^{125}I . Se utilizaron 100 μL de una curva estándar de insulina fría de 4.46, 8.92, 17.8, 35.7, 71.4, 142.8, 285.6 ng/mL, la unión específica máxima se obtuvo incubando 100 μL de insulina- ^{125}I (24 000 CPM), 140 μL de tampón de ensayo y 60 μL de la preparación de membranas. La unión inespecífica se obtuvo al incubar 100 μL de insulina- ^{125}I (24 000 CPM), 100 μL de una solución de 571.2 ng/mL (31.7 nM), 40 μL de tampón de ensayo y 60 μL de la preparación de membrana. El volumen final del ensayo fue de 300 μL , se mezclaron todos los tubos y fueron incubados con agitación a 4 $^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche. Al día siguiente se le adicionó a cada tubo excepto a los totales, 1 mL del tampón de precipitación (Tris-HCl 50 mM pH: 7.7, PMSF 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, bacitracina 0.05%, MgCl_2 10 mM, BSA 0.5%, PEG-8000 8%), se mezclaron y se centrifugaron durante 30 min a 3,000 rpm a 4 $^{\circ}\text{C}$. Posteriormente se desechó el sobrenadante, se secaron los bordes de los tubos y se contaron los precipitados presentes en el fondo de los tubos en un contador de radiaciones gamma a un minuto por tubo (Cristal Plus, Multidetector RIA System. Packard, USA).

6.7. Análisis Estadístico

Los datos se presentan como media \pm desviación estándar. La comparación de variables entre dos grupos experimentales se realizó a través de la prueba de U de Mann-Withney. El análisis de frecuencia de uno u otro sexo se realizó a través del método de χ^2 . Para analizar la asociación entre las variables se utilizó el método de correlación de rangos de Spearman y para evaluar el orden en que las variables estudiadas se asociaban con el peso al nacer, se utilizó la prueba de regresión múltiple paso a paso. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas a $P < 0.05$. Todos los cálculos se realizaron utilizando el paquete estadístico Statview 4.02 (Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA).

7. Resultados

7. RESULTADOS

7.1. Relación del peso al nacer con las concentraciones circulantes de indicadores del crecimiento fetal durante el embarazo normal y la preeclampsia

7.1.1. Datos clínicos de los grupos NT y PE

La tabla 3 resume las características clínicas de los grupos estudiados. Todas las mujeres que conformaron el grupo preecláptico tuvieron diagnóstico de preeclampsia moderada, según los criterios de hipertensión y proteinuria establecidos (14). La edad biológica, la edad gestacional, el número de partos y el sexo de los recién nacidos no fueron estadísticamente diferentes entre los grupos NT y PE. Todos los productos de las mujeres embarazadas normotensas fueron de peso adecuado para su edad gestacional (PAEG) según los criterios de Lubchenco y col. (160, 161) y Capurro y col. (162) mientras que 5 de los 15 recién nacidos del grupo de mujeres preeclápticas tuvieron peso bajo para la edad gestacional (PBEG). El peso promedio de los recién nacidos del grupo PE fue significativamente ($P < 0.05$) menor que el del grupo NT.

Tabla 3. Características Clínicas de los Grupos NT y PE

	Grupo NT (n=11)	Grupo PE (n=15)	P
Edad biológica (años)	25.5 ± 5.3	24.3 ± 5.4	0.68
Edad gestacional (semanas)	38.9 ± 1.2	38.5 ± 1.6	0.64
Presión arterial sistólica (mm Hg)	116 ± 7	152 ± 14	< 0.0001
Presión arterial diastólica (mm Hg)	72 ± 6	105 ± 11	< 0.0001
Proteinuria (Nº de + en la tira reactiva)	Trazas	3.1 ± 0.6	-----
Nº de partos	2.1 ± 1.1	2.1 ± 1.2	0.86
Pesos de los recién nacidos (Kg)	3.31 ± 0.3	2.83 ± 0.46	0.01
Prop. rec.nac. bajo peso para edad gest.	0/11	5/15	-----
Proporción de rec. nac. de sexo fem.	7/11	5/15	0.13

Proteinuria: Trazas ≤ 10 mg/dL, 1+ = 30 mg/dL, 2+ = 100 mg/dL, 3+ ≥ 300 mg/dL. Las diferencias estadísticamente significativas fueron consideradas a P < 0.05.

**ESTA TESIS NO SALI
DE LA BIBLIOTECA**

7.1.2. Concentraciones de IGF-I, lactógeno placentario y leptina de los grupos NT y PE

Las concentraciones circulantes de IGF-I fueron significativamente menores en el suero materno ($P < 0.001$) y en el suero del cordón umbilical ($P < 0.05$) del grupo PE comparadas con las del grupo NT, mientras que las concentraciones lactógeno placentario y leptina no mostraron diferencias significativas entre los grupos (tabla 4).

Tabla 4. Concentraciones de IGF-I, lactógeno placentario y leptina de los grupos NT y PE

	Grupo NT (n=11)	Grupo PE (n=15)	P
IGF-I en el suero materno (ng/mL)	317 ± 73	202 ± 62	< 0.001
IGF-I en el suero del cordón umbilical (ng/mL)	101 ± 42	60 ± 43	0.02
Lactógeno placentario en el suero materno (µg/mL)	5.5 ± 1.7	6.4 ± 1.5	0.29
Lactógeno placentario en el cordón umbilical (µg/mL)	0.24 ± 0.17	0.23 ± 0.19	0.69
Leptina en el suero materno (ng/mL)	24.7 ± 11.4	25.6 ± 13.5	0.96
Leptina en el suero del cordón umbilical (ng/mL)	8.1 ± 4.2	9.7 ± 7.6	0.68

Las diferencias estadísticamente significativas fueron consideradas a $P < 0.05$.

7.1.3. Perfil de las IGFbps en los grupos NT y PE

El análisis de las IGFbps de los sueros materno y de cordón umbilical de ambos grupos se muestra en la figura 4. En el perfil de IGFbps de los sueros de cordón umbilical se puede apreciar en un grupo de bandas con pesos moleculares aparentes entre 23 y 43 kDa. Esas bandas corresponden a la forma glicosilada y no glicosilada de la IGFBP-3 (42.9 y 39.2 kDa, respectivamente), la IGFBP-2 (34.5 kDa), la IGFBP-1 (29.7 kDa), la IGFBP-4 glicosilada (29.1 kDa), la IGFBP-5 (27.9 kDa) y la IGFBP-4 no glicosilada (23.3 kDa), respectivamente. Como se puede observar, las cantidades de las formas glicosiladas y no glicosiladas de la IGFBP-3 en la mezcla de sueros del cordón umbilical del grupo PE fueron 80% y 60% menores, respectivamente, que las del grupo NT, en contraste la cantidad de IGFBP-1 fue 3 veces mayor en el grupo PE; sin diferencias significativas en el resto de las IGFbps (figura 4A). El perfil de las IGFbps del suero materno mostró dos únicas bandas, que corresponden a la IGFBP-2 y a la IGFBP-1, encontrándose 7.5 veces mayor la cantidad de IGFBP-1 en el suero materno del grupo PE comparado con la encontrada en el grupo NT; sin diferencias significativas en la cantidad de IGFBP-2 (figura 4B).

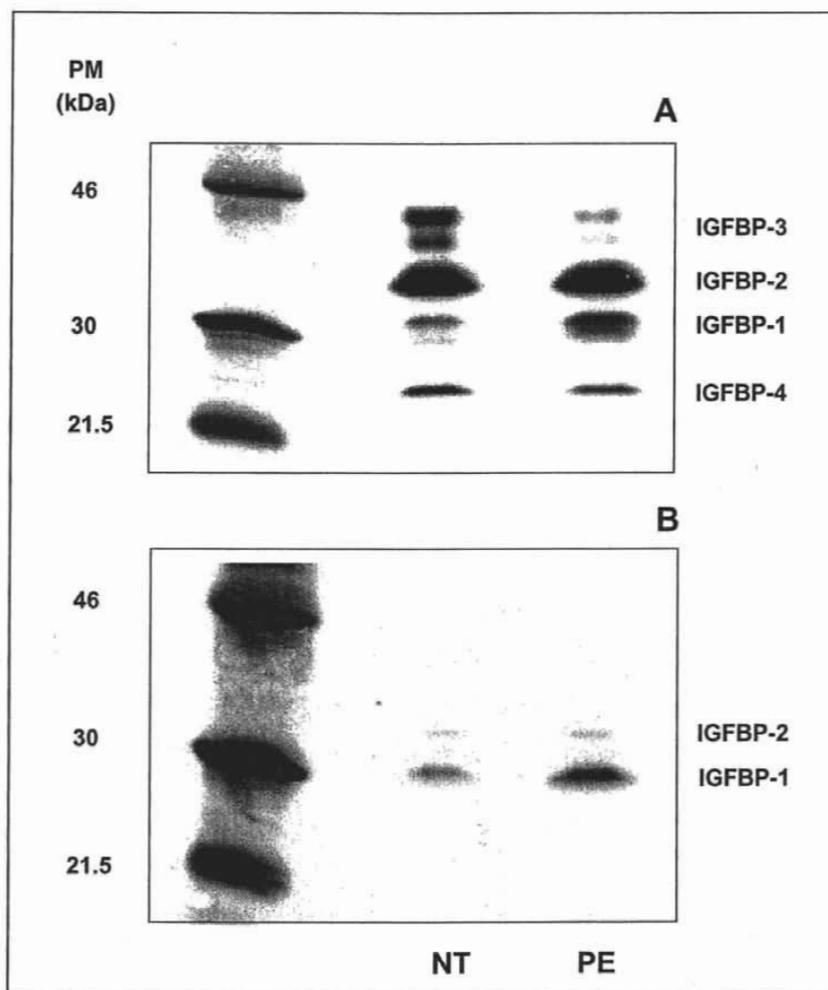


Figura 4. Perfil de las IGFBPs del suero del cordón umbilical (A) y del suero materno (B) de los grupos NT y PE.

7.1.4. Concentraciones de insulina, glicemia e índice de resistencia a la insulina de los grupos NT y PE

Las concentraciones circulantes de insulina y glucosa, no mostraron diferencias significativas entre los grupos NT y PE. Por lo cual el índice de resistencia a la insulina no mostró tampoco diferencias significativas entre los grupos. El índice de resistencia a la insulina fue mayor de 2.5 en la circulación materna de ambos grupos lo que denota un estado de resistencia a la insulina, sin diferencias significativas entre los grupos NT y PE (tabla 5).

Tabla 5. Concentraciones de insulina, glicemia e índice de resistencia a la insulina de los grupos NT y PE

	Grupo NT (n=11)	Grupo PE (n=15)	P
Insulina en el suero materno (μ UI/mL)	22.1 \pm 11.8	22.0 \pm 13.1	0.97
Insulina en el suero del cordón umbilical (μ UI/mL)	12.5 \pm 5.4	10.2 \pm 1.9	0.57
Glicemia en el suero materno (mg/dL)	90 \pm 25	88 \pm 26	0.33
Glicemia en el suero del cordón umbilical (mg/dL)	72 \pm 17	70 \pm 19	0.71
Índice de resistencia a la insulina en la circulación materna	5.1 \pm 2.8	4.6 \pm 3.3	0.54
Índice de resistencia a la insulina en la circulación fetal	2.0 \pm 0.7	1.7 \pm 0.7	0.23

IRI = $\frac{\mu\text{UI/mL de insulina en ayuno}}{22.5 \times \text{mmoles/L de glucosa en ayuno}}$

Si el IRI > 2.5 significa que existe resistencia a la acción de la insulina.
Las diferencias estadísticamente significativas fueron consideradas a P < 0.05.

7.1.5. Concentraciones de progesterona, estradiol, testosterona y cortisol de los grupos NT y PE

Las concentraciones de las hormonas esteroideas: progesterona, estradiol, testosterona y cortisol no mostraron diferencias significativas entre los grupos NT y PE (tabla 6).

Tabla 6. Concentraciones de progesterona, estradiol, testosterona y cortisol de los grupos NT y PE

	Grupo NT (n=11)	Grupo PE (n=15)	P
Estradiol en el suero materno (ng/mL)	20.9 ± 9.1	3.0 ± 10.6	0.82
Estradiol en el suero del cordón umbilical (ng/mL)	6.2 ± 2.6	9.9 ± 5.2	0.11
Progesterona en el suero materno (ng/mL)	244 ± 68	342 ± 130	0.30
Progesterona en el suero del cordón umbilical (ng/mL)	964 ± 391	826 ± 446	0.40
Testosterona en el suero materno (ng/mL)	1.2 ± 0.8	2.1 ± 1.3	0.10
Testosterona en el suero del cordón umbilical (ng/mL)	1.6 ± 0.7	2.1 ± 0.9	0.10
Cortisol en el suero materno (ng/mL)	381 ± 203	395 ± 244	> 0.99
Cortisol en el suero del cordón umbilical (ng/mL)	154 ± 44	151 ± 90	0.42

Las diferencias estadísticamente significativas fueron consideradas a $P < 0.05$.

7.1.6. Concentraciones circulantes y placentarias de Zn en los grupos NT y PE

Las concentraciones circulantes tanto maternas como del cordón umbilical, así como la concentración placentaria de Zn expresada por g de proteína, no mostraron diferencias significativas entre los grupo NT y PE (tabla 7).

Tabla 7. Concentraciones circulantes y placentarias de Zn en los grupos NT y PE

	Grupo NT (n=11)	Grupo PE (n=15)	P
Zinc en el suero materno ($\mu\text{g}/\text{dL}$)	104 \pm 25	114 \pm 28	0.29
Zinc en el suero del cordón umbilical ($\mu\text{g}/\text{dL}$)	122 \pm 11	144 \pm 32	0.10
Zinc en el tejido placentario ($\mu\text{g}/\text{g}$ de proteínas)	352 \pm 121	312 \pm 162	0.28

Las diferencias estadísticamente significativas fueron consideradas a $P < 0.05$.

7.1.7. Relación del peso al nacer con la presión arterial y la edad gestacional en los grupos NT y PE

El peso al nacer correlacionó positiva y significativamente con la edad gestacional ($Rho = 0.61$; $P = 0.002$) y con la presión arterial diastólica ($Rho = -0.41$; $P = 0.04$) (figura 5), no así con la presión arterial sistólica cuando los grupos NT y PE se analizaron juntos. Cuando los grupos fueron analizados por separados, el peso al nacer se asoció positiva y significativamente con la edad gestacional tanto en el grupo NT ($Rho = 0.63$; $P = 0.04$) como en el grupo PE ($Rho = 0.68$; $P = 0.01$), mientras que no se encontró asociación entre el peso al nacer con la presión arterial sistólica o diastólica en ninguno de los dos grupos por separados.

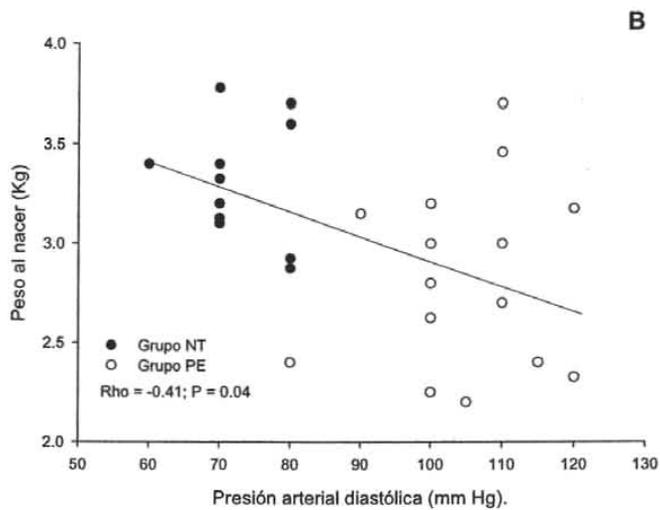
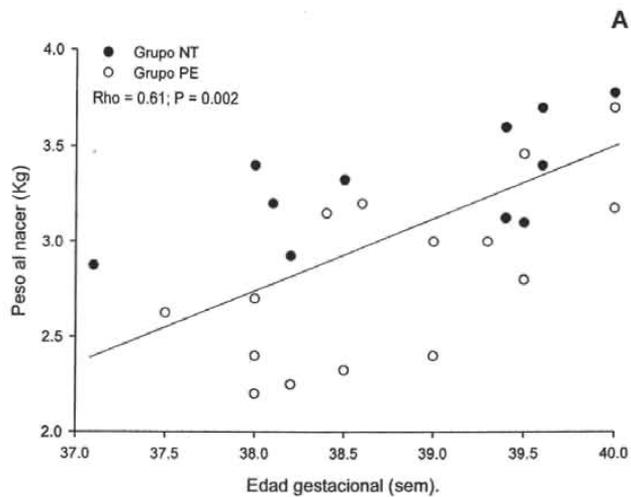


Figura 5. Relación del peso al nacer con la edad gestacional (A) y la presión arterial diastólica (B) en los grupos NT y PE.

7.1.8. Relación del peso al nacer con las variables bioquímicas estudiadas en los grupos NT y PE

La relación del peso al nacer con las concentraciones de las variables bioquímicas estudiadas fue analizada en los grupos NT y PE. El peso al nacer se asoció positiva y significativamente con las concentraciones maternas y del cordón umbilical de IGF-I (Rho = 0.72; P = 0.0003 y Rho = 0.79; P < 0.0001, respectivamente) (figura 6). No se encontró una asociación significativa entre el peso al nacer con el resto de las variables estudiadas cuando los grupos NT y PE fueron analizados conjuntamente. El análisis de regresión múltiple paso a paso mostró que de todas las variables que se asociaron con el peso al nacer, las concentraciones de IGF-I del cordón umbilical fue la variable que mejor predijo el peso al nacer ($r^2 = 0.53$; P < 0.0001), en segundo lugar la combinación del IGF-I del cordón umbilical con la edad gestacional ($r^2 = 0.70$; P < 0.0001), y en tercer lugar la combinación del IGF-I del cordón umbilical, la edad gestacional y la presión arterial diastólica ($r^2 = 0.76$; P < 0.0001), mientras que la asociación entre el peso al nacer y las concentraciones de IGF-I maternas fue excluida del modelo de regresión.

Al analizar los grupos por separado, en el grupo PE por separado, el peso al nacer correlacionó con las concentraciones maternas (Rho = 0.76; P = 0.004) y del cordón umbilical (Rho = 0.75; P = 0.005) de IGF-I, con las concentraciones del cordón umbilical de leptina (Rho = 0.61; P = 0.02) y con las concentraciones placentarias de Zn (Rho = 0.56; P = 0.04). En este grupo las concentraciones del resto de las variables bioquímicas estudiadas no se asociaron significativamente con el peso al nacer. El análisis de regresión múltiple paso a paso mostró que la variable que más se asoció con el peso al nacer fue la concentración de IGF-I del cordón umbilical ($r^2 = 0.67$; P = 0.0002), en

segundo lugar la combinación de las concentraciones de IGF-I del cordón umbilical con la edad gestacional ($r^2 = 0.79$; $P < 0.0001$), mientras que las concentraciones maternas de IGF-I, las concentraciones de leptina del cordón umbilical y las concentraciones placentarias de zinc fueron excluidas del modelo de regresión.

En el grupo NT, no se encontró asociación entre el peso al nacer con ninguna de las variables bioquímicas estudiadas.

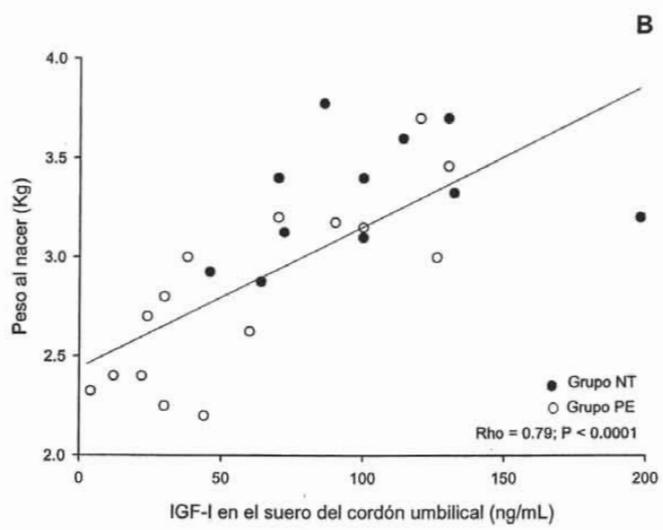
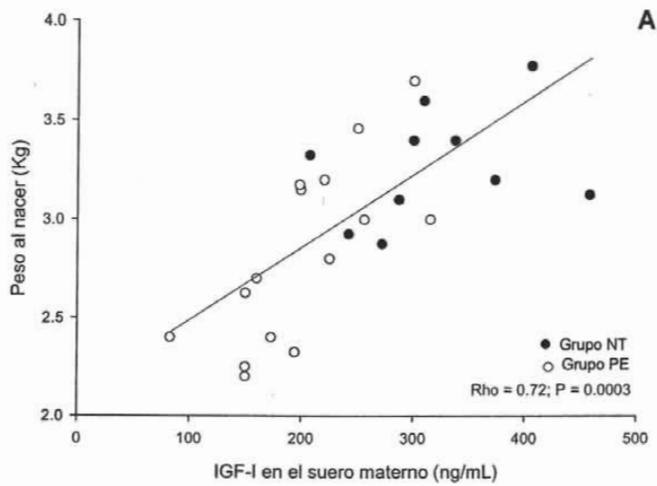


Figura 6. Relación del peso al nacer con las concentraciones de IGF-I en el suero materno (A) y del cordón umbilical (B) en los grupos NT y PE.

7.1.9. Relación entre las variables bioquímicas estudiadas en los grupos NT y PE

Se observó una asociación positiva y significativa ($Rho = 0.65$; $P = 0.02$) entre las concentraciones placentaria de zinc y las concentraciones de IGF-I del cordón umbilical solo en el grupo PE. Las concentraciones de zinc en el tejido placentario también se asociaron positiva y significativamente ($Rho = 0.64$; $P = 0.04$) con las concentraciones de leptina del suero materno, pero solamente en el grupo NT.

No se encontró asociación estadísticamente significativa entre las concentraciones de insulina, lactógeno placentario, progesterona, estradiol, testosterona y cortisol con el peso al nacer, ni con las concentraciones circulantes de IGF-I en ninguno de los dos grupos estudiados.

7.2. Estudio de la producción "in situ" de IGF-I y de la expresión génica de IGF-I, IGFBP-1 e IGFBP3 en el tejido placentario

7.2.1. Estudio de la producción "in situ" de IGF-I en el tejido placentario

La figura 7 muestra ejemplo de un reporte computarizado del análisis de los porcentajes de células positivas y de áreas positivas.

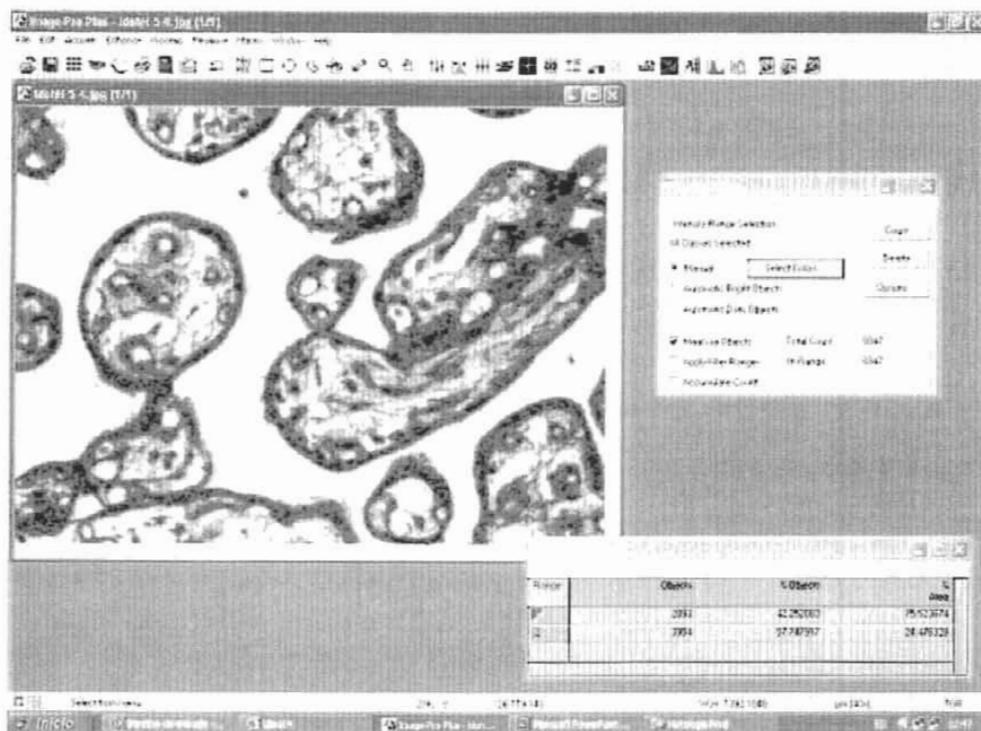


Figura 7. Reporte del análisis de la cuantificación del % de células positivas y del % de áreas positivas a la inmunotinción específica para IGF-I, utilizando el programa Image Pro Plus (Medía Cybernetics, Japón). De color rojo están señaladas las células positivas y de color amarillo las células negativas a la inmunotinción específica para IGF-I.

En la figura 8 se muestra imágenes a diferentes aumentos de cortes de una placenta normotensa y de una preecláptica teñidas con Hematoxilina-Eosina. Como se puede apreciar, no se observan cambios importantes en las características morfológicas de los cortes provenientes de la mujer preecláptica al compararla con los de la mujer normotensa a ningún aumento. El tamaño, la forma y la distribución de las vellosidades coriónicas son similares en los dos grupos; esto se puede apreciar con más resolución en la figura 9, donde se muestran cortes de placentas provenientes de 4 mujeres normotensas y 4 preeclápticas.

El diámetro de las vellosidades coriónicas (figura 10A) fue de $145.4 \pm 15.6 \mu\text{m}$ en el grupo NT y de $151.8 \pm 26.2 \mu\text{m}$ en el grupo PE sin diferencias significativas entre grupos ($P = 0.43$). El número de células totales (figura 10B), determinado por el conteo total de los núcleos, fue de 8966.2 ± 2540.2 células en el grupo NT y de 9255.2 ± 2761.4 células en el grupo PE, sin diferencias significativas entre grupos ($P = 0.93$).

La figura 11 muestra imágenes aumentadas 40X de cortes de placentas de cuatro mujeres normotensas y cuatro mujeres preeclápticas con tinción negativa para IGF-I. Las imágenes con tinción positiva para IGF-I de los cortes de estas placentas se observan en la figura 12; donde se aprecia el marcaje específico de color café-rojizo alrededor de las vellosidades coriónicas, sitio que ocupa el sinciotrofoblasto que son las células productoras de IGF-I.

El porcentaje de células positivas a la inmunotinción específica para IGF-I (figura 13A) fue de $49.0 \pm 5.5 \%$ en el grupo NT y de $49.5 \pm 5.0 \%$ en el grupo PE, sin diferencias significativas entre grupos ($P = 0.82$); tampoco hubo diferencias significativas en el porcentaje de área positiva a la inmunotinción específica para IGF-I

(figura 13B), la cual fue de 56.4 ± 7.8 % en el grupo NT y de 59.4 ± 10.6 % en el grupo PE ($P = 0.48$).

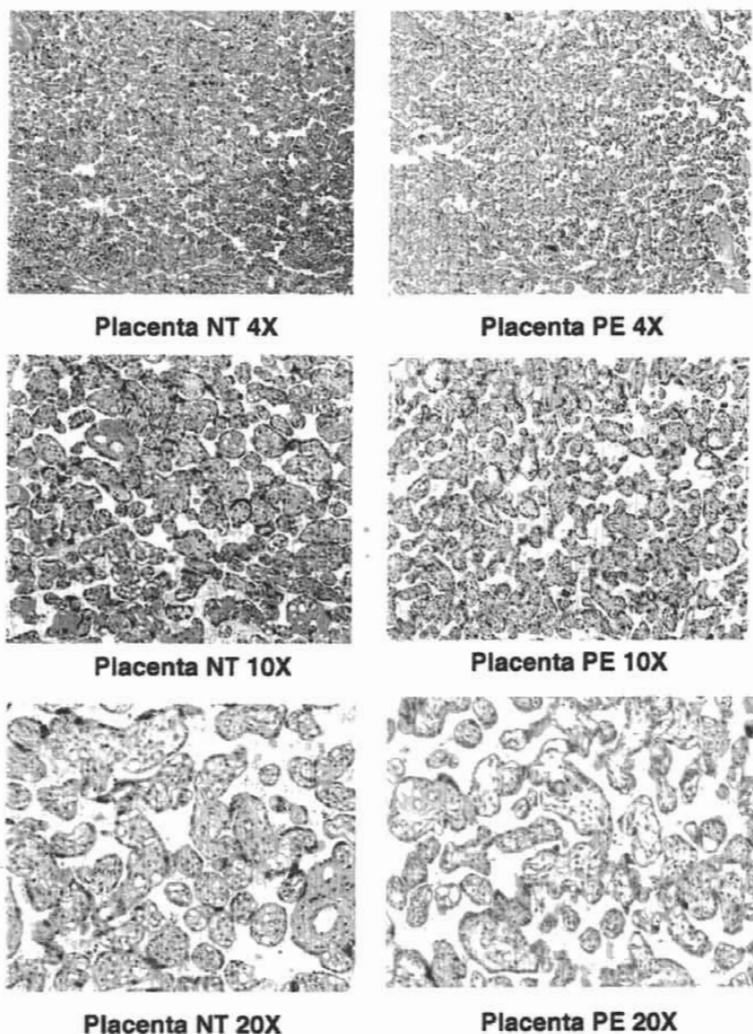


Figura 8. Cortes representativos de placentas provenientes de una mujer normotensa (NT) y de una preecláptica (PE) a diferentes aumentos. Los cortes están teñidos con Hematoxilina-Eosina. Se observan las vellosidades coriónicas y los espacios intervillosos.

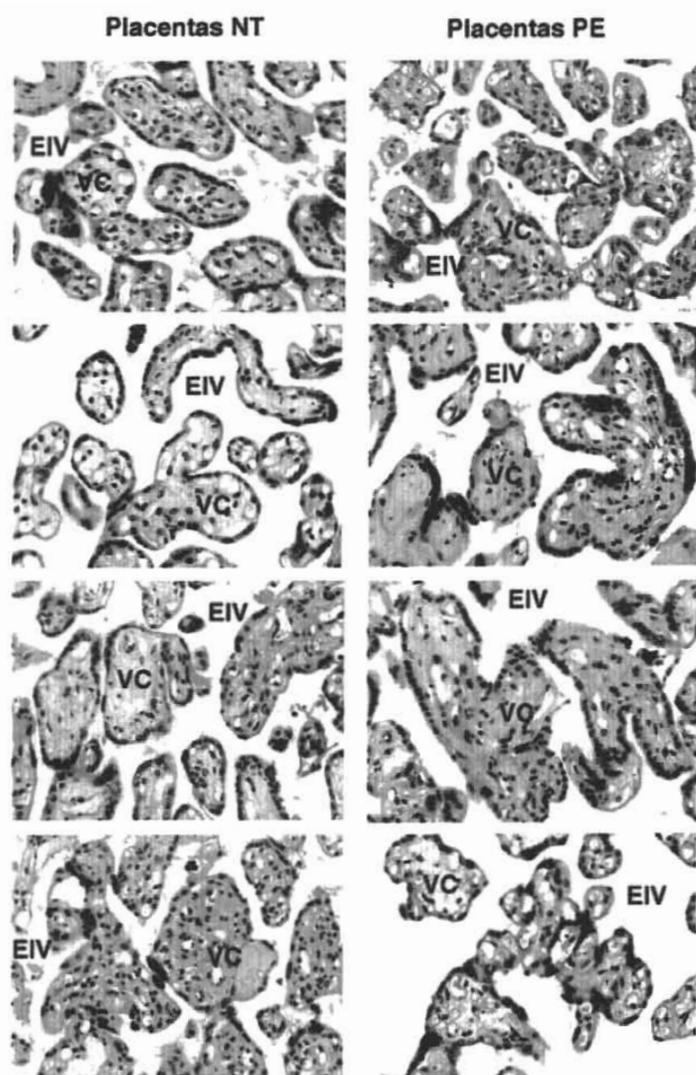


Figura 9. Cortes de placentas teñidos con Hematoxilina-Eosina, aumentados 40X, provenientes de cuatro mujeres normotensas (panel de la izquierda) y de cuatro mujeres preeclámpticas (panel de la derecha). Se observan las vellosidades coriónicas (VC) y los espacios intervillosos (EIV).

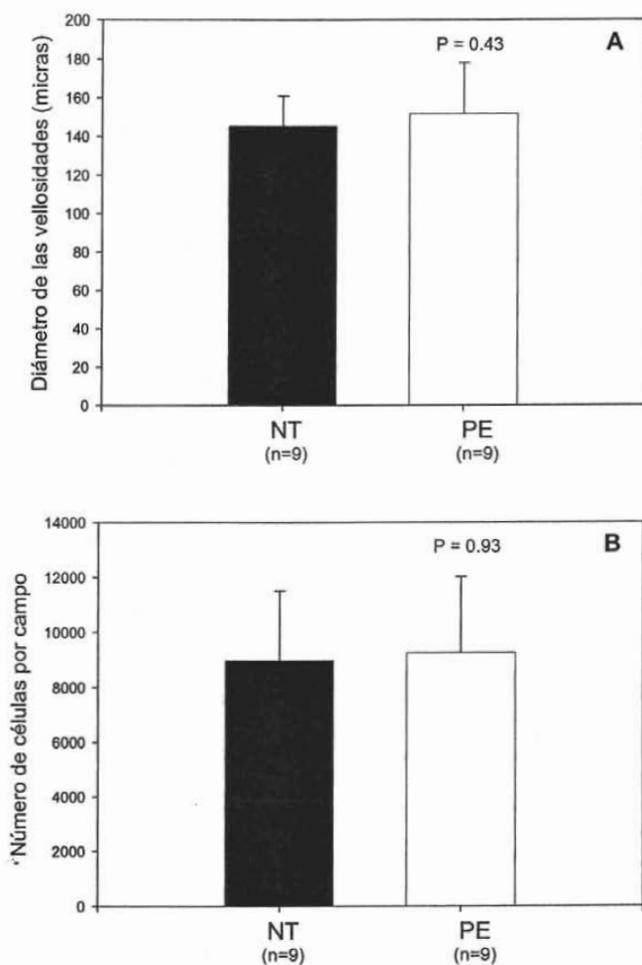


Figura 10. Diámetro de las vellosidades coriónicas de las placentas provenientes de mujeres normotensas (NT) y preeclámpticas (PE) (A). Número de células totales por campos, en imágenes aumentadas 10X de placentas NT y PE (B).

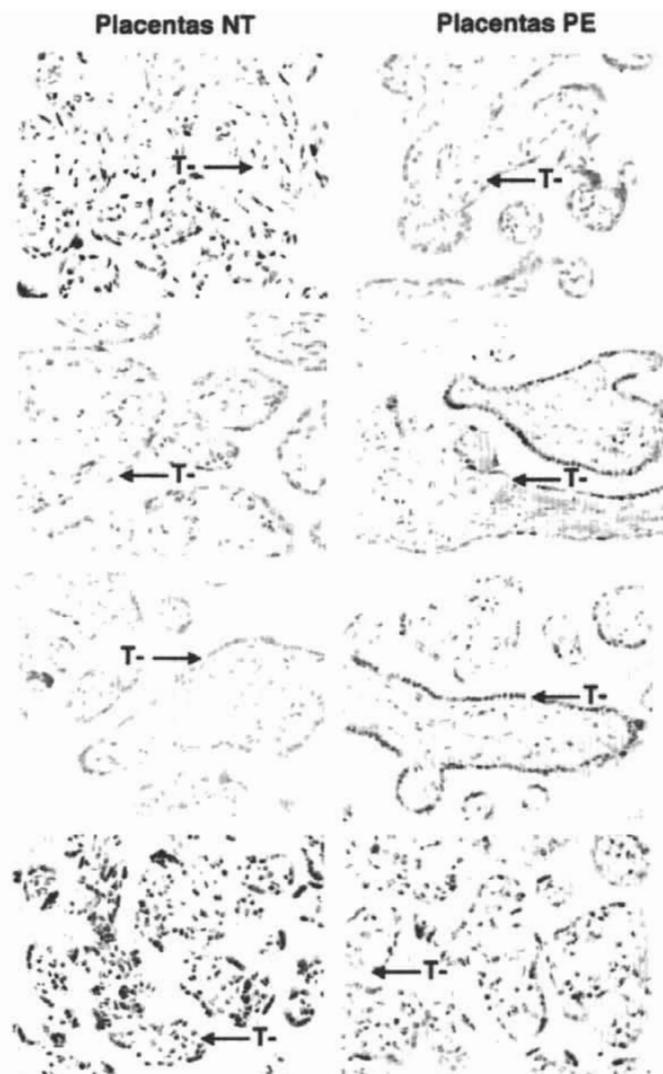


Figura 11. Cortes de placentas con tinción negativa (T-), aumentados 40X, provenientes de cuatro mujeres normotensas (panel de la izquierda) y de cuatro mujeres preeclámpticas (panel de la derecha).

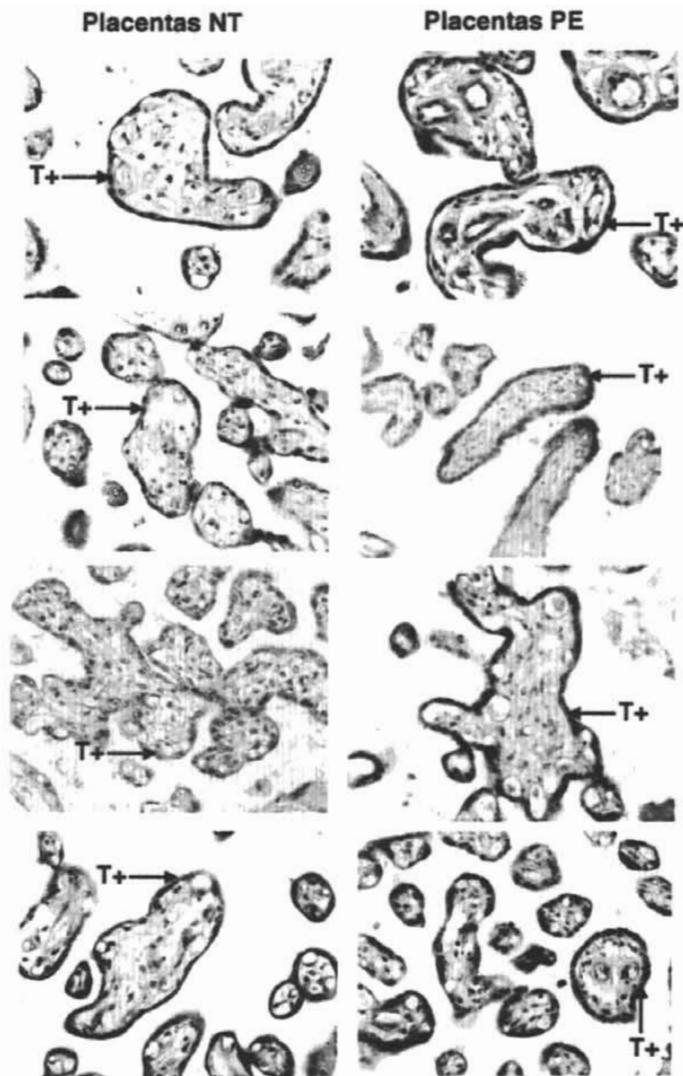


Figura 12. Cortes de placentas con tinción positiva (T+) para IGF-I, aumentados 40X, provenientes de cuatro mujeres normotensas (panel de la izquierda) y de cuatro mujeres preeclámpticas (panel de la derecha). Se observa el marcaje continuo de color café-rojizo alrededor de las vellosidades coriónicas, región que comprende al sinciotrofoblasto, células productoras de IGF-I.

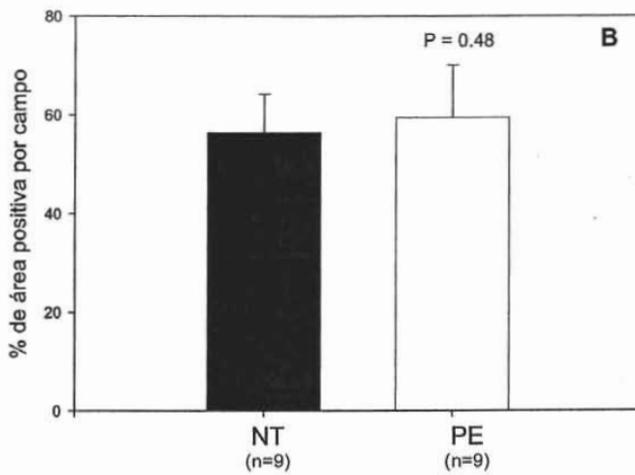
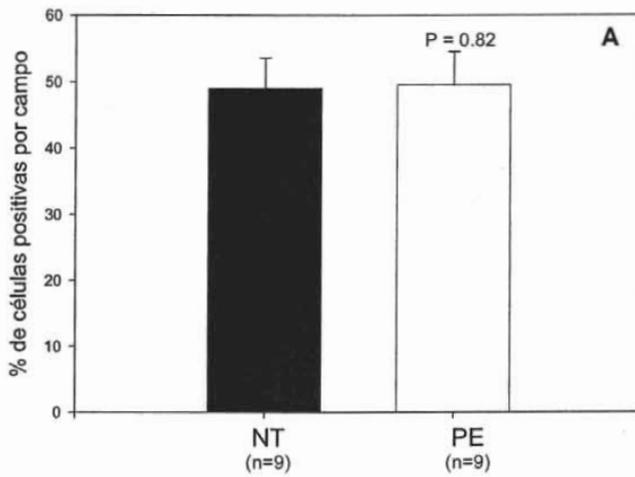


Figura 13. Porcentaje de células positivas de las placentas provenientes de mujeres normotensas (NT) y preeclámpticas (PE) (A). Porcentaje de áreas positivas a la inmunotinción específica para IGF-I de las placentas NT y PE (B). Análisis realizado en cortes aumentados 40X.

7.2.2. Estudio de la expresión génica de IGF-I, IGFBP-1 e IGFBP3 en el tejido placentario

El estudio de la expresión génica de IGF-I, IGFBP-1 e IGFBP-3 en el tejido placentario se realizó a través de la técnica de Northern Blot. La expresión génica de IGF-I se realizó además a través de la técnica de RT-PCR y Southern Blot.

7.2.2.1. Preparación de las sondas específica por RT-PCR

En la figura 14 se muestran los tamaños de los productos de PCR empleados como sondas. El tamaño de las sondas fue de: 229 pb para IGF-I, 209 pb para IGFBP-1 y de 747 pb para IGFBP-3; lo cual correspondió a lo esperado según el diseño de secuencias iniciadoras empleadas.

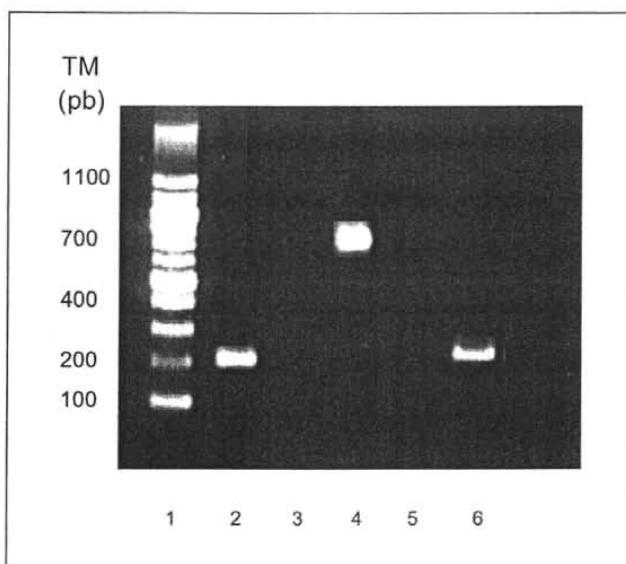


Figura 14. Ácidos desoxirribonucleicos complementarios (ADNc), preparados por RT-PCR utilizados para la determinación del nivel de expresión de los ácidos ribonucleicos mensajeros (ARNm) del IGF-I, la IGFBP-1 e IGFBP-3. Línea 1: patrón de talla molecular (TM), escalera de 100 pb. Línea 2: ADNc de IGFBP-1, producto de 209 pb. Línea 4: ADNc de IGFBP-3, producto de 747 pb. Línea 6: ADNc de IGF-I, producto de 229 pb.

7.2.2.2. Northern Blot de IGF-I del tejido placentario

Los estudios de Northern Blot del IGF-I, mostraron la presencia de varios transcritos de entre 7 y 1.8 Kb de los cuales el de 7 Kb fue el más abundante en ambos grupos (figura 15). Dado la presencia de varios transcritos se realizó un estudio de RT-PCR y Southern Blot, que permitió evaluar la cantidad total de transcritos ya que la secuencia amplificada es común a todos los transcritos, pudiéndose realizar un análisis más preciso (figura 16).

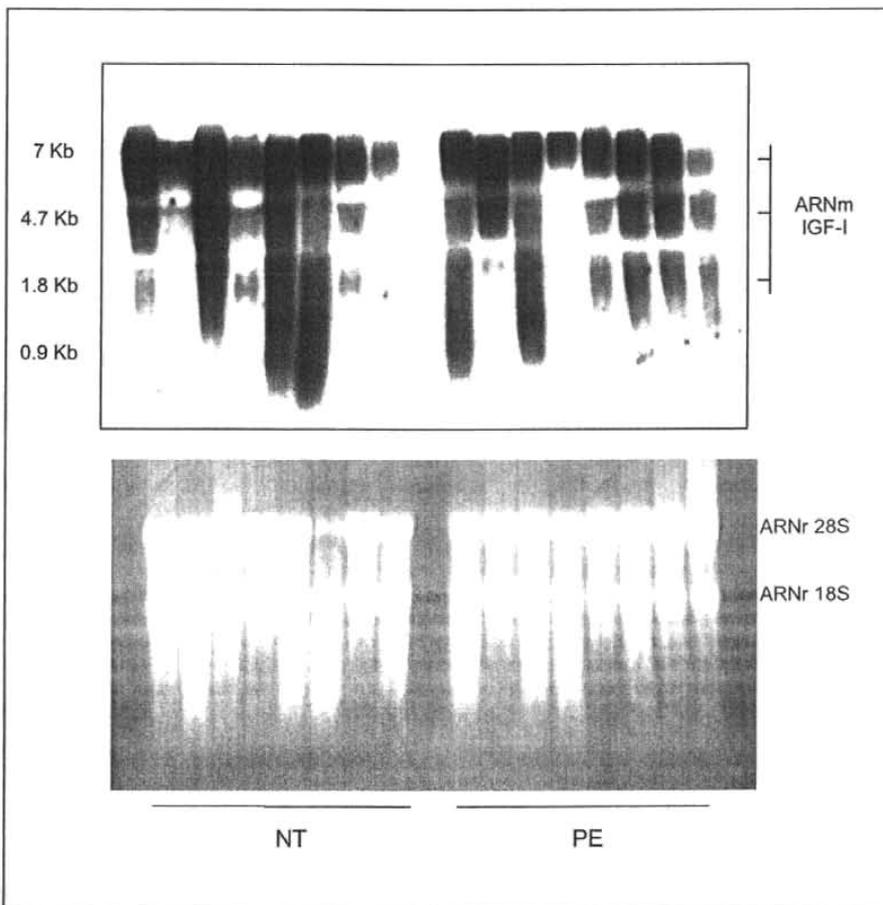


Figura 15. El panel de arriba muestra los resultados del estudio de Northern Blot de IGF-I de los grupos NT y PE. Se puede observar la presencia de varios transcritos de tallas moleculares diferentes de entre 7 y 1.8 Kb. El panel de abajo muestra la integridad de los ARN totales de los grupos NT y PE empleados en el estudio.

7.2.2.3. RT-PCR y Southern Blot de IGF-I en el tejido placentario

Los estudios de RT-PCR y Southern Blot del IGF-I, no mostraron diferencias significativas en el nivel de expresión placentaria de los ARNm del IGF-I entre los grupos NT y PE. En la figura 16, se puede observar los resultados del RT-PCR y Southern Blot, donde se obtuvo una señal de 229 pb que concuerda con la talla molecular esperada del producto de amplificación del ADNc de IGF-I al utilizar las secuencias iniciadoras anteriormente descritas en Métodos, las cuales son capaces de amplificar una secuencia de 229 pb que comprende las secuencias de la posición 92-321 del ADN de 672 pb complementario al ARNm. La secuencia amplificada comprende los últimos 58 pb de la región 5' no traducible (codificada por el exón 1 del gen), la región del péptido señal conformada por 96 pb (codificada por el exón 2 y una pequeña porción del exón 3 del gen) y una región de 75 pb que codifica para una porción del péptido maduro (codificada por el exón 3 del gen). La secuencia amplificada está presente en todos los transcritos que se producen del gen de IGF-I y por tanto garantiza la evaluación de todos los tipos de ARNm de IGF-I que se producen. Se puede observar además otra señal con una talla molecular de 453 pb correspondiente al producto de amplificación del ADNc de la ciclofilina humana, proteína constitutiva, la cual sirvió para normalizar el experimento y poder establecer la cantidad relativa de los ARNm del IGF-I en cada uno de los grupos de estudios.

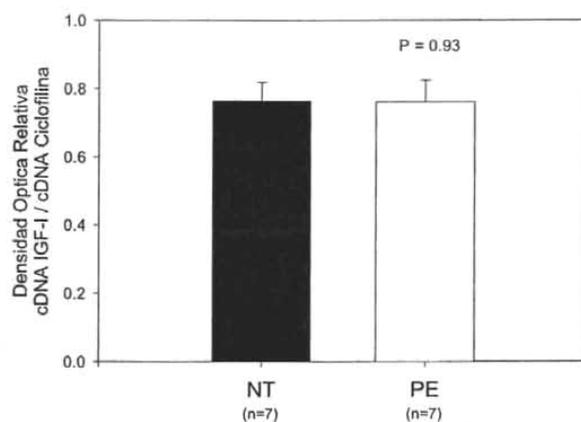
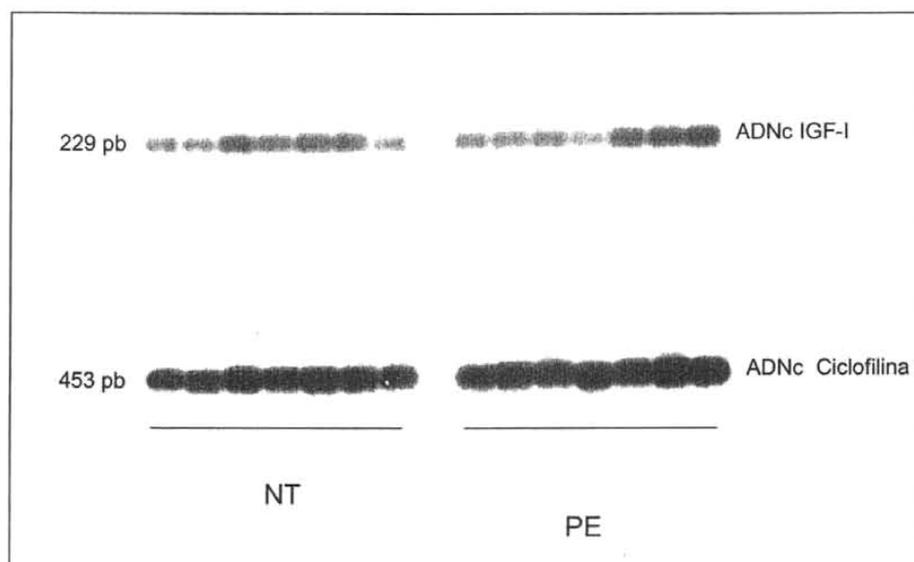


Figura 16. Southern Blot de IGF-I a partir de ADNc preparados por RT-PCR de los grupos NT y PE. La normalización del experimento se realizó por medio del ADNc de ciclofilina.

7.2.2.4. Northern Blot de IGFBP-1 en el tejido placentario

Los resultados del Northern Blot de IGFBP-1 se pueden observar en la figura 17. Se encontró una señal de aproximadamente 1.6 kb, talla que concuerda con lo reportado para el ARNm de la IGFBP-1 en la placenta humana (43). Se puede observar que no existen diferencias significativas en la expresión placentaria del ARNm de la IGFBP-1 entre los grupos NT y PE al ser normalizada la señal contra los ácidos ribonucleicos ribosomales (ARNr) de 28S.

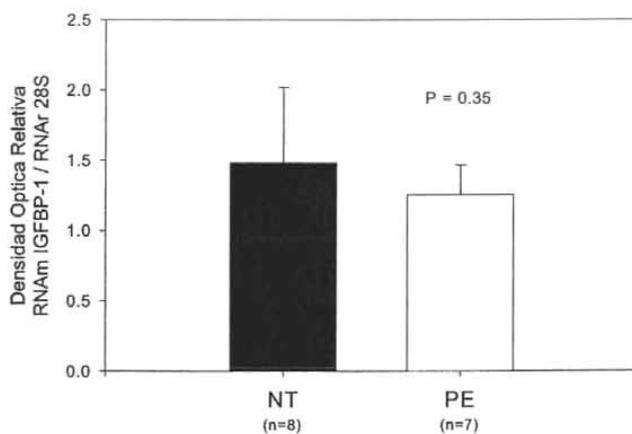
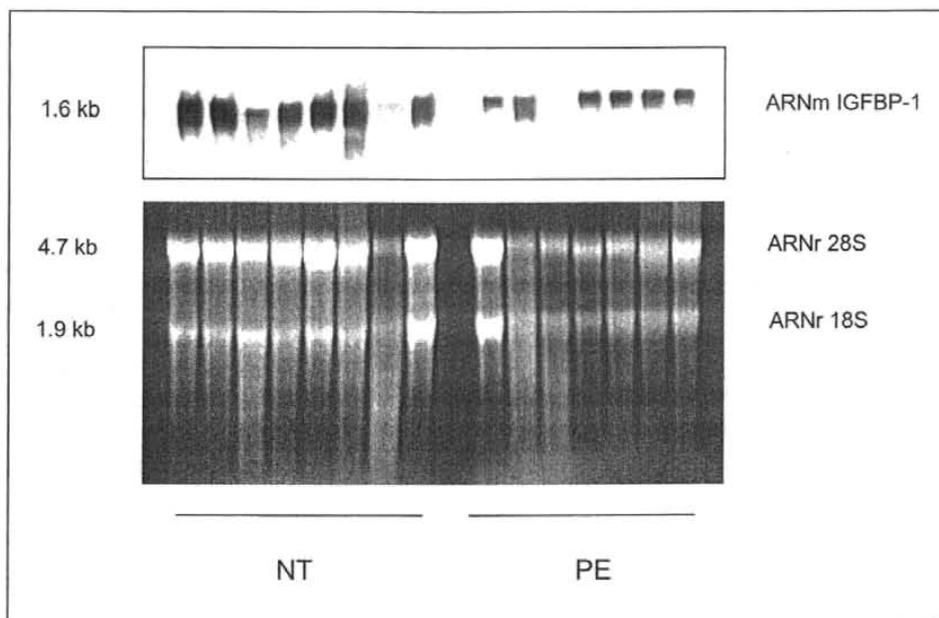


Figura 17. Northern Blot de IGFBP-1 de los grupos NT y PE. La normalización del experimento se realizó por medio del ARNr de 28S.

7.2.2.5. Northern Blot de IGFBP-3 en el tejido placentario

Los resultados del Northern Blot de IGFBP-3 se pueden observar en la figura 18. Se encontró una señal de aproximadamente 2.3 kb, talla que concuerda con lo reportado para el ARNm de la IGFBP-3 en la placenta humana (43). Se puede observar que tampoco existen diferencias significativas en la expresión placentaria del ARNm de la IGFBP-3 entre los grupos NT y PE al ser normalizada la señal contra los ARNr de 28S.

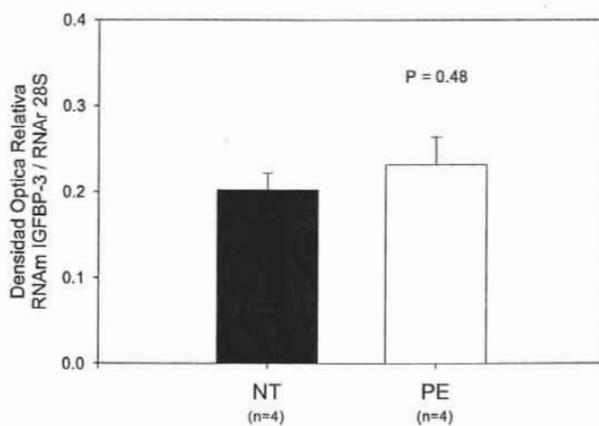
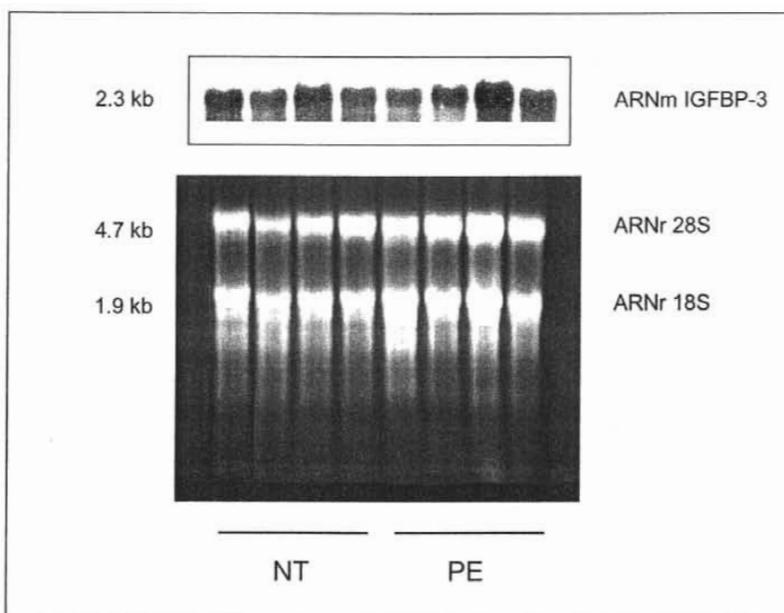


Figura 18. Northern Blot de IGFBP-3 de los grupos NT y PE. La normalización del experimento se realizó por medio del ARNr de 28S.

7.3. Relación del peso al nacer con la afinidad y/o número de receptores placentarios de IGF-I e insulina durante el embarazo normal y la preeclampsia

7.3.1. Datos clínicos de los grupos NT y PE

La tabla 8 muestra las características clínicas de los grupos NT y PE utilizados para el estudio de los receptores placentarios de IGF-I e insulina. La edad biológica, la edad gestacional y el número de partos, no fueron estadísticamente diferentes entre los grupos NT y PE. Todos los productos de las mujeres embarazadas normotensas fueron de peso adecuado para su edad gestacional (PAEG) según los criterios de Lubchenco y col. (160, 161) y Capurro y col. (162) mientras que 4 de los 9 recién nacidos del grupo de mujeres preeclámpticas tuvieron peso bajo para la edad gestacional (PBEG), además, el peso promedio de los recién nacidos del grupo PE fue significativamente ($P < 0.001$) menor que el del grupo NT.

Tabla 8. Características Clínicas de los Grupos NT y PE

	Grupo NT (n=10)	Grupo PE (n=9)	P
Edad biológica (años)	24.0 ± 5.3	23.4 ± 5.2	0.82
Edad gestacional (semanas)	39.2 ± 0.9	39.0 ± 0.8	0.66
Presión arterial sistólica (mm Hg)	115 ± 5	154 ± 17	< 0.001
Presión arterial diastólica (mm Hg)	72 ± 4	98 ± 8	< 0.001
Proteinuria (Nº de + en la tira reactiva)	Trazas	3.1 ± 0.6	-----
Nº de partos	2.2 ± 1.0	2.1 ± 1.5	0.65
Pesos de los recién nacidos (Kg)	2.97 ± 0.14	2.46 ± 0.33	< 0.001
Peso de las placentas (g)	529 ± 25	390 ± 60	< 0.001
Prop. rec.nac. bajo peso para edad gest.	0/10	4/9	-----

Proteinuria: Trazas ≤ 10 mg/dL, 1+ = 30 mg/dL, 2+ = 100 mg/dL, 3+ ≥ 300 mg/dL. Las diferencias estadísticamente significativas fueron consideradas a P < 0.05.

7.3.2. Relación del peso al nacer con el peso de las placentas

El peso de los recién nacidos correlacionó positiva y significativamente con el peso de las placentas (Rho = 0.94; P < 0.0001) cuando se analizaron los grupos NT y PE juntos (figura 19). Cuando se analizaron los grupos por separados, el peso de los recién nacidos se asoció positiva y significativamente con el peso de las placentas (Rho = 0.83; P = 0.003) en el grupo NT y (Rho = 0.90; P = 0.001) en el grupo PE.

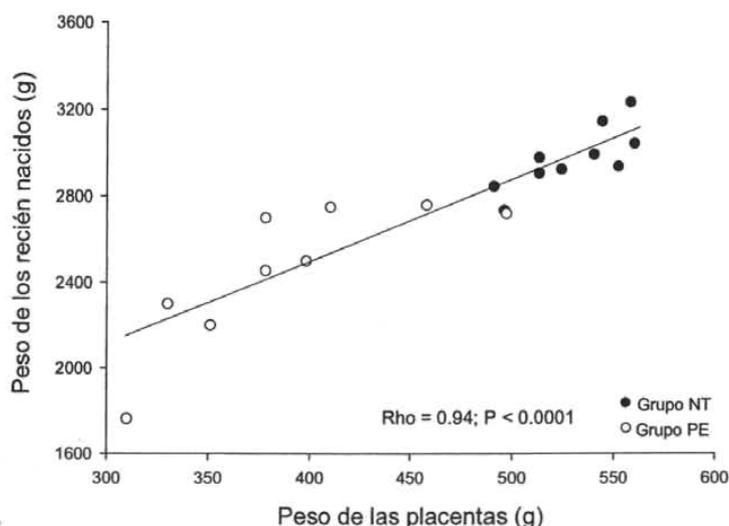


Figura 19. Relación del peso al nacer con el peso de las placentas en los grupos NT y PE.

7.3.3. Aislamiento de las membranas citoplasmáticas del tejido placentario

Para el análisis de los receptores de IGF-I e insulina, se realizó el aislamiento de las membranas citoplasmáticas del tejido placentario, sitio donde se encuentran los receptores de superficie, según el procedimiento descrito en Métodos.

Finalmente, de cada placenta se obtuvieron preparaciones de membranas de 3,1 mL con una concentración de proteína de 1.59 ± 0.29 mg/mL en el grupo NT y de 1.64 ± 0.42 mg/mL en el grupo PE, sin diferencias significativas ($P = 0.76$). Se utilizaron 60 μ L de la preparación de membranas por tubo, por lo que la cantidad promedio de proteínas totales añadida por tubo fue de 96 μ g.

7.3.4. Análisis del ensayo de radiorreceptores de IGF-I en el tejido placentario

La figura 20 muestra los resultados del estudio de radiorreceptores de IGF-I en el tejido placentario. Como se observa en la figura 20A, el IGF-I no marcado desplazó al IGF-I marcado de manera dosis dependiente. En la figura 20B se puede observar que el receptor de IGF-I es saturado a la mitad a concentraciones cercanas a 0.17×10^{-9} M (0.17 nM) de IGF-I. La figura 21 muestra el análisis de Scatchard al graficar los promedios de los datos de las 10 mujeres normotensas y de las 9 mujeres preeclámpticas. Se puede observar en esta figura que ambas rectas son paralelas, poseen pendientes similares, lo que sugiere que la constante de afinidad es similar en ambos grupos. Los resultados cuantitativos se muestran más adelante en la tabla 9.

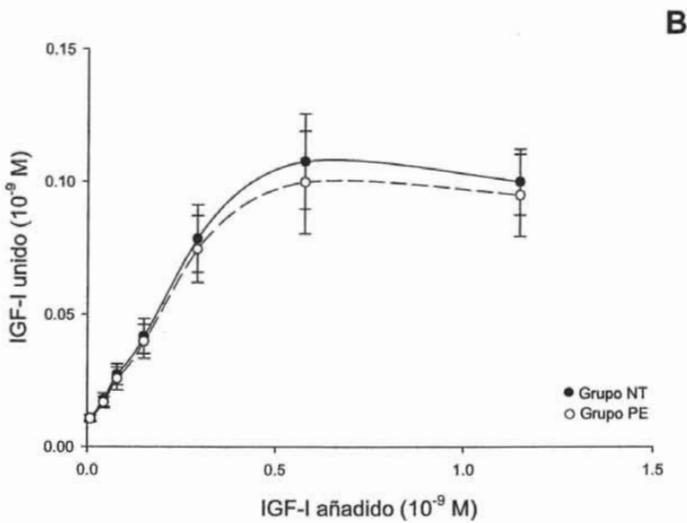
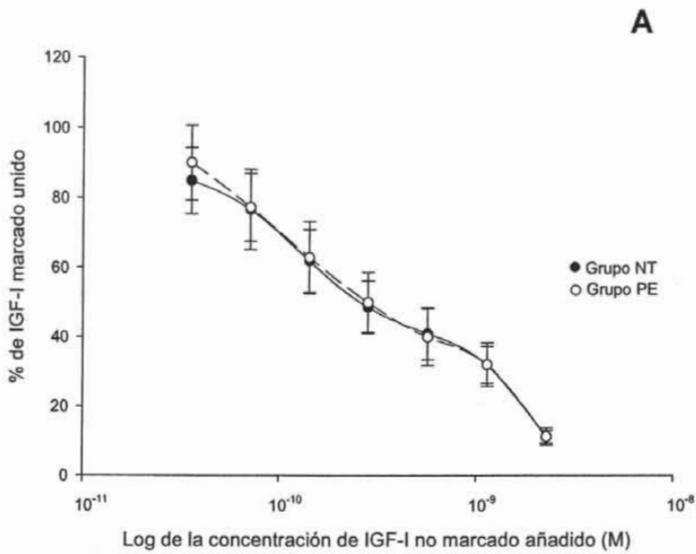


Figura 20. Desplazamiento de la unión del IGF-I marcado a su receptor específico por una curva de concentraciones crecientes de IGF-I sin marcar (A). Curva de saturación de la unión del IGF-I a su receptor placentario (B).

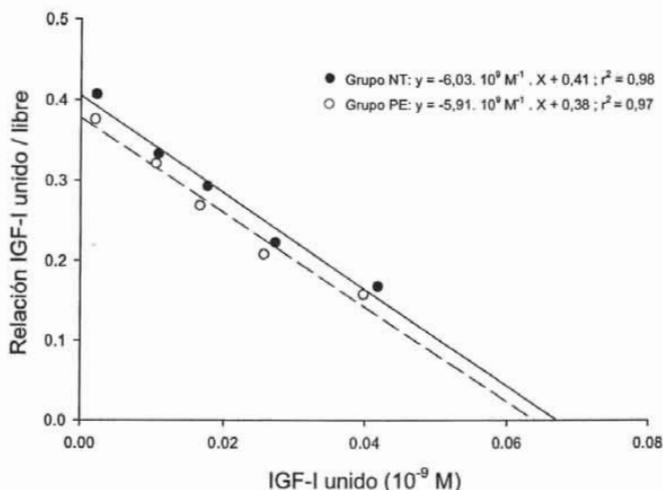


Figura 21. Análisis de Scatchard de la unión del IGF-I a su receptor placentario.

7.3.5. Análisis del ensayo de radiorreceptores de insulina en el tejido placentario

La figura 22 muestra los resultados del estudio de radiorreceptores de insulina en el tejido placentario. Como se observa en la figura 22A, la insulina no marcada desplazó a la marcada de manera dosis dependiente. En la figura 22B se puede observar que el receptor de insulina comienza a saturarse a una concentración de 7.956×10^{-9} M (7.96 nM) de insulina. La figura 23 muestra el análisis de Scatchard al graficar los promedios de los datos de las 10 mujeres normotensas y de las 9 mujeres preeclámpticas. Se puede observar en esta figura que las rectas de regresión características de cada grupo estudiado se cruzan, lo que significa que sus pendientes son diferentes y por tanto, que ambos grupos de mujeres poseen constantes de afinidad diferentes. Los resultados cuantitativos se muestran más adelante en la tabla 9.

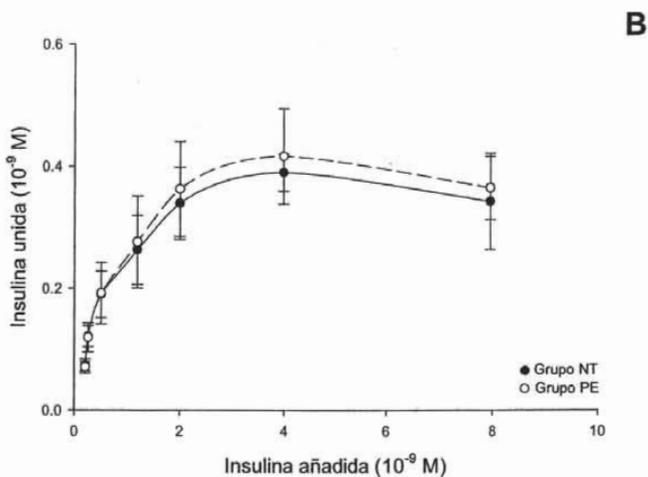
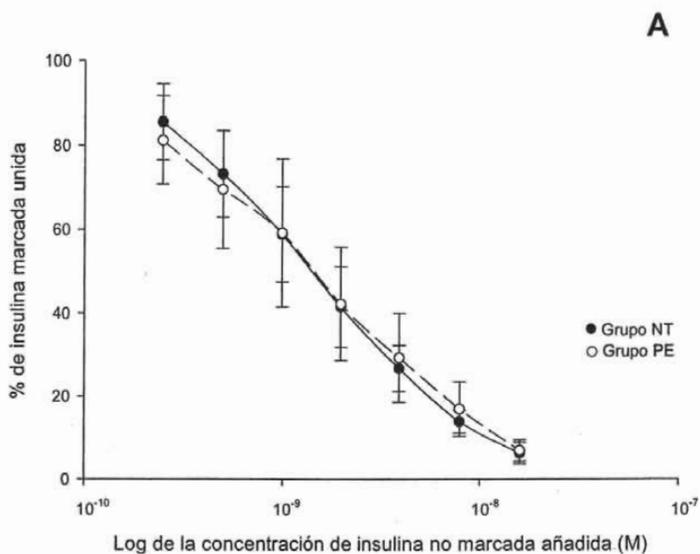


Figura 22. Desplazamiento de la unión de la insulina marcado a su receptor específico por una curva de concentraciones crecientes de insulina sin marcar (A). Curva de saturación de la unión de la insulina a su receptor placentario (B).

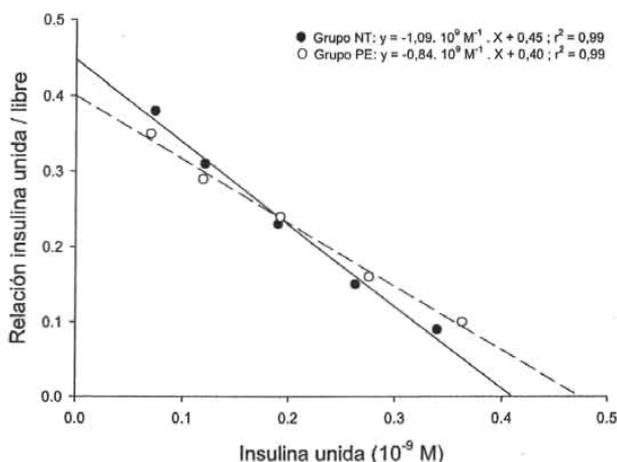


Figura 23. Análisis de Scatchard de la unión de la insulina a su receptor placentario.

7.3.7. Características de los receptores de IGF-I e insulina del tejido placentario de los grupos NT y PE

Luego de realizados los ensayos de radiorreceptores tanto para IGF-I como para insulina de los grupos NT y PE. Se realizaron los análisis de Scatchard de cada una de las muestras de las 10 mujeres normotensas y de las 9 mujeres preeclámpticas y se determinaron sus pendientes y sus interceptos en el eje de las abscisas (x). Las pendientes permitieron estimar las constantes de afinidad de cada uno de los receptores en cada una de las preparaciones y los interceptos las concentraciones de los receptores luego de ser corregidas por la concentración de proteínas de cada una de las preparaciones de membranas utilizadas. La constante de disociación (Kd) fue estimada como el recíproco de la constante de afinidad. Los resultados se muestran

en la tabla 9, donde podemos observar que no hubo diferencias estadísticamente significativas en la afinidad, ni en la concentración de receptores de IGF-I en el tejido placentario, expresado como fmoles de receptores por mg de proteínas, entre los grupos NT y PE. Por otro lado, se encontró que los receptores de insulina del tejido placentario del grupo PE poseen menor afinidad que los del grupo NT, sin cambios significativos en la concentración de los mismos (tabla 9).

Tabla 9. Características de los receptores de IGF-I e insulina en el tejido placentario de los grupos NT y PE

	Grupo NT (n=10)	Grupo PE (n=9)	P
Constante de afinidad, K_a ($10^9 M^{-1}$)	6.07 ± 0.73	6.03 ± 1.04	0.55
Constante de disociación, K_d ($10^{-10} M$)	1.67 ± 0.21	1.69 ± 0.25	0.55
IGF-I-R (fmoles/mg de proteínas)	215 ± 32	197 ± 32	0.40
Constante de afinidad, K_a ($10^9 M^{-1}$)	1.26 ± 0.20	0.97 ± 0.24	0.02*
Constante de disociación, K_d ($10^{-10} M$)	8.10 ± 1.28	10.84 ± 2.44	0.02*
INS-R (fmoles/mg de proteínas)	1181 ± 210	1220 ± 369	0.50

Las diferencias estadísticamente significativas fueron consideradas a $P < 0.05$.

7.3.8. Relación del peso al nacer y del peso de las placentas con la afinidad y la concentración de los receptores de IGF-I del tejido placentario de los grupos NT y PE

El peso al nacer y el peso de las placentas no correlacionaron con la constante de afinidad del receptor de IGF-I, y por tanto tampoco con la constante de disociación, ni en el grupo NT, ni en el grupo PE, ni en los dos grupos juntos.

No obstante a que no se encontró diferencias significativas entre grupos, la concentración de los receptores de IGF-I en el tejido placentario (expresado en fmoles/mg de proteínas, correlacionó positiva y significativamente ($Rho = 0.48$; $P = 0.04$) con el peso de los recién nacidos (figura 24A) y una tendencia a la correlación con el peso de las placentas ($Rho = 0.43$; $P = 0.06$) (figura 24B) en el grupo total.

Cuando los grupos fueron analizados por separados, la concentración de receptores placentarios de IGF-I (expresados como fmoles/mg de proteínas) correlacionó positiva y significativamente con el peso al nacer en el grupo NT ($Rho = 0.65$; $P = 0.04$), no así en el grupo PE. La concentración de los receptores placentarios de IGF-I no se asoció con el peso de las placentas en los grupos NT y PE por separados.

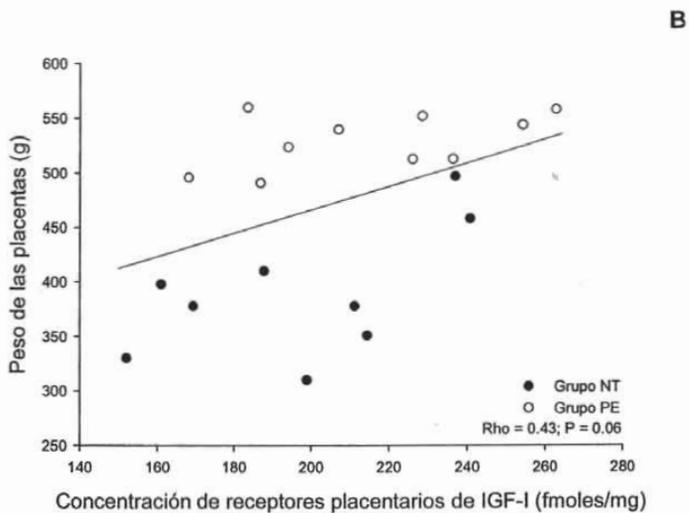
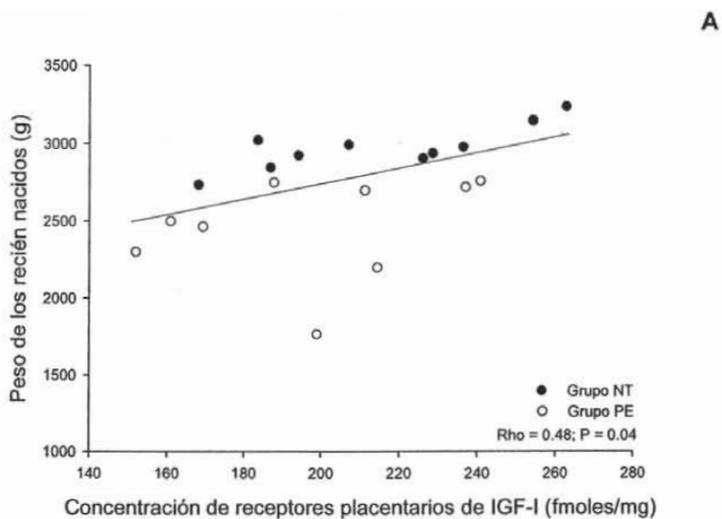


Figura 24. Relación del peso de los recién nacidos (A) y del peso de las placentas (B) con la concentración de receptores placentarios de IGF-I (fmoles/mg).

7.3.9. Relación del peso al nacer y del peso de las placentas con la afinidad y la concentración de los receptores de insulina del tejido placentario de los grupos NT y PE

El peso de los recién nacidos y el peso de las placentas correlacionaron negativa y significativamente con la constante de disociación del receptor de insulina en el grupo total ($Rho = -0.45$; $P = 0.05$ y $Rho = -0.49$; $P = 0.03$, respectivamente) (figura 25). El peso de los recién nacidos y el peso de las placentas no correlacionaron con la concentración (fmoles/mg de proteínas) de los receptores de insulina del tejido placentario.

Cuando los grupos fueron analizados por separados, ni el peso al nacer, ni el peso de las placentas, correlacionaron con la concentración, ni con la constante de disociación del receptor placentario de insulina en ninguno de los grupos estudiados.

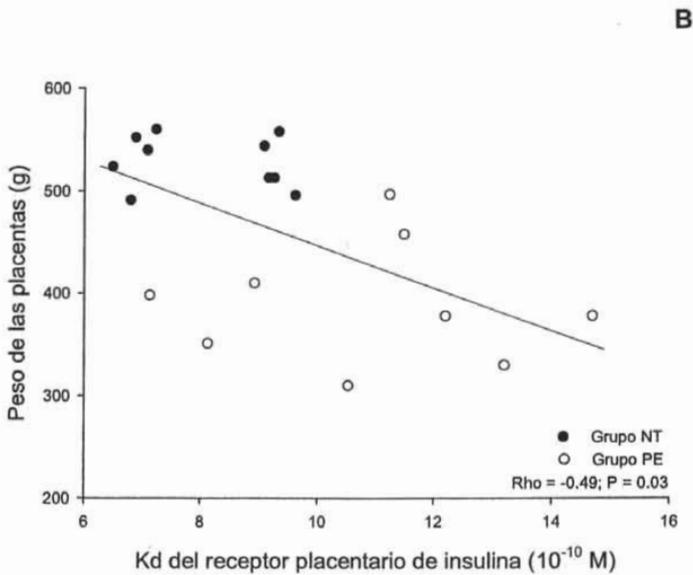
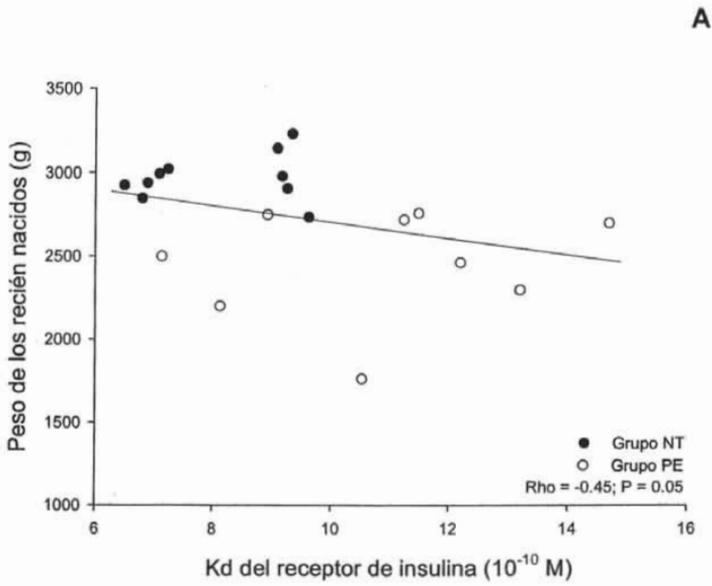


Figura 25. Relación del peso de los recién nacidos (A) y del peso de las placentas (B) con la constante de disociación del receptor placentario de insulina.

8. Discusión

8. DISCUSIÓN

Una de las alteraciones asociadas a la preeclampsia es la alta incidencia del bajo peso al nacer. Por tal motivo, el presente estudio tuvo como objetivo principal evaluar la relación entre indicadores del crecimiento fetal y el bajo peso al nacer observado en la preeclampsia.

Los resultados del presente estudio indican que la preeclampsia moderada está asociada con el bajo peso al nacer, bajas concentraciones de IGF-I, IGFBP-3 y altas concentraciones de IGFBP-1 sin cambios significativos en las concentraciones circulantes de insulina, lactogeno placentario, leptina, estradiol, progesterona, testosterona, cortisol y zinc. Se encontró que de todas las variables estudiadas, el IGF-I fue la variable que mejor predijo el peso al nacer. Las alteraciones en las concentraciones circulantes de IGF-I, IGFBP-1 e IGFBP-3 observadas en el grupo PE, no se asociaron con cambios en el nivel de expresión placentaria de estos factores de crecimiento. Asimismo, se encontró una disminución en la afinidad del receptor placentario de insulina en el grupo PE sin cambios en su densidad superficial. No se encontró cambios significativos en la afinidad y la densidad superficial del receptor placentario de IGF-I entre los grupos NT y PE.

En el presente estudio, el peso al nacer fue menor en el grupo PE comparado con el del grupo NT de edad gestacional similar. En el grupo PE, el 33% de los recién nacidos del grupo presentaron bajo peso al nacer para su edad gestacional, lo que confirma el retraso del crecimiento intrauterino observado en la preeclampsia (14, 19). La ausencia de asociaciones significativas entre la presión sistólica o diastólica con el peso

al nacer en el grupo PE sugiere que el retraso del crecimiento intrauterino no fue influenciado por la severidad de la preeclampsia. Sin embargo, un estado de déficit nutricional prolongado como resultado del desarrollo temprano de esta enfermedad, pudiera explicar el retraso del crecimiento intrauterino en el grupo PE.

Durante el embarazo normal, el retraso del crecimiento intrauterino ha sido atribuido a bajas concentraciones circulantes de IGF-I (83, 163-168). En el presente estudio, el peso al nacer correlacionó con las concentraciones maternas y fetales de IGF-I cuando los dos grupos fueron analizados juntos, indicando que este factor de crecimiento está involucrado en el crecimiento fetal. Nuestros resultados mostraron una marcada reducción de las concentraciones maternas y del cordón umbilical de IGF-I en el grupo PE, lo cual concuerda con lo reportado en estudios previos (18, 84, 85). Este hallazgo conjuntamente con la correlación encontrada entre el peso al nacer y las concentraciones circulantes de IGF-I, sugiere que el retraso del crecimiento intrauterino observado en grupo PE puede deberse, al menos en parte, a la disminución de las concentraciones circulantes de IGF-I; particularmente en la circulación fetal ya que se observó que las concentraciones de este factor de crecimiento en el cordón umbilical fueron las que más se asociaron con el peso al nacer.

A pesar de la asociación positiva y significativa entre las concentraciones de IGF-I maternas y del cordón umbilical, las concentraciones en la circulación fetal de este factor de crecimiento no pueden ser explicadas por las del compartimiento materno, ya que el IGF-I no es capaz de atravesar la barrera placentaria. Por lo que esta estrecha correlación observada, refleja que la alteración en la síntesis de IGF-I se produce de forma simultánea en ambos compartimientos. Sin embargo, no se descarta una alteración en la regulación placentaria, ya que la placenta es el principal sitio

extrahepático de producción de IGF-I durante el embarazo. De hecho, la preeclampsia se asocia con alteraciones placentarias (14, 19) y se sabe que este órgano juega un papel clave en la regulación de la síntesis materna y fetal de IGF-I. Este efecto regulador de la placenta lo ejerce a través de la producción de factores estimuladores de la síntesis de IGF-I, la regulación del metabolismo materno y del transporte de nutrientes hacia el feto.

Los análisis de correlación indican que el retraso del crecimiento intrauterino durante la preeclampsia puede ser esperado no solamente cuando las concentraciones fetales de IGF-I son bajas, sino también cuando las concentraciones de este factor de crecimiento son bajas en la circulación materna. Esto sugiere que la concentración IGF-I en la circulación materna pudiera considerarse como un marcador pronóstico de la aparición de retraso del crecimiento intrauterino, lo cual debe ser posteriormente investigado.

Es bien conocido que los efectos biológicos del IGF-I son modulados por sus IGFBPs (43). Bajo condiciones fisiológicas solamente el 1% del IGF-I circula libre y está en condición de ejercer su efecto biológico; el 75% circula unido a un complejo ternario formado por el IGF-I, la IGFBP-3 y una subunidad sensible a condiciones ácidas; el restante 24% lo hace unido al resto de las proteínas transportadoras fundamentalmente de la IGFBP-2 (43). Durante el embarazo, una actividad proteolítica endógena de la IGFBP-3, inducida por el propio embarazo es considerada como el mecanismo principal para el incremento de la biodisponibilidad del IGF-I en la circulación materna (43, 60-62). En el presente estudio, el análisis de WLB de las IGFBPs del suero materno no fue capaz de detectar a la IGFBP-3 en los grupos NT y PE. La completa desaparición de la IGFBP-3 de la circulación materna en ambos grupo pudiera resultar en el incremento de

la biodisponibilidad del IGF-I, incrementando las funciones anabólicas durante el embarazo. El incremento de la IGFBP-1 observado en el suero materno del grupo PE pudiera deberse al incremento de la síntesis decidual de esta proteína transportadora (85). Algunos autores han sugerido que el incremento de la IGFBP-1 en la circulación contribuye a una restricción del crecimiento placentario y por tanto del crecimiento fetal (85, 169). El perfil de las IGFBPs observado en el suero del cordón umbilical mostró bajas cantidades de IGFBP-3 y altas de IGFBP-1 en el grupo PE. Ya que la proteólisis de la IGFBP-3 no ocurre en el suero fetal (83) y que la síntesis de IGFBP-3 es dependiente de IGF-I y del estado nutricional (43), la disminución de IGFBP-3 en la circulación fetal del grupo PE puede ser explicada por una menor producción hepática como consecuencia de las bajas concentraciones de IGF-I y del menor suministro de nutrientes al feto debido a la reducción del flujo útero-placentario que caracteriza a esta enfermedad (19). Las concentraciones de IGF-I no pueden explicar las altas cantidades de IGFBP-1 observadas en el suero del cordón umbilical del grupo PE, ya que esta proteína transportadora no es dependiente de IGF-I (43). Sin embargo, las elevadas cantidades de IGFBP-1 pueden ser debidas a la hipoxia relativa (170) y a la disminución del suministro de nutrientes como resultado de la reducción del flujo útero-placentario observado en la preeclampsia (19). El incremento de la IGFBP-1 en el grupo PE pudiera resultar en el incremento del transporte de IGF-I desde la circulación hasta sus tejidos blanco ya que esta proteína transportadora es capaz de atravesar la barrera endotelial (43). Sin embargo, el incremento esperado en la biodisponibilidad del IGF-I parece ser insuficiente para corregir el bajo peso al nacer observado en la preeclampsia. En resumen, los resultados del presente estudio indican bajas concentraciones de IGF-I, bajas cantidades de IGFBP-3 y altas de IGFBP-1 en el suero del cordón umbilical similar

a lo encontrado en el suero del cordón umbilical de fetos con retraso del crecimiento intrauterino (83, 167, 168). Estas alteraciones pueden ser el resultado de la restricción de las funciones placentarias, lo cual puede verse reflejado en la afectación del transporte de nutrientes y por tanto del crecimiento fetal normal.

Otros factores potencialmente asociados con el IGF-I, sus IGFBPs y el crecimiento, que han sido reportados por algunos autores como alterados durante la preeclampsia severa, han sido evaluados en el presente estudio. Se sabe que las concentraciones circulantes de IGFBP-1 son reguladas normalmente por la insulina (171-173) y que en condiciones de bajas concentraciones de insulina o de resistencia a la insulina, las concentraciones de IGFBP-1 se encuentran elevadas y las de IGF-I disminuidas. Por otro lado se ha verificado un efecto facilitador de la insulina al paso extravascular de la IGFBP-1 (64). Algunos autores han reportado hiperinsulinismo y resistencia a la insulina asociada a la preeclampsia severa (97-99), lo que haría pensar que ésta pudiera ser la causa de la elevación de los niveles circulantes de la IGFBP-1 durante la preeclampsia. Al estudiar las concentraciones de insulina y glucosa en la circulación de ambos grupos, se observó que no había diferencias significativas en ninguna de estas dos variables entre los grupos NT y PE. Se observó un valor de índice de resistencia a la insulina elevado en la circulación materna de ambos grupos, sin diferencias significativas. Este hallazgo, confirma el estado de resistencia a la insulina característico de la etapa final del embarazo y sugiere que no es una condición que se vea agudizada durante la preeclampsia moderada. Por otro lado, la ausencia de correlación entre las concentraciones circulantes de insulina y las de IGF-I, es otro argumento por el cual no se le puede atribuir a la insulina como tal, la responsabilidad de los cambios en las concentraciones de IGF-I e IGFBP-1 encontradas en el grupo PE.

Existen reportes recientes (100) en los que realizando pruebas dinámicas como la prueba (Clamp) hiperinsulinémica-euglicémica, no encuentran asociación entre la resistencia a la insulina y la preeclampsia, lo cual apoya a nuestros resultados.

Varios estudios apoyan el efecto de la leptina sobre el crecimiento fetal (108, 174-179) y ha sido descrito un efecto regulador del zinc sobre las concentraciones de leptina (180). Durante la preeclampsia, algunos autores han reportado altas concentraciones de leptina en la circulación materna (114-117, 181), mientras que otros no han encontrado diferencias significativas (118). En el presente estudio las concentraciones de zinc en el tejido placentario correlacionaron con las concentraciones de leptina en la sangre materna solamente en el grupo NT, lo que sugiere una regulación que puede verse alterada durante la preeclampsia y que necesita ser aclarada en otros estudios.

Las concentraciones maternas y fetales de leptina no mostraron diferencias significativas entre los grupos NT y PE. Las concentraciones de leptina en el cordón umbilical no mostraron diferencias entre sexos, lo que concuerda con lo reportado por otros autores (61, 182). No obstante, el peso al nacer correlacionó significativamente con las concentraciones de leptina del cordón umbilical en el grupo PE; esta asociación se explica por el hecho conocido de que la leptina es producida fundamentalmente por el tejido adiposo y su concentración refleja el índice de masa corporal, lo que explica que los recién nacidos de peso bajo tengan menor concentraciones de leptina.

El lactógeno placentario, la hormona proteínica más abundantemente producida por la placenta, pasa a la circulación materna y fetal, donde desempeña papeles diversos. En la circulación materna ejerce un efecto anti-insulinico sobre el metabolismo materno, lo que induce a la acumulación de nutrimentos en la circulación materna, los cuales pueden ser transportados preferentemente hacia el feto a través de la placenta

(13). En la circulación fetal, el lactógeno placentario es capaz de estimular directamente la síntesis de IGF-I y aumentar la acumulación hepática de glucógeno, así como estimular el crecimiento fetal, por estimulación del metabolismo intermediario al unirse a receptores tipo lactogénicos (34). A pesar de que se le ha atribuido al lactógeno placentario un efecto regulador de la síntesis de IGF-I, en el presente trabajo las bajas concentraciones de IGF-I no pueden ser explicados por cambios en las concentraciones de lactógeno placentario ya que no se encontró diferencias entre los grupos NT y PE, lo cual coincide con lo reportado por otros autores (183, 184).

Es sabido del efecto positivo que ejerce el estradiol sobre la producción de IGF-I y sus IGFBPs (124-126). Algunos autores han observado que mujeres embarazadas que viven en lugares a 3000 metros sobre el nivel del mar, tienen concentraciones circulantes de estradiol y estriol más bajas a lo largo de todo el embarazo que aquellas que viven en lugares bajos, debido a una reducida oxigenación de la placenta, condición similar a la encontrada durante la preeclampsia severa debido a la disminución del flujo útero-placentario. Se observó que el grupo de estas mujeres que sufrían de hipertensión y proteinuria, y padecían por tanto de preeclampsia, mostraron una marcada disminución de estradiol y un aumento en las concentraciones de progesterona (127). Otros autores han reportado una disminución de la concentración del estradiol conjugado, sin variación en la concentración del estradiol libre, ni de progesterona durante la preeclampsia (128). En el presente estudio, no se encontró diferencias significativas entre los grupos, por lo que las concentraciones de estradiol no parecen estar relacionadas con las menores concentraciones de IGF-I ni con los cambios en el patrón de sus IGFBPs. Esta afirmación se ve reforzada por la ausencia de asociación entre las concentraciones circulantes de estradiol y las de IGF-I.

La progesterona, ha resultado ser un potente estimulador de la producción "*in vitro*" de IGFBP-1 (131). Varios estudios han mostrado que la preeclampsia severa se asocia con altos niveles de progesterona (127), una mayor capacidad de síntesis placentaria (129), y una mayor expresión de los receptores de progesterona en el tejido placentario (130) lo que puede explicar el aumento en las concentraciones de IGFBP-1. A pesar de encontrarse aumentada la IGFBP-1 en nuestro grupo PE, las mediciones de progesterona no mostraron diferencias significativas entre grupos, sugiriendo que si bien "*in vitro*" la progesterona es un factor regulador potente, "*in vivo*" las concentraciones de IGFBP-1 son reguladas por un sistema más complejo. Nuestros resultados concuerdan con los reportados por Zeisler y col en el 2000 (185), quienes no encontraron diferencias significativas en las concentraciones de progesterona en un estudio pareado por edad gestacional conformado por 40 mujeres embarazadas normotensas y 40 mujeres preeclámplicas. Por lo cual, los altos niveles de progesterona encontrados en la preeclampsia severa pudieran ser parte de las complicaciones de la enfermedad y reforzar el incremento de las concentraciones circulantes de la IGFBP-1, pero no parecen ser la causa primaria de su aumento.

A pesar de que las concentraciones circulantes de testosterona se encuentran normalmente bajas durante el embarazo, algunos autores han reportado altas concentraciones de esta hormona esteroide durante la hipertensión inducida por el embarazo (186) y la preeclampsia (132, 133). En nuestro estudio, no se encontró diferencias significativas en las concentraciones circulantes de testosterona entre los grupos NT y PE, lo cual concuerda con lo reportado por otros autores (187, 188). La ausencia de diferencias significativas en las concentraciones de testosterona entre los grupo NT y PE, conjuntamente con la ausencia de diferencias en las concentraciones de

estadiol y progesterona, sugiere que la capacidad de síntesis de hormonas esteroides no se ve comprometida de manera importante durante la preeclampsia moderada.

Es bien conocido el efecto inhibitor de los glucocorticoides sobre la síntesis y secreción de GH, lo que induce una disminución en la producción de IGF-I y alteraciones en los niveles de sus IGFbps (135). Si bien durante el embarazo las concentraciones de GH hipofisaria se mantienen constantes o tienden a disminuir, la producción de GH placentaria se incrementa a lo largo del embarazo, siendo esta isoforma la que regula fundamentalmente la producción de IGF-I durante el embarazo. Ya que durante el retraso del crecimiento intrauterino no asociado con la preeclampsia, se observan altas concentraciones de cortisol y bajas concentraciones de IGF-I, no se puede descartar un efecto inhibitorio del cortisol sobre la producción de GH placentaria y por tanto un efecto negativo indirecto sobre la producción de IGF-I. Esta afirmación se ve reforzada por el hecho conocido de que las concentraciones de GH placentaria se ven disminuidas durante el retraso del crecimiento intrauterino no asociado a la preeclampsia; condición que se caracteriza por una correlación positiva entre las concentraciones de GH placentaria y las de IGF-I en la circulación materna. En la circulación fetal la GH placentaria no tiene un papel fisiológico pues ésta no pasa a la circulación fetal (57). Por otro lado, se ha reportado la capacidad que tienen los glucocorticoides de estimular la producción de proteasas específicas que degradan proteínas transportadoras de factores de crecimiento tales como el TGF- β , produciendo la liberación de éste y potenciando su efecto mitogénico en las células osteoblásticas (189). Además ha sido reportado que el estrés induce proteólisis de las IGFbps, fundamentalmente de la IGFbp-3 (136) y como es sabido en los humanos la hormona fundamental del estrés es el glucocorticoide conocido como cortisol. Se sabe que bajo condiciones de desnutrición,

las concentraciones de cortisol aumentan significativamente y que el cortisol es capaz de estimular la síntesis y liberación de IGFBP-1 (137, 138). Por otro lado, algunos autores han descrito asociaciones negativas y positivas entre las concentraciones de cortisol en el suero del cordón umbilical con las concentraciones de IGF-I e IGFBP-1, respectivamente (168). En el presente estudio, la determinación de cortisol tanto en el suero materno como del cordón umbilical, no mostró diferencias significativas entre grupos, por lo que la disminución de los niveles de IGF-I e IGFBP-3 y el aumento de la IGFBP-1, observado en el grupo PE, no parece estar relacionado directamente con las concentraciones circulantes de cortisol ya que tampoco hubo correlación entre las concentraciones de cortisol y las de IGF-I.

El zinc ha sido mencionado como uno de los factores nutricionales involucrados en la regulación de la síntesis del IGF-I y del crecimiento somático. De hecho, estados de deficiencia de zinc han sido asociado con bajas concentraciones de IGF-I y con un reducido crecimiento somático (151, 190, 191). Se ha visto además que la suplementación con zinc a niños con retraso del crecimiento, resulta en un incremento en las concentraciones circulantes de IGF-I con cambios significativos en el patrón de crecimiento (54). Efectos similares sobre las concentraciones circulantes de IGF-I han sido obtenidos con la administración de zinc durante el embarazo (192). Aunque han sido reportadas bajas concentraciones de zinc durante la preeclampsia (193-195), nosotros no encontramos diferencias significativas entre los grupos NT y PE, lo cual coincide con lo reportado por otro estudio (196). Esta observación sugiere la ausencia de deficiencia de zinc en el grupo PE. Interesantemente, las concentraciones de zinc del tejido placentario correlacionaron positiva y significativamente con las concentraciones de IGF-I del cordón umbilical y con el peso al nacer en el grupo PE. Además, los análisis de

correlación llevados a cabo en los grupos NT y PE juntos mostraron que las concentraciones placentarias de zinc correlacionaron no solamente con las concentraciones de IGF-I del cordón umbilical sino también con las del suero materno. La correlación positiva encontrada entre el zinc placentario con las concentraciones maternas y fetales de IGF-I, reafirma el efecto positivo del zinc sobre la producción de IGF-I y sugiere que el efecto del zinc sobre el crecimiento puede estar mediado por la acción del IGF-I.

Los resultados de los estudios de biología molecular demuestran que las alteraciones en las concentraciones circulantes de IGF-I, IGFBP-1 e IGFBP-3 observadas en el grupo PE, no están relacionadas con cambios en el nivel de expresión placentaria de los genes que codifican para estos factores de crecimiento. Lo que demuestra que el bajo peso de las placentas y de los recién nacidos observado en el grupo PE, no está relacionado con cambios en el nivel de expresión placentaria de estos factores de crecimientos. Además, reafirma el concepto conocido de que la producción de estos factores por la placenta tiene como finalidad mediar efectos autocrino-paracrino y no parece modular de manera importante las concentraciones circulantes de estos factores de crecimiento. Esto se ve reforzado por los resultados obtenidos de los estudios de inmunohistoquímica, los cuales demostraron que tampoco existen diferencias significativas en la síntesis placentaria de IGF-I entre los grupos NT y PE.

Durante el embarazo, el IGF-I y sus IGFBPs son importantes reguladores del crecimiento y diferenciación tanto de los tejidos maternos como fetales. Desde etapas muy tempranas del desarrollo, casi todos los tejidos producen estos péptidos y expresan sus receptores específicos (197). En el presente estudio, la afinidad y la concentración de los receptores de IGF-I (expresada como fmoles/mg de proteína) en el tejido

placentario no fueron diferentes entre los NT y PE, lo que sugiere que si bien la preeclampsia está asociada con una disminución en las concentraciones de su ligando específico (IGF-I), la afinidad y la concentración del receptor no se ven alteradas significativamente durante la preeclampsia. Esta consistencia en las características del receptor placentario de IGF-I, ha sido sugerida por otros autores (198) que han estudiado por métodos inmunohistoquímicos la capacidad de unión del IGF-I por la placenta en condiciones de retraso del crecimiento intrauterino asociado a otras condiciones patológicas distintas a la preeclampsia, tal es el caso de la desnutrición materna-fetal, condición que se caracteriza de igual forma por bajo peso al nacer y bajas concentraciones circulantes de IGF-I; donde tampoco se han encontrado diferencias significativas en la capacidad de unión placentaria de IGF-I. De lo anterior podemos concluir que la capacidad de unión del receptor de IGF-I en la placenta, no parece ser uno de los elementos más importantes en el retraso del crecimiento intrauterino observado durante la preeclampsia, siendo las bajas concentraciones de su ligando específico el elemento limitante y fundamental en el proceso de estimulación del crecimiento y diferenciación placentario y por tanto, la causa responsable de las alteraciones de sus funciones principales tales como el transporte de nutrimentos hacia el feto.

Por otro lado, a pesar de no encontrarse diferencias significativas en la concentración del receptor de insulina en el tejido placentario entre los grupos estudiados, se encontró una disminución significativa de su afinidad en el grupo PE (un incremento en su constante de disociación), lo que sugiere que el transporte de nutrimentos a través de la placenta, fundamentalmente de glucosa, estimulado por insulina pudiera estar disminuida durante la preeclampsia, fundamentalmente en

condiciones donde el crecimiento placentario y fetal está comprometido. En efecto, las fuertes asociaciones encontradas entre la constante de disociación del receptor de insulina con el peso de las placentas y con el peso de los recién nacidos apoyan esta afirmación.

9. Conclusiones

9. CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados del presente estudio confirman que la preeclampsia está asociada con el retraso del crecimiento intrauterino y por tanto con el peso bajo al nacer. Se encontró una disminución significativa en las concentraciones de IGF-I e IGFBP-3 y un incremento en las de IGFBP-1 en el grupo PE, que no se asoció con cambios en el nivel de expresión placentaria de estos factores hormonales. En el grupo PE, el peso al nacer se asoció con las concentraciones de IGF-I del suero materno y del cordón umbilical, con las concentraciones de zinc del tejido placentario y con las concentraciones de leptina del cordón umbilical. El análisis de regresión múltiple paso a paso mostró que de las variables estudiadas, el IGF-I del cordón umbilical fue el factor que se asoció más con el peso al nacer. Las concentraciones de insulina, leptina, lactógeno placentario, estradiol, progesterona, testosterona y cortisol, no mostraron diferencias significativas entre los grupos y no se asociaron con el IGF-I, ni con el peso al nacer. Se observó un aumento en la constante de disociación del receptor de insulina placentario en el grupo PE, lo que refleja una menor afinidad por su ligando específico. La constante de disociación del receptor de insulina, se asoció negativamente con el peso al nacer y con el peso de las placentas. Estos cambios en la afinidad del receptor placentario de insulina conjuntamente con las menores concentraciones circulantes de IGF-I, parecen actuar de forma negativa en el proceso de crecimiento fetal y ser algunas de las causas del bajo peso al nacer observado durante la preeclampsia.

10. Bibliografía

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Guyton A, Hall J. Embarazo y lactancia, en Tratado de Fisiología Médica. 10ª Edición, McGraw-Hill Interamericana Editores de S.A. de C.V.: México, D.F.; 2000. p.1135-51.
2. Cunningham FG, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap LC, Hauth JC, Wenstrom KD. La placenta y las membranas fetales, en Obstetricia de Williams. 21ª Edición, Editorial Médica Panamericana: México, D.F. 2002:72-91.
3. Michael K, Ward BS, Moore WM. Relationship of fetal to placental size: the pig model. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 1983;16:53-62.
4. Bassett JM. Nutrition of the conceptus: aspects of its regulation. Proc Nutr Soc 1986;45:1-10.
5. Bassett JM. Current perspectives on placental development and its integration with fetal growth. Proc Nutr Soc 1991;50:311-19.
6. Myers SA, Sparks JW, Makowski EL, Meschia G, Battaglia FC. Relationship between placental blood flow and placental and fetal size in guinea pig. Am J Physiol 1982;243:H404-9.
7. Lafeber HN, Rolph TP, Jones CT. Studies on the growth of the fetal guinea pig. The effects of ligation of the uterine artery on organ growth and development. J Dev Physiol 1984;6:441-59.
8. Bruce NW, Abdul-Karim RW. Relationships between fetal weight, placental weight and maternal placental circulation in the rabbit at different stages of gestation. J Reprod Fertil 1973;32:15-24.
9. Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF. 3rd Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. Endocrinology 1986;118:1567-82.
10. Kliman HJ. Uteroplacental blood flow. The story of decidualization, menstruation, and trophoblast invasion. Am J Pathol 2000;157:1759-68.
11. Cunningham FG, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap LC, Hauth JC, Wenstrom KD. Las hormonas placentarias, en Obstetricia de Williams. 21ª Edición, Editorial Médica Panamericana: México, D.F. 2002:92-108.
12. Cunningham FG, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap LC, Hauth JC, Wenstrom KD. Crecimiento y desarrollo del feto, en Obstetricia de Williams. 21ª Edición, Editorial Médica Panamericana: México, D.F. 2002:109-40.
13. Greenspan FS, Gardner DG. Endocrinología del embarazo, en Endocrinología Básica y Clínica. 5ª Edición, Manual Moderno: México, D.F. 2003:639-60.
14. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Am J Obstet Gynecol 2000;183:S1-22.
15. Bobadilla JL, Coria SL. Banco de datos de una encuesta de postparto en 25 hospitales del Distrito Federal. Instituto Nacional de Perinatología. 1984-1990.
16. Long PA, Abell DA, Beischer NA. Fetal growth retardation and pre-eclampsia. Br J Obstet Gynaecol 1980;87:13-8.

17. Sibai BM, Mercer B, Sarinoglu C. Severe preeclampsia in the second trimester: recurrence risk and long-term prognosis. *Am J Obstet Gynecol* 1991;165:1408-12.
18. Halhali A, Tovar AR, Torres N, Bourges H, Garabedian M, Larrea F. Preeclampsia is associated with low circulating levels of insulin-like growth factor I and 1,25-dihydroxyvitamin D in maternal and umbilical cord compartments. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1828-33.
19. Redman CW. Current topic: pre-eclampsia and the placenta. *Placenta* 1991;12:301-8.
20. Cunningham FG, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap LC, Hauth JC, Wenstrom KD. Adaptaciones maternas al embarazo, en *Obstetricia de Williams*. 21ª Edición, Editorial Médica Panamericana: México, D.F. 2002:141-69.
21. Petitti DB, Croughan-Minihane MS, Hiatt RA. Weight gain by gestational age in both black and white women delivered of normal-birth-weight and low-birth-weight infants. *Am J Obstet Gynecol* 1991;164:801-5.
22. Hickey CA, Cliver SP, McNeal SF, Hoffman HJ, Goldenberg RL. Prenatal weight gain patterns and spontaneous preterm birth among nonobese black and white women. *Obstet Gynecol* 1995;85:909-14.
23. Meis PJ, Goldenberg RL, Mercer BM, Lams JD, Moawad AH, Miodovnik M, Menard MK, Caritis SN, Thurnau GR, Bottoms SF, Das A, Roberts JM, McNellis D. The preterm prediction study: risk factors for indicated preterm births. Maternal-Fetal Medicine Units Network of the National Institute of Child Health and Human Development. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:562-7.
24. Arngrimsson R, Bjornsson S, Geirsson RT, Bjornsson H, Walker JJ, Snaedal G. Genetic and familial predisposition to eclampsia and pre-eclampsia in a defined population. *Br J Obstet Gynaecol* 1990;97:762-9.
25. Walsh SW. Preeclampsia: an imbalance in placental prostacyclin and thromboxane production. *Am J Obstet Gynecol* 1985;152:335-40.
26. Beer AE, Need JA. Immunological aspects of preeclampsia/eclampsia. *Birth Defects Orig Artic Ser* 1985;21:131-54.
27. Hunt IF, Murphy NJ, Cleaver AE, Faraji B, Swendseid ME, Coulson AH, Clark VA, Browdy BL, Cabalum T, Smith JC, Jr. Zinc supplementation during pregnancy: effects on selected blood constituents and on progress and outcome of pregnancy in low-income women of Mexican descent. *Am J Clin Nutr* 1984;40:508-21.
28. Olsen SF, Secher NJ. A possible preventive effect of low-dose fish oil on early delivery and pre-eclampsia: indications from a 50-year-old controlled trial. *Br J Nutr* 1990;64:599-609.
29. Feinberg RF, Kliman HJ, Cohen AW. Preeclampsia, trisomy 13, and the placental bed. *Obstet Gynecol* 1991;78:505-8.
30. Cunningham FG, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap LC, Hauth JC, Wenstrom KD. Trastornos hipertensivos del embarazo, en *Obstetricia de Williams*. 21ª Edición, Editorial Médica Panamericana: México, D.F. 2002:489-532.
31. Stratta P, Canavese C, Colla L, Dogliani M, Bussolino F, Bianco O, Gagliardi L, Todros T, Iberti M, Veronesi GV, et al. Acute renal failure in preeclampsia-eclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 1987;24:225-31.

32. Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, Hubel CA, McLaughlin MK. Preeclampsia: an endothelial cell disorder. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:1200-4.
33. Kliman HJ. Trophoblast to human placenta, in *Encyclopedia of Reproduction, American Academic of Reproduction: USA*. 1999;4:834-46.
34. Handwerger S, Freemark M. The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000;13:343-56.
35. Chehab FF. The reproductive side of leptin. *Nat Med* 1997;3:952-3.
36. Desoye G, Hartmann M, Jones CJ, Wolf HJ, Kohnen G, Kosanke G, Kaufmann P. Location of insulin receptors in the placenta and its progenitor tissues. *Microsc Res Tech* 1997;38:63-75.
37. Desoye G, Schweditsch MO, Pfeiffer KP, Zechner R, Kostner GM. Correlation of hormones with lipid and lipoprotein levels during normal pregnancy and postpartum. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;64:704-12.
38. Ashton IK, Zapf J, Einschenk I, MacKenzie IZ. Insulin-like growth factors (IGF) 1 and 2 in human foetal plasma and relationship to gestational age and foetal size during midpregnancy. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1985;110:558-63.
39. Clemmons DR. Insulin-like growth factor binding proteins: roles in regulating IGF physiology. *J Dev Physiol* 1991;15:105-10.
40. Clemmons DR, Busby WH, Arai T, Nam TJ, Clarke JB, Jones JI, Ankrapp DK. Role of insulin-like growth factor binding proteins in the control of IGF actions. *Prog Growth Factor Res* 1995;6:357-66.
41. Albrecht ED, Pepe GJ. Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy. *Endocr Rev* 1990;11:124-50.
42. Rotwein P, Pollock KM, Didier DK, Krivi GG. Organization and sequence of the human insulin-like growth factor I gene. Alternative RNA processing produces two insulin-like growth factor I precursor peptides. *J Biol Chem* 1986;261:4828-32.
43. Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995;16:3-34.
44. Rotwein P. Structure, evolution, expression and regulation of insulin-like growth factors I and II. *Growth Factors* 1991;5:3-18.
45. Daughaday WH, Rotwein P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev* 1989;10:68-91.
46. Rinderknecht E, Humbel RE. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 1978;253:2769-76.
47. Ketelslegers JM, Maiter D, Maes M, Underwood LE, Thissen JP. Nutritional regulation of insulin-like growth factor-I. *Metabolism* 1995;44:50-7.
48. Tovar AR, Halhali A, Torres N. Effect of nutritional rehabilitation of undernourished rats on serum insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding proteins. *Rev Invest Clin* 1999;51:99-106.
49. D'Ercole AJ, Stiles AD, Underwood LE. Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:935-9.

50. Fant M, Munro H, Moses AC. An autocrine/paracrine role for insulin-like growth factors in the regulation of human placental growth. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;63:499-505.
51. LeRoith D, Roberts CT, Jr. Insulin-like growth factor I (IGF-I): a molecular basis for endocrine versus local action? *Mol Cell Endocrinol* 1991;77:C57-61.
52. Emler CA, Schalch DS. Nutritionally-induced changes in hepatic insulin-like growth factor I (IGF-I) gene expression in rats. *Endocrinology* 1987;120:832-4.
53. Clegg MS, Keen CL, Donovan SM. Zinc deficiency-induced anorexia influences the distribution of serum insulin-like growth factor-binding proteins in the rat. *Metabolism* 1995;44:1495-501.
54. Ninh NX, Thissen JP, Collette L, Gerard G, Khoi HH, Ketelslegers JM. Zinc supplementation increases growth and circulating insulin-like growth factor I (IGF-I) in growth-retarded Vietnamese children. *Am J Clin Nutr* 1996;63:514-19.
55. Lee WH, Gaylord TD, Bowsher RR, Hlaing M, Moorehead H, Liechty EA. Nutritional regulation of circulating insulin-like growth factors (IGFs) and their binding proteins in the ovine fetus. *Endocr J* 1997;44:163-73.
56. Cha MC, Rojhani A. Failure of IGF-I infusion to promote growth in Zn deficient hypophysectomized rats. *J Trace Elem Med Biol* 1998;12:141-7.
57. Alsat E, Guibourdenche J, Couturier A, Evain-Brion D. Physiological role of human placental growth hormone. *Mol Cell Endocrinol* 1998;140:121-7.
58. Tirapegui J, Fukushima SE, Grimaldi G. Growth, somatomedin and nutrition. *Arch Latinoam Nutr* 1993;43:94-104.
59. Binoux M, Lalou C, Lassarre C, Blat C, Hossenlopp P. Limited proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3): a physiological mechanism in the regulation of IGF bioavailability. *Adv Exp Med Biol* 1993;343:293-300.
60. Lassarre C, Hardouin S, Daffos F, Forestier F, Frankenne F, Binoux M. Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in the human fetus. Relationships with growth in normal subjects and in subjects with intrauterine growth retardation. *Pediatr Res* 1991;29:219-25.
61. Hossenlopp P, Segovia B, Lassarre C, Roghani M, Bredon M, Binoux M. Evidence of enzymatic degradation of insulin-like growth factor-binding proteins in the 150K complex during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:797-805.
62. Giudice LC, Farrell EM, Pham H, Lamson G, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factor binding proteins in maternal serum throughout gestation and in the puerperium: effects of a pregnancy-associated serum protease activity. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:806-16.
63. Bang P, Stangenberg M, Westgren M, Rosenfeld RG. Decreased ternary complex formation and predominance of a 29 kDa IGFBP-3 fragment in human fetal serum. *Growth Regul* 1994;4:68-76.
64. Bar RS, Boes M, Clemmons DR, Busby WH, Sandra A, Dake BL, Booth BA. Insulin differentially alters transcapillary movement of intravascular IGFBP-1, IGFBP-2 and endothelial cell IGF-binding proteins in the rat heart. *Endocrinology* 1990;127:497-9.
65. Bar RS, Clemmons DR, Boes M, Busby WH, Booth BA, Dake BL, Sandra A. Transcapillary permeability and subendothelial distribution of endothelial and amniotic fluid insulin-like growth factor binding proteins in the rat heart. *Endocrinology* 1990;127:1078-86.

66. Jones JI, Gockerman A, Busby WH, Jr., Wright G, Clemmons DR. Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to the alpha 5 beta 1 integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:10553-7.
67. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69:11-25.
68. Jones JI, Doerr ME, Clemmons DR. Cell migration: interactions among integrins, IGFs and IGFBPs. *Prog Growth Factor Res* 1995;6:319-27.
69. Elgin RG, Busby WH, Jr., Clemmons DR. An insulin-like growth factor (IGF) binding protein enhances the biologic response to IGF-I. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:3254-8.
70. Busby WH, Hossenlopp P, Binoux M, Clemmons DR. Purified preparations of the amniotic fluid-derived insulin-like growth factor-binding protein contain multimeric forms that are biologically active. *Endocrinology* 1989;125:773-7.
71. Rutanen EM, Pekonen F, Makinen T. Soluble 34K binding protein inhibits the binding of insulin-like growth factor I to its cell receptors in human secretory phase endometrium: evidence for autocrine/paracrine regulation of growth factor action. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;66:173-80.
72. Liu L, Brinkman A, Blat C, Harel L. IGFBP-1, an insulin like growth factor binding protein, is a cell growth inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;174:673-9.
73. Lewitt MS, Denyer GS, Cooney GJ, Baxter RC. Insulin-like growth factor-binding protein-1 modulates blood glucose levels. *Endocrinology* 1991;129:2254-6.
74. Marshall RN, Underwood LE, Voina SJ, Foushee DB, Van Wyk JJ. Characterization of the insulin and somatomedin-C receptors in human placental cell membranes. *J Clin Endocrinol Metab* 1974;39:283-92.
75. Drop SL, Kortleve DJ, Guyda HJ. Isolation of a somatomedin-binding protein from preterm amniotic fluid. Development of a radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;59:899-907.
76. Drop SL, Kortleve DJ, Guyda HJ, Posner BI. Immunoassay of a somatomedin-binding protein from human amniotic fluid: levels in fetal, neonatal, and adult sera. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;59:908-15.
77. Han VK, Lund PK, 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.
78. 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 fetomaternal interface. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:2680-93.
79. Gluckman PD, Johnson-Barrett JJ, Butler JH, Edgar BW, Gunn TR. Studies of insulin-like growth factor -I and -II by specific radioligand assays in umbilical cord blood. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1983;19:405-13.
80. Hall K, Enberg G, Hellem E, Lundin G, Ottosson-Seeberger A, Sara V, Trygstad O, Ofverholm U. Somatomedin levels in pregnancy: longitudinal study in healthy subjects and patients with growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;59:587-94.

81. Hall K, Hansson U, Lundin G, Luthman M, Persson B, Pova G, Stangenberg M, Ofverholm U. Serum levels of somatomedins and somatomedin-binding protein in pregnant women with type I or gestational diabetes and their infants. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;63:1300-6.
82. Verhaeghe J, Van Bree R, Van Herck E, Laureys J, Bouillon R, Van Assche FA. C-peptide, insulin-like growth factors I and II, and insulin-like growth factor binding protein-1 in umbilical cord serum: correlations with birth weight. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:89-97.
83. Giudice LC, de Zegher F, Gargosky SE, Dsupin BA, de las Fuentes L, Crystal RA, Hintz RL, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factors and their binding proteins in the term and preterm human fetus and neonate with normal and extremes of intrauterine growth. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:1548-55.
84. Halhali A, Bourges H, Carrillo A, Garabedian M. Lower circulating insulin-like growth factor I and 1,25-dihydroxyvitamin D levels in preeclampsia. *Rev Invest Clin* 1995;47:259-66.
85. Giudice LC, Martina NA, Crystal RA, Tazuke S, Druzin M. Insulin-like growth factor binding protein-1 at the maternal-fetal interface and insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-II, and insulin-like growth factor binding protein-1 in the circulation of women with severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176:751-7.
86. Wang HS, Chard T. Chromatographic characterization of insulin-like growth factor-binding proteins in human pregnancy serum. *J Endocrinol* 1992;133:149-59.
87. Howell RJ, Perry LA, Choglay NS, Bohn H, Chard T. Placental protein 12 (PP12): a new test for the prediction of the small-for-gestational-age infant. *Br J Obstet Gynaecol* 1985;92:1141-4.
88. Wang HS, Lim J, English J, Irvine L, Chard T. The concentration of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-1 in human umbilical cord serum at delivery: relation to fetal weight. *J Endocrinol* 1991;129:459-64.
89. Westwood M, Gibson JM, Davies AJ, Young RJ, White A. The phosphorylation pattern of insulin-like growth factor-binding protein-1 in normal plasma is different from that in amniotic fluid and changes during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:1735-41.
90. Jones JI, D'Ercole AJ, Camacho-Hubner C, Clemmons DR. Phosphorylation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 1 in cell culture and in vivo: effects on affinity for IGF-I. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:7481-5.
91. Yu J, Iwashita M, Kudo Y, Takeda Y. Phosphorylated insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-1 (IGFBP-1) inhibits while non-phosphorylated IGFBP-1 stimulates IGF-I-induced amino acid uptake by cultured trophoblast cells. *Growth Horm IGF Res* 1998;8:65-70.
92. Iwashita M, Sakai K, Kudo Y, Takeda Y. Phosphoisoforms of insulin-like growth factor binding protein-1 in appropriate-for-gestational-age and small-for-gestational-age fetuses. *Growth Horm IGF Res* 1998;8:487-93.
93. Phelps RL, Metzger BE, Freinkel N. Carbohydrate metabolism in pregnancy. XVII. Diurnal profiles of plasma glucose, insulin, free fatty acids, triglycerides, cholesterol, and individual amino acids in late normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1981;140:730-6.

94. Lind T, Bell S, Gilmore E, Huisjes HJ, Schally AV. Insulin disappearance rate in pregnant and non-pregnant women, and in non-pregnant women given GHRH. *Eur J Clin Invest* 1977;7:47-52.
95. Greenspan FS, Gardner DG. Hormonas pancreáticas y diabetes mellitus, en *Endocrinología Básica y Clínica*. 5ª Edición, Manual Moderno: México, D.F. 2003:695-778.
96. Schwartz R, Gruppuso PA, Petzold K, Brambilla D, Hiilesmaa V, Teramo KA. Hyperinsulinemia and macrosomia in the fetus of the diabetic mother. *Diabetes Care* 1994;17:640-8.
97. Sowers JR, Saleh AA, Sokol RJ. Hyperinsulinemia and insulin resistance are associated with preeclampsia in African-Americans. *Am J Hypertens* 1995;8:1-4.
98. Martínez Abundis E, González Ortiz M, Quinones Galvan A, Ferrannini E. Hyperinsulinemia in glucose-tolerant women with preeclampsia. A controlled study. *Am J Hypertens* 1996;9:610-4.
99. Kaaja R, Laivuori H, Laakso M, Tikkanen MJ, Ylikorkala O. Evidence of a state of increased insulin resistance in preeclampsia. *Metabolism* 1999;48:892-6.
100. Caruso A, Ferrazzani S, De Carolis S, Lucchese A, Lanzzone A, De Santis L, Paradisi G. Gestational hypertension but not pre-eclampsia is associated with insulin resistance syndrome characteristics. *Hum Reprod* 1999;14:219-23.
101. MacDougald OA, Hwang CS, Fan H, Lane MD. Regulated expression of the obese gene product (leptin) in white adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:9034-7.
102. Saladin R, De Vos P, Guerre-Millo M, Leturque A, Girard J, Staels B, Auwerx J. Transient increase in obese gene expression after food intake or insulin administration. *Nature* 1995;377:527-9.
103. Barr VA, Malide D, Zarnowski MJ, Taylor SI, Cushman SW. Insulin stimulates both leptin secretion and production by rat white adipose tissue. *Endocrinology* 1997;138:4463-72.
104. Chien EK, Hara M, Rouard M, Yano H, Phillippe M, Polonsky KS, Bell GI. Increase in serum leptin and uterine leptin receptor messenger RNA levels during pregnancy in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;237:476-80.
105. Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, Nakao K. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 1997;3:1029-33.
106. Halaas JL, Gajiwala KS, Maffei M, Cohen SL, Chait BT, Rabinowitz D, Lallone RL, Burley SK, Friedman JM. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 1995;269:543-6.
107. Hardie L, Trayhurn P, Abramovich D, Fowler P. Circulating leptin in women: a longitudinal study in the menstrual cycle and during pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997;47:101-6.
108. Schubring C, Kiess W, Englaro P, Rascher W, Dotsch J, Hanitsch S, Attanasio A, Blum WF. Levels of leptin in maternal serum, amniotic fluid, and arterial and venous cord blood: relation to neonatal and placental weight. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1480-3.

109. Herrera E, Lasuncion MA, Palacin M, Zorzano A, Bonet B. Intermediary metabolism in pregnancy. First theme of the Freinkel era. *Diabetes* 1991;40 :83-88.
110. Leturque A, Guerre-Millo M, Lavau M, Girard J. Effect of insulin on glucose metabolism in adipocytes from virgin and late-pregnant rats. *Biochem J* 1984;224:685-8.
111. Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, Williams LM, Trayhurn P, Mercer JG. Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:11073-8.
112. Leturque A, Ferre P, Burnol AF, Kande J, Maulard P, Girard J. Glucose utilization rates and insulin sensitivity in vivo in tissues of virgin and pregnant rats. *Diabetes* 1986;35:172-7.
113. Lepercq J, Cauzac M, Lahlou N, Timsit J, Girard J, Auwerx J, Hauguel-de Mouzon S. Overexpression of placental leptin in diabetic pregnancy: a critical role for insulin. *Diabetes* 1998;47:847-50.
114. Mise H, Sagawa N, Matsumoto T, Yura S, Nanno H, Itoh H, Mori T, Masuzaki H, Hosoda K, Ogawa Y, Nakao K. Augmented placental production of leptin in preeclampsia: possible involvement of placental hypoxia. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3225-9.
115. Kokot F, Wiecek A, Adamczak M, Ulman I, Spiechowicz U, Cieplok J, Mesjasz J. Pathophysiological role of leptin in patients with chronic renal failure, in kidney transplant patients, in patients with essential hypertension, and in pregnant women with preeclampsia. *Artif Organs* 1999;23:70-4.
116. McCarthy JF, Misra DN, Roberts JM. Maternal plasma leptin is increased in preeclampsia and positively correlates with fetal cord concentration. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:731-6.
117. Laivuori H, Kaaja R, Koistinen H, Karonen SL, Andersson S, Koivisto V, Ylikorkala O. Leptin during and after preeclamptic or normal pregnancy: its relation to serum insulin and insulin sensitivity. *Metabolism* 2000;49:259-63.
118. Sattar N, Greer IA, Pirwani I, Gibson J, Wallace AM. Leptin levels in pregnancy: marker for fat accumulation and mobilization? *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998;77:278-83.
119. Pepe GJ, Titus JA, Townsley JD. Increasing fetal adrenal formation of cortisol from pregnenolone during baboon (*Papio papio*) gestation. *Biol Reprod* 1977;17:701-5.
120. Pepe GJ, Albrecht ED. Regulation of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev* 1990;11:151-76.
121. Simpson ER, Carr BR, Parker CR, Jr., Milewich L, Porter JC, MacDonald PC. The role of serum lipoproteins in steroidogenesis by the human fetal adrenal cortex. *J Clin Endocrinol Metab* 1979;49:146-8.
122. Simpson ER, Bilheimer DW, MacDonald PC, Porter JC. Uptake and degradation of plasma lipoproteins by human choriocarcinoma cells in culture. *Endocrinology* 1979;104:8-16.
123. Albrecht ED, Babischkin JS, Koos RD, Pepe GJ. Developmental increase in low density lipoprotein receptor messenger ribonucleic acid levels in placental syncytiotrophoblasts during baboon pregnancy. *Endocrinology* 1995;136:5540-6.

124. Ernst M, Rodan GA. Estradiol regulation of insulin-like growth factor-I expression in osteoblastic cells: evidence for transcriptional control. *Mol Endocrinol* 1991;5:1081-9.
125. Slater M, Patava J, Kingham K, Mason RS. Modulation of growth factor incorporation into ECM of human osteoblast-like cells in vitro by 17 beta-estradiol. *Am J Physiol* 1994;267:E990-1001.
126. Kassem M, Okazaki R, Harris SA, Spelsberg TC, Conover CA, Rigg BL. Estrogen increases inhibitory insulin-like growth factor binding protein-4 production in osteoblastic cells: potential mechanism for estrogen regulation of effect mediated by insulin-like growth factors. *J Bone Miner Res* 1995;10:T247.
127. Zamudio S, Leslie KK, White M, Hagerman DD, Moore LG. Low serum estradiol and high serum progesterone concentrations characterize hypertensive pregnancies at high altitude. *J Soc Gynecol Investig* 1994;1:197-205.
128. Rosing U, Carlstrom K. Serum levels of unconjugated and total oestrogens and dehydroepiandrosterone, progesterone and urinary oestriol excretion in pre-eclampsia. *Gynecol Obstet Invest* 1984;18:199-205.
129. Walsh SW. Progesterone and estradiol production by normal and preeclamptic placentas. *Obstet Gynecol* 1988;71:222-6.
130. Faxen M, Nasiell J, Blanck A, Nisell H, Lunell NO. 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;15:9-13.
131. Rutanen EM, Koistinen R, Sjoberg J, Julkunen M, Wahlstrom T, Bohn H, Seppala M. Synthesis of placental protein 12 by human endometrium. *Endocrinology* 1986;118:1067-71.
132. Acromite MT, Mantzoros CS, Leach RE, Hurwitz J, Dorey LG. Androgens in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:60-3.
133. Serin IS, Kula M, Basbug M, Unluhizarci K, Gucer S, Tayyar M. Androgen levels of preeclamptic patients in the third trimester of pregnancy and six weeks after delivery. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2001;80:1009-13.
134. Seely EW, Solomon CG. Insulin resistance and its potential role in pregnancy-induced hypertension. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2393-8.
135. Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S. Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions. *Endocr Rev* 1997;18:801-31.
136. Davenport ML, Isley WL, Pucilowska JB, Pemberton LB, Lyman B, Underwood LE, Clemmons DR. Insulin-like growth factor-binding protein-3 proteolysis is induced after elective surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:590-5.
137. Conover CA, Divertie GD, Lee PD. Cortisol increases plasma insulin-like growth factor binding protein-1 in humans. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1993;128:140-3.
138. Lee PD, Conover CA, Powell DR. Regulation and function of insulin-like growth factor-binding protein-1. *Proc Soc Exp Biol Med* 1993;204:4-29.
139. Cousins RJ. Toward a molecular understanding of zinc metabolism. *Clin Physiol Biochem* 1986;4:20-30.
140. Swanson CA, King JC. Zinc and pregnancy outcome. *Am J Clin Nutr* 1987;46:763-71.

141. Bettger WJ, Fish TJ, O'Dell B L. Effects of copper and zinc status of rats on erythrocyte stability and superoxide dismutase activity. *Proc Soc Exp Biol Med* 1978;158:279-82.
142. Kazimierczak W, Adamas B, Maslinski C. The action of the complexes of lidocaine with zinc on histamine release from isolated rat mast cells. *Biochem Pharmacol* 1978;27:243-4.
143. Berg JM, Shi Y. The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science* 1996;271:1081-5.
144. Cousins RJ. Metal elements and gene expression. *Annu Rev Nutr* 1994;14:449-69.
145. Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross LC, Hauth AC. Zinc, in *Modern Nutrition in Health and Disease*. Ninth Edition, Lippincott Williams & Wilkins: USA, Baltimore, Maryland. 1998:223-39.
146. Favier AE. The role of zinc in reproduction. Hormonal mechanisms. *Biol Trace Elem Res* 1992;32:363-82.
147. Nishi Y. Zinc and growth. *J Am Coll Nutr* 1996;15:340-4.
148. Lefebvre D, Beckers F, Ketelslegers JM, Thissen JP. Zinc regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I), growth hormone receptor (GHR) and binding protein (GHBP) gene expression in rat cultured hepatocytes. *Mol Cell Endocrinol* 1998;138:127-36.
149. Dorup I, Flyvbjerg A, Everts ME, Clausen T. Role of insulin-like growth factor-1 and growth hormone in growth inhibition induced by magnesium and zinc deficiencies. *Br J Nutr* 1991;66:505-21.
150. McNall AD, Etherton TD, Fosmire GJ. The impaired growth induced by zinc deficiency in rats is associated with decreased expression of the hepatic insulin-like growth factor I and growth hormone receptor genes. *J Nutr* 1995;125:874-9.
151. Roth HP, Kirchgessner M. Influence of alimentary zinc deficiency on the concentration of growth hormone (GH), insulin-like growth factor I (IGF-I) and insulin in the serum of force-fed rats. *Horm Metab Res* 1994;26:404-8.
152. Oner G, Bhaumick B, Bala RM. Effect of zinc deficiency on serum somatomedin levels and skeletal growth in young rats. *Endocrinology* 1984;114:1860-3.
153. Lazebnik N, Kuhnert BR, Kuhnert PM. Zinc, cadmium, and hypertension in parturient women. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:437-40.
154. Tamura T, Johannung GL, Goldenberg RL, Johnston KE, DuBard MB. Effect of angiotensin-converting enzyme gene polymorphism on pregnancy outcome, enzyme activity, and zinc concentration. *Obstet Gynecol* 1996;88:497-502.
155. Hossenlopp P, Seurin D, Segovia-Quinson B, Hardouin S, Binoux M. Analysis of serum insulin-like growth factor binding proteins using western blotting: use of the method for titration of the binding proteins and competitive binding studies. *Anal Biochem* 1986;154:138-43.
156. Sternberger LA. The unlabeled antibody method. Hormone receptor, Golgi-like and dual color immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 1979;27:1658-9.
157. Sternberger LA. The unlabeled antibody (PAP) method, introduction. *J Histochem Cytochem* 1979;27:1657.
158. Aviv H, Leder P. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972;69:1408-12.

159. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
160. Lubchenco LO, Hansman C, Dressler M, Boyd E. Intrauterine growth as estimated from liveborn birth-weight data at 24 to 42 weeks of gestation. *Pediatrics* 1963;79:3-800.
161. Lubchenco LO, Hansman C, Boyd E. Intrauterine growth in length and head circumference as estimated from live births at gestational ages from 26 to 42 weeks. *Pediatrics* 1966;37:403-8.
162. 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.
163. Nieto-Diaz A, Villar J, Matorras-Weinig R, Valenzuela-Ruiz P. Intrauterine growth retardation at term: association between anthropometric and endocrine parameters. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1996;75:127-31.
164. Ostlund E, Bang P, Hagenas L, Fried G. Insulin-like growth factor I in fetal serum obtained by cordocentesis is correlated with intrauterine growth retardation. *Hum Reprod* 1997;12:840-4.
165. Stefanidis K, Solomou E, Mouzakioti E, Stefos T, Farmakides G. Comparison of somatomedin-C (SMC/IGF-I), human placental lactogen and Doppler velocimetry between appropriate and small-for-gestational-age pregnancies. *Clin Exp Obstet Gynecol* 1998;25:20-2.
166. Cance-Rouzaud A, Laborie S, Bieth E, Tricoire J, Rolland M, Grandjean H, Rochiccioli P, Tauber M. Growth hormone, insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 are regulated differently in small-for-gestational-age and appropriate-for-gestational-age neonates. *Biol Neonate* 1998;73:347-55.
167. Cianfarani S, Germani D, Rossi P, Rossi L, Germani A, Ossicini C, Zuppa A, Argiro G, Holly JM, Branca F. Intrauterine growth retardation: evidence for the activation of the insulin-like growth factor (IGF)-related growth-promoting machinery and the presence of a cation-independent IGF binding protein-3 proteolytic activity by two months of life. *Pediatr Res* 1998;44:374-80.
168. Cianfarani S, Germani D, Rossi L, Argiro G, Boemi S, Lemon M, Holly JM, Branca F. IGF-I and IGF-binding protein-1 are related to cortisol in human cord blood. *Eur J Endocrinol* 1998;138:524-9.
169. Chard T. Insulin-like growth factors and their binding proteins in normal and abnormal human fetal growth. *Growth Regul* 1994;4:91-100.
170. Tazuke SI, Mazure NM, Sugawara J, Carland G, Faessen GH, Suen LF, Irwin JC, Powell DR, Giaccia AJ, Giudice LC. Hypoxia stimulates insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) gene expression in HepG2 cells: a possible model for IGFBP-1 expression in fetal hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:10188-93.
171. Holly JM, Biddlecombe RA, Dunger DB, Edge JA, Amiel SA, Howell R, Chard T, Rees LH, Wass JA. Circadian variation of GH-independent IGF-binding protein in diabetes mellitus and its relationship to insulin. A new role for insulin? *Clin Endocrinol (Oxf)* 1988;29:667-75.
172. Suikkari AM, Koivisto VA, Koistinen R, Seppala M, Yki-Jarvinen H. Dose-response characteristics for suppression of low molecular weight plasma insulin-

- like growth factor-binding protein by insulin. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;68:135-40.
173. Westwood M, Gibson JM, Williams AC, Clayton PE, Hamberg O, Flyvbjerg A, White A. Hormonal regulation of circulating insulin-like growth factor-binding protein-1 phosphorylation status. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:3520-7.
 174. Ertl T, Funke S, Sarkany I, Szabo I, Rascher W, Blum WF, Sulyok E. Postnatal changes of leptin levels in full-term and preterm neonates: their relation to intrauterine growth, gender and testosterone. *Biol Neonate* 1999;75:167-76.
 175. Geary M, Pringle PJ, Persaud M, Wilshin J, Hindmarsh PC, Rodeck CH, Brook CG. Leptin concentrations in maternal serum and cord blood: relationship to maternal anthropometry and fetal growth. *Br J Obstet Gynaecol* 1999;106:1054-60.
 176. Gomez L, Carrascosa A, Yeste D, Potau N, Rique S, Ruiz-Cuevas P, Almar J. Leptin values in placental cord blood of human newborns with normal intrauterine growth after 30-42 weeks of gestation. *Horm Res* 1999;51:10-4.
 177. Shaarawy M, el-Mallah SY. Leptin and gestational weight gain: relation of maternal and cord blood leptin to birth weight. *J Soc Gynecol Investig* 1999;6:70-3.
 178. Schubring C, Siebler T, Kratzsch J, Englaro P, Blum WF, Triep K, Kiess W. Leptin serum concentrations in healthy neonates within the first week of life: relation to insulin and growth hormone levels, skinfold thickness, body mass index and weight. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999;51:199-204.
 179. Lin KC, Hsu SC, Kuo CH, Zhou JY. Difference of plasma leptin levels in venous and arterial cord blood: relation to neonatal and placental weight. *Kaohsiung J Med Sci* 1999;15:679-85.
 180. Mantzoros CS, Prasad AS, Beck FW, Grabowski S, Kaplan J, Adair C, Brewer GJ. Zinc may regulate serum leptin concentrations in humans. *J Am Coll Nutr* 1998;17:270-5.
 181. Williams MA, Havel PJ, Schwartz MW, Leisenring WM, King IB, Zingheim RW, Zebelman AM, Luthy DA. Pre-eclampsia disrupts the normal relationship between serum leptin concentrations and adiposity in pregnant women. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1999;13:190-204.
 182. Kirel B, Tekin N, Tekin B, Kilic FS, Dogruel N, Aydogdu SD. Cord blood leptin levels: relationship to body weight, body mass index, sex and insulin and cortisol levels of maternal-newborn pairs at delivery. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000;13:71-7.
 183. Feng Q, Cui S, Yang W. Clinical significance of beta-hCG and human placental lactogen in serum of normal pregnancies and patients with pregnancy induced hypertension. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2000;35:648-50.
 184. Bersinger NA, Groome N, Muttukrishna S. Pregnancy-associated and placental proteins in the placental tissue of normal pregnant women and patients with pre-eclampsia at term. *Eur J Endocrinol* 2002;147:785-93.
 185. Zeisler H, Sator MO, Joura EA. Serum levels of progesterone in patients with preeclampsia. *Wien Klin Wochenschr* 2000;112:362-4.
 186. Jirecek S, Joura EA, Tempfer C, Knofler M, Husslein P, Zeisler H. Elevated serum concentrations of androgens in women with pregnancy-induced hypertension. *Wien Klin Wochenschr* 2003;115:162-6.

187. Ficicioglu C, Kutlu T. The role of androgens in the aetiology and pathology of pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol* 2003;23:134-7.
188. Miller NR, Garry D, Cohen HW, Figueroa R. Serum androgen markers in preeclampsia. *J Reprod Med* 2003;48:225-9.
189. Oursler MJ, Riggs BL, Spelsberg TC. Glucocorticoid-induced activation of latent transforming growth factor-beta by normal human osteoblast-like cells. *Endocrinology* 1993;133:2187-96.
190. Ninh NX, Thissen JP, Maiter D, Adam E, Mulumba N, Ketelslegers JM. Reduced liver insulin-like growth factor-I gene expression in young zinc-deprived rats is associated with a decrease in liver growth hormone (GH) receptors and serum GH-binding protein. *J Endocrinol* 1995;144:449-56.
191. Ripa S, Ripa R. Zinc and the growth hormone system. *Minerva Med* 1996;87:25-31.
192. Nishiyama S, Kiwaki K, Miyazaki Y, Hasuda T. Zinc and IGF-I concentrations in pregnant women with anemia before and after supplementation with iron and/or zinc. *J Am Coll Nutr* 1999;18:261-7.
193. Bassiouni BA, Foda AI, Rafei AA. Maternal and fetal plasma zinc in pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1979;9:75-80.
194. Kiilholma P, Paul R, Pakarinen P, Gronroos M. Copper and zinc in pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1984;63:629-31.
195. Zimmerman AW, Dunham BS, Nochimson DJ, Kaplan BM, Clive JM, Kunkel SL. Zinc transport in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1984;149:523-9.
196. Lao TT, Chin RK, Swaminathan R, Mak YT. Plasma and erythrocyte zinc concentrations in pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1989;30:117-22.
197. D'Ercole AJ, Hill DJ, Strain AJ, Underwood LE. Tissue and plasma somatomedin-C/insulin-like growth factor I concentrations in the human fetus during the first half of gestation. *Pediatr Res* 1986;20:253-5.
198. Holmes R, Porter H, Newcomb P, Holly JM, Soothill P. An immunohistochemical study of type I insulin-like growth factor receptors in the placentae of pregnancies with appropriately grown or growth restricted fetuses. *Placenta* 1999;20:325-30.

11. Artículos Publicados Relacionados con la Tesis

ORIGINAL ARTICLE

Newborn Birth Weight Correlates with Placental Zinc, Umbilical Insulin-Like Growth Factor I, and Leptin Levels in Preeclampsia

Eulises Díaz, Ali Halhali, Cocotzin Luna, Lorenza Díaz, Euclides Avila and Fernando Larrea

Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ), Mexico City, Mexico

Received for publication January 10, 2001; accepted June 29, 2001 (01/008).

Background. The aim of the present study was to determine whether newborn birth weights were associated with insulin-like growth factor I (IGF-I), zinc, and leptin in preeclamptic and normotensive pregnancies.

Methods. This study was done cross-sectionally and included 15 women with moderate preeclampsia (PE group) and 11 normotensive pregnant women (NT group) of similar gestational age. Maternal and umbilical cord serum levels of zinc, IGF-I, IGF binding proteins (IGFBPs), leptin, and placental zinc were assessed in each group.

Results. As compared with the NT group, the PE group had significantly ($p < 0.05$) lower newborn birth weight [3.33 (3.11–3.55) vs. 2.80 (2.40–3.17) kg], maternal IGF-I [303 (276–364) vs. 198 (153–244) ng/mL], and umbilical IGF-I [87 (71–126) vs. 44 (26–98) ng/mL]. In addition, low IGFBP-3 and high IGFBP-1 were observed in the PE group. In the PE group, birth weight correlated positively with placental zinc ($\rho = 0.56$, $p = 0.04$), maternal IGF-I ($\rho = 0.76$, $p = 0.004$), umbilical cord IGF-I ($\rho = 0.75$, $p = 0.005$), and umbilical cord leptin ($\rho = 0.61$, $p = 0.02$) levels. Stepwise multiple regression analysis showed that among these variables, umbilical IGF-I was the major predictor of birth weight. In the NT group, birth weight did not correlate with any of these variables.

Conclusions. The present study indicates that moderate preeclampsia is associated with low newborn birth weight, IGF-I, IGFBP-3, and high IGFBP-1 without significant changes in zinc and leptin levels. In addition, umbilical IGF-I was the major predictor of newborn birth weight. © 2002 IMSS. Published by Elsevier Science Inc.

Key Words: Birth weight, IGF-I, Zinc, Leptin, Preeclampsia.

Introduction

During normal pregnancy, low birth weight has been associated with decreased circulating zinc levels (1,2), low IGF-I and IGFBP-3, and high IGFBP-1 concentrations in maternal and fetal circulation (3–11). In addition, several studies have shown a positive correlation between newborn birth weight and umbilical cord serum leptin levels (12–18). Zinc effects on fetal growth and IGF-I and leptin may mediate development, at least in part, because nutritional zinc status

modifies the circulating levels of these two hormones (19,20).

Preeclampsia is associated with intrauterine growth retardation (21,22) and low circulating IGF-I levels (23–25). Results regarding leptin and zinc concentrations are controversial in preeclamptic women (26–37). Indeed, maternal circulating leptin levels have been found high (26–29) or unchanged (26–30) in preeclampsia. On the other hand, circulating zinc concentrations have been found low in maternal (31–33,37) and umbilical cord (31,34,35) serum during preeclampsia. High (34,35) or unchanged (36) maternal zinc concentrations have been also reported in preeclamptic women.

Although IGF-I, zinc, and leptin have been suggested as regulator factors of fetal growth, they have not been assessed simultaneously during preeclampsia; therefore, the

Address reprint requests to: Dr. Ali Halhali, Departamento de Biología de la Reproducción, INCMNSZ, Vasco de Quiroga #15, Col. Tlalpan, 14000 México, D.F., México. Tel.: (+52) (55) 5573-1160; FAX: (+52) (55) 5655-9859; E-mail: alih@quetzal.innsz.mx

aim of the present study was to determine the major predictor of newborn birth weight in preeclamptic and normotensive pregnancies.

Materials and Methods

Subjects. Maternal and umbilical cord blood samples as well as placental explants were obtained from patients in accordance with the guidelines of the Declaration of Helsinki. The protocol of this study was approved by the Human Ethics Committee of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (July 3, 1998). The study was done cross-sectionally at delivery. Using a recommended statistical method for sample size determination (38) and our previous results (25) in regard to IGF-I concentrations in normal and preeclamptic pregnancies, sample size was estimated to be equal to or more than nine subjects in each group to reach >80% statistical sample power at a 95% confidence level (95% CI). For the experimental group (PE group), 15 preeclamptic women were chosen in a consecutive manner. The control group (NT group) was made up of normotensive pregnant women without significant differences in biological and gestational ages and in parity as compared to those of the experimental group. All subjects included in the study signed a written informed consent form. Diagnosis of preeclampsia was based on the presence of hypertension (systolic blood pressure ≥ 140 mmHg and/or diastolic blood pressure ≥ 90 mmHg) at least two times, and marked proteinuria (at least 2+ on the dipstick: >100 mg/dL) (21). All 15 pregnant women belonging to the PE group had a diagnosis of moderate preeclampsia (21). Exclusion criteria were as follows: known preexisting hypertension or previous preeclampsia; liver, renal, heart, or endocrine disorders, and use of nutritional supplements, diuretics, or any kind of hormonal treatment. Only women giving birth to a clinically healthy single product were included in the study. Gestational age and newborns small for gestational age were estimated as previously described (39,40).

Maternal and umbilical cord blood samples and placental explants were collected at delivery. After centrifugation of blood, serum samples were aliquoted and frozen at -70°C until analysis. Placental explants were washed in saline solution to eliminate the excess of blood and frozen thereafter at -70°C until analysis.

Zinc and protein determinations. Serum and placental zinc concentrations were measured by atomic absorption spectrophotometry (Perkin Elmer 2380, Norwalk, CT, USA). Placental zinc concentrations were determined after tissue digestion in nitric acid solution using a microwave sample preparation system MDS 2000 (CEM Corporation, Matthews, NC, USA). Placental protein was determined as previously described by Bradford et al. (41).

Serum IGF-I and leptin determinations. Serum IGF-I was determined using a commercial immunoradiometric assay kit (Diagnostic System Laboratories, Webster, TX, USA) after separation from its binding proteins, as previously described (42). Sensitivity was 0.8 ng/mL and intra- and inter-assay coefficients of variation were 3.4 and 8.2%, respectively. Serum leptin was determined using a commercial radioimmunoassay kit (Linco Research, Inc., St. Louis, MO, USA). Sensitivity was 0.5 ng/mL, and intra- and inter-assay coefficients of variation were $<10\%$.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western ligand blotting (WLB). Analysis of serum IGF-BPs by WLB was done as previously described (43,44). A 20- μL aliquot of a serum pool from each group was diluted in 280 μL of buffer (2.5% sodium dodecyl sulfate, 10% glycerol, 0.02% bromophenol in 0.06 mol/L Tris-HCl, pH 6.8). An aliquot of 50 μL of each sample was applied to 11% SDS-PAGE in the absence of a reducing agent and run overnight. Proteins were then electroblotted onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The nitrocellulose membrane was blocked at 4°C with 1.5 mol/L NaCl in 100 mmol/L Tris base, pH 7.4 (TBS)/0.5% gelatin, washed with TBS/0.1% Tween-20, and incubated for 48 h with 800,000 cpm ^{125}I IGF-I (Amersham, Buckinghamshire, UK) at 4°C . Membranes were washed twice with TBS/0.1% Tween 20 and three times with TBS. The amount of IGF-BPs in nitrocellulose membranes was determined using electronic autoradiography with an Instant Imager (Packard Instrument Co., Meriden, NJ, USA). Membranes were also exposed to Extascan film, Kodak, at -80°C with an intensifying screen.

Statistical analysis. Results are presented as median with interquartile ranges. Analysis of statistical differences between groups was performed by Mann-Whitney *U* test. Analysis of frequencies of females between groups was done using χ^2 test. Analysis of association was tested using Spearman rank correlation and stepwise multiple regression test. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. All statistical analyses were done using Statview 4.02 statistical package (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA, USA).

Results

Clinical characteristics of the NT and PE groups. Table 1 summarizes the clinical characteristics of subjects belonging to the NT and PE groups. All 15 pregnant women belonging to the PE group had a diagnosis of moderate preeclampsia. Maternal and gestational ages, parity, and proportion of female newborns were not significantly different between groups. Newborn birth weights were significantly ($p = 0.01$) lower in the PE group than in the NT group. No newborns

Table 1. Clinical characteristics of the NT and PE groups

Patient characteristics	NT group (n = 11)	PE group (n = 15)	p value
Maternal age (years)	24 (22–27)	23 (19–30)	0.68
Gestational age (weeks)	39.4 (38.1–39.6)	38.6 (38.1–39.5)	0.64
Maternal systolic blood pressure (mmHg)	120 (110–120)	150 (150–155)	<0.0001
Maternal diastolic blood pressure (mmHg)	70 (70–80)	105 (100–110)	<0.0001
Maternal proteinuria (N° of + on dipstick)	Trace	3 (3–3)	—
Parity	2 (1–3)	2 (1–3)	0.86
Newborn birth weight (kg)	3.33 (3.11–3.55)	2.80 (2.40–3.17)	0.01
Newborn SGA (<10th percentile)	0/11	5/15	—
Proportion of female newborns	7/11	5/15	0.13

Values are given as median (interquartile range); SGA = small for gestational age.

small for gestational age (<10th percentile) were found in the NT group whereas in the PE group, five of 15 were small for gestational age.

IGF-I, IGFBPs, leptin, and zinc concentrations in the NT and PE groups. Maternal circulating levels of IGF-I were significantly lower ($p = 0.0008$) in the PE group than in the NT group (Table 2). Furthermore, umbilical cord IGF-I concentrations were significantly lower ($p = 0.02$) in the PE group. As shown in Table 2, no differences were found in maternal and umbilical cord serum concentrations of leptin between NT and PE groups. Maternal and umbilical cord zinc levels as well as zinc in placenta were not significantly different between NT and PE groups (Table 2). To know whether leptin levels were gender-specific, umbilical cord serum leptin concentrations were compared between female and male newborns; no significant differences were observed in the NT [7.6 (5.8–12.6) vs. 4.8 (3.8–7.7) ng/mL] and PE [8.9 (7.1–14.4) vs. 6.7 (1.7–15.0) ng/mL] groups.

Analysis of IGFBPs from pools of maternal and umbilical cord serum from each group is shown in Figure 1. As depicted, WLB analysis of umbilical cord serum showed a group of different bands with an apparent molecular weight between 23 and 43 kDa. These bands corresponded to glycosylated and nonglycosylated forms of IGFBP-3 (42.9 and 39.2 kDa, respectively), IGFBP-2 (34.5 kDa), IGFBP-1

(29.7 kDa), glycosylated IGFBP-4 (29.1 kDa), IGFBP-5 (27.9 kDa), and nonglycosylated IGFBP-4 (23.3 kDa), respectively. In umbilical cord serum of the PE group, WLB analysis showed that the amounts of glycosylated and nonglycosylated forms of IGFBP-3 were 80 and 60% lower, respectively, than in the NT group. In contrast, the amount of IGFBP-1 was threefold higher in umbilical cord serum of PE group when compared with NT group (Figure 1A). In maternal serum, WLB analysis was not able to detect IGFBP-3, IGFBP-4, and IGFBP-5 in both groups and showed an increment of 7.5-fold in IGFBP-1 in PE group when compared with NT group (Figure 1B).

Correlation analysis between concentrations of zinc, IGF-I, and leptin in maternal and umbilical cord serum. Correlation analysis done in the NT and PE groups together showed that maternal and umbilical cord IGF-I concentrations correlated significantly ($\rho = 0.63$, $p = 0.002$) but there was no significant association between maternal and umbilical zinc and leptin levels. When the NT and PE groups were analyzed separately, a significant correlation was observed between maternal and umbilical IGF-I levels ($\rho = 0.61$, $p = 0.02$) in the PE group, but not in the NT group. In addition, there were no significant correlations between maternal and umbilical cord zinc and leptin levels in the NT and PE groups.

Table 2. Maternal and umbilical cord serum concentrations of IGF-I, leptin, and zinc as well as placental zinc concentration of the NT and PE groups

Concentrations	NT group (n = 11)	PE group (n = 15)	p value
Maternal serum IGF-I (ng/mL)	303 (276–364)	198 (153–244)	0.0008
Umbilical cord serum IGF-I (ng/mL)	87 (71–126)	44 (26–98)	0.02
Maternal serum leptin (ng/mL)	20.2 (14.1–31.2)	25.0 (15.5–29.3)	0.96
Umbilical cord serum leptin (ng/mL)	6.4 (5.1–10.2)	8.0 (3.1–14.8)	0.69
Maternal serum zinc (µg/mL)	0.99 (0.84–1.18)	1.10 (0.93–1.38)	0.29
Umbilical cord serum zinc (µg/mL)	1.21 (1.10–1.29)	1.33 (1.21–1.69)	0.07
Placental zinc (µg/g protein)	316 (266–418)	268 (197–375)	0.28

Values are given as median (interquartile range).

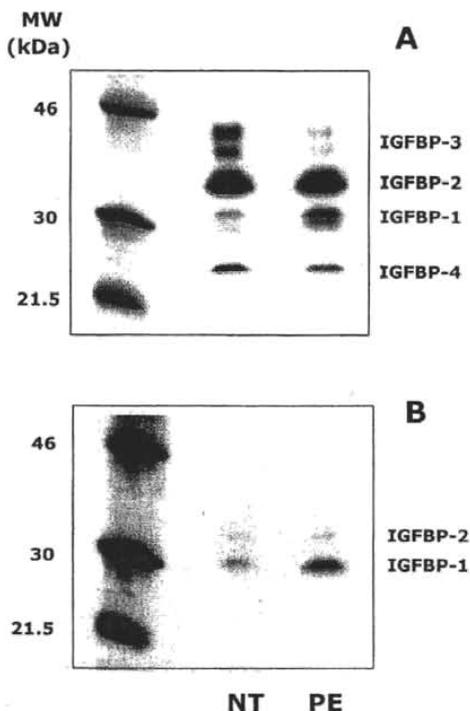


Figure 1. Characterization of IGFFBPs by WLB in umbilical cord (A) and maternal (B) serum pools from 11 NT and 15 PE pregnant women. Molecular weight (MW) markers are shown on the left.

Correlation analysis between newborn birth weights and blood pressure, gestational age, IGF-I, zinc, and leptin. As shown in Figure 2, newborn birth weights correlated significantly with gestational age ($\rho = 0.61, p = 0.002$), and diastolic blood pressure ($\rho = -0.41, p = 0.04$). There was no significant association between newborn birth weights and systolic blood pressure. Figure 3 shows the results of correlation analysis between newborn birth weights and IGF-I, zinc, and leptin. Newborn birth weights correlated significantly with maternal and umbilical cord serum IGF-I concentrations ($\rho = 0.72, p = 0.0003$, and $\rho = 0.79, p < 0.0001$, respectively). Using stepwise multiple regression analysis, newborn birth weight was predicted by umbilical IGF-I ($r^2 = 0.53; p < 0.0001$), umbilical IGF-I, and gestational age ($r^2 = 0.70; p < 0.0001$), umbilical IGF-I, gestational age, and diastolic blood pressure ($r^2 = 0.76; p < 0.0001$), whereas the association between newborn birth weights and maternal IGF-I was excluded. There were no significant associations between newborn birth weights and placental zinc, maternal and umbilical zinc, and leptin levels.

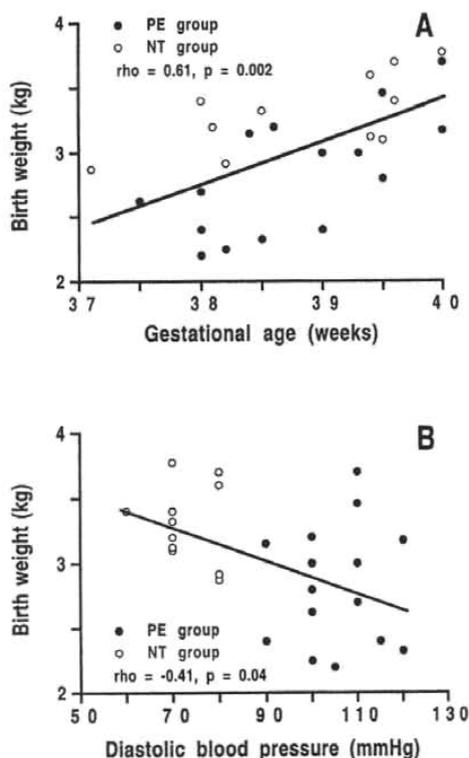


Figure 2. Association between newborn birth weights with gestational age (A) and diastolic blood pressure (B) in the NT and PE groups.

The following results were obtained when the NT and PE groups were analyzed separately. Newborn birth weights correlated significantly with gestational age in the NT ($\rho = 0.63, p = 0.04$) and PE ($\rho = 0.68, p = 0.01$) groups. Newborn birth weights were not associated significantly with systolic and diastolic blood pressure in the NT and PE groups. In the PE group, newborn birth weights correlated significantly with maternal and umbilical cord serum IGF-I concentrations ($\rho = 0.76, p = 0.004$, and $\rho = 0.75, p = 0.005$, respectively), umbilical cord serum leptin levels ($\rho = 0.61, p = 0.02$), and placental zinc concentrations ($\rho = 0.56, p = 0.04$). In this group, newborn birth weights were not associated significantly with maternal and umbilical zinc and with maternal leptin levels. Using stepwise multiple regression analysis, newborn birth weight was predicted by umbilical IGF-I ($r^2 = 0.67; p = 0.0002$) and umbilical IGF-I and gestational age ($r^2 = 0.79; p < 0.0001$), whereas maternal IGF-I, umbilical leptin, and placental zinc were excluded. In

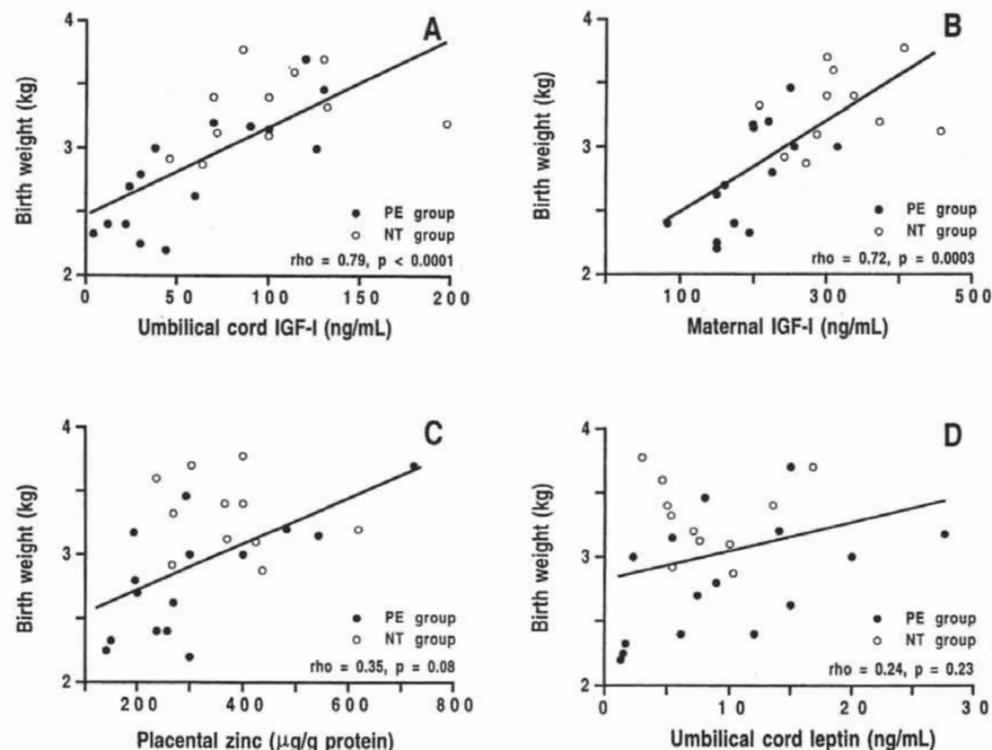


Figure 3. Association between newborn birth weights with umbilical cord IGF-I (A), maternal IGF-I (B), placental zinc (C), and umbilical cord leptin (D) concentrations in the NT and PE groups.

the NT group, there were no significant associations between newborn birth weights and any of the biochemical variables tested.

Correlation analysis between zinc and circulating levels of IGF-I and leptin. Correlation analysis done in the NT and PE groups together showed that placental zinc concentrations correlated positively with maternal and umbilical cord IGF-I levels ($\rho = 0.44$, $p = 0.03$, and $\rho = 0.55$, $p = 0.009$, respectively) and negatively with maternal zinc levels ($\rho = -0.47$, $p = 0.03$). Placental zinc was not associated significantly with maternal and umbilical leptin and with umbilical zinc. There were no significant correlations between maternal or umbilical zinc levels with circulating levels of IGF-I and leptin.

Results of correlations analysis performed in each group showed that placental zinc concentrations correlated with umbilical cord serum IGF-I ($\rho = 0.65$, $p = 0.02$) in the

PE group, whereas in maternal serum this association was not observed. In the NT group, there was no significant correlation between placental zinc with circulating IGF-I levels. There was a significant association between placental zinc concentration and maternal serum leptin levels solely in the NT group ($\rho = 0.64$, $p = 0.04$). There were no significant correlations between maternal or umbilical zinc levels with circulating levels of IGF-I and leptin in both groups.

Discussion

The present study indicates that moderate preeclampsia is associated with low newborn birth weight, IGF-I, IGFBP-3, and high IGFBP-1 without significant changes in zinc and leptin levels. In addition, umbilical IGF-I was the major predictor of newborn birth weight.

Newborn birth weights were lower in the PE group compared with those of the NT group of similar gestational age.

In addition, 33% of newborns of the PE group were small for gestational age. These data confirm intrauterine growth retardation seen in preeclampsia (21,22). Absence of a significant association between systolic or diastolic blood pressure with newborn birth weights in the PE group suggests that intrauterine growth retardation was not influenced by severity of preeclampsia. However, a longer fetal nutritional deficit resulting from an early development of the disease may explain the occurrence of small-for-gestational-age newborns in the PE group.

During normal pregnancy, intrauterine growth retardation has been attributed to low circulating IGF-I levels (5-11). Newborn birth weights of the two groups together positively correlated with maternal and umbilical cord IGF-I levels, indicating that this growth factor is involved in fetal growth. Results of the present study showed a marked reduction of IGF-I levels in maternal and umbilical cord serum of the PE group, which agree with previous studies (23-25). In addition, there was a significant correlation between maternal and umbilical cord IGF-I levels in the PE group, which may be explained by decreased placental IGF-I synthesis. Indeed, preeclampsia is associated by placental alterations (21,22) and placenta is the main extrahepatic site of IGF-I synthesis during pregnancy. On the other hand, umbilical cord IGF-I levels could not be explained by maternal IGF-I concentrations because this growth factor does not cross the placental barrier. Overall, these correlation analyses may indicate that intrauterine growth retardation in preeclampsia may be expected not only when umbilical IGF-I is low, but also when this growth factor is low in maternal circulation. However, this observation deserves to be further investigated.

It is well known that the effects of IGF-I are modulated by its IGF-BPs (45). Under physiologic conditions, 75% of circulating IGF-I is bound to a ternary complex formed by IGF-I, IGF-BP-3, and an acid-labile subunit; 24% is bound to other IGF-BPs, and the remaining 1% circulates as free IGF-I (45). During pregnancy an endogenous, pregnancy-related, serum IGF-BP-3 proteolytic activity is considered a fundamental mechanism to increase IGF-I bioavailability (3,45). In the present study, WLB analysis of these binding proteins from maternal serum was not able to detect IGF-BP-3 in the NT and PE groups. The complete disappearance of maternal IGF-BP-3 in both groups may result in an increase of IGF-I bioavailability, improving anabolic functions during pregnancy. Increased IGF-BP-1 observed in maternal serum of the PE group may result from increased decidual synthesis of this binding protein (24). It has been suggested that increased IGF-BP-1 contributes to restricted placental and therefore to fetal growth (24). The IGF-BP profile obtained from the umbilical cord serum showed low IGF-BP-3 and high IGF-BP-1 amounts in the PE group. Because proteolysis of IGF-BP-3 does not occur in fetal serum (5) and IGF-BP-3 synthesis is IGF-I-dependent (45), decreased IGF-BP-3 may be explained by the low IGF-I levels seen in the

PE group. IGF-I levels could not explain high IGF-BP-1 seen in the umbilical serum of the PE group in that this binding protein is not IGF-I-dependent (45). However, high IGF-BP-1 may be due to the relative hypoxia (46) and decreased nutrient supply as a result of reduced uteroplacental flow seen in preeclampsia (22). Increased IGF-BP-1 seen in the PE group may result in increased IGF-I transport from blood circulation to target cells because this binding protein is able to cross the capillary endothelial barrier (45). However, the expected increase in IGF-I bioavailability appears insufficient to correct the low birth weight observed in preeclampsia. Overall, the results of this study indicated that low birth weight in the PE group was associated with low IGF-I concentrations, low IGF-BP-3, and high IGF-BP-1 amounts in the umbilical cord serum. These alterations may be the result of restricted placental function, thus affecting nutrient supply and normal fetal growth.

Zinc has been mentioned as one of the nutritional factors involved in regulation of IGF-I synthesis and somatic growth. Indeed, zinc deficiency has been associated with low circulating IGF-I concentrations and reduced somatic growth (19,47,48). Furthermore, zinc supplementation in growth-retarded children results in an increase of IGF-I circulating levels with significant changes in growth (49). Similar effects on IGF-I have been obtained with the administration of zinc during pregnancy (50). Although low zinc concentrations have been reported in preeclampsia (31-33), we did not observe significant differences between the NT and PE groups, which agrees with other studies (36). This observation may suggest an absence of zinc deficiency in the PE group. Interestingly, placental zinc concentrations correlated with umbilical cord IGF-I levels and newborn birth weights in the PE group. In addition, correlation analysis carried out in the NT and PE groups together showed that placental zinc concentrations correlated not only with umbilical cord IGF-I but also with maternal IGF-I levels. Observation of a positive correlation between newborn birth weights and maternal and umbilical IGF-I levels suggests that zinc effects on fetal growth may be mediated by IGF-I.

Maternal leptin concentrations have been found high (26-29) or unchanged (26,30) in preeclampsia. Similarly, high (27) or unchanged (28) umbilical cord leptin levels have been reported in preeclampsia. In the present study, maternal and umbilical cord leptin levels were not significantly different between the NT and PE groups. The controversy concerning these data may be due to blood pressure and proteinuria values, in that it has been reported that circulating leptin levels are positively associated with the severity of preeclampsia (26,30). Indeed, in the present as well as in previous studies (26) carried out in moderate preeclampsia, maternal leptin levels were not significantly different between normal and preeclamptic pregnancies. There was no significant correlation between maternal and umbilical cord leptin, which agrees with the previous study (14). In the present study, a positive correlation was ob-

served in the PE group between newborn birth weights and umbilical leptin levels, which is in accordance with previous study (12-18). Umbilical leptin levels could not be considered as a determinant of birth weight but as a consequence of newborn body-mass fat (51). A regulatory effect of zinc on leptin levels has been described (20). The significant correlation between placental zinc concentrations with maternal serum leptin levels in the NT group suggests a modulatory role of this nutrient on leptin metabolism, which may be altered in preeclampsia and therefore deserves to be further investigated.

In summary, the present study indicates that moderate preeclampsia is associated with low newborn birth weight, IGF-I, IGFBP-3, and high IGFBP-1 without significant changes in zinc and leptin levels. Inasmuch as the results of the present study showed that umbilical IGF-I is the major predictor of birth weight, we suggest that low fetal IGF-I is one of the main factors involved in the low birth weight seen in preeclampsia.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants from the National Council of Science and Technology (Conacyt, Mexico, #26238-M), the Latin American Program of Training and Research in Human Reproduction (PLACIRH, Mexico), and the Special Programme of Research, Development, and Research Training in Human Reproduction of the World Health Organization (WHO), Geneva, Switzerland. The authors thank the Hospital General M. Gea González, Mexico City, for blood samples and placenta tissue donation.

References

- Díaz Gómez NM, Domenech Martínez E, Barroso Guerrero F. Trace elements and growth factors in the perinatal period. *An Esp Pediatr* 1996;44:351-356.
- Richter J, Hajek Z, Pfeifer I, Subrt P. Relation between concentration of lead, zinc, and lysozyme in placentas of women with intrauterine foetal growth retardation. *Cent Eur J Public Health* 1999;7:40-42.
- Lassarre C, Hardouin S, Daffos F, Forestier F, Frankenne F, Binoux M. Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in human fetus. Relationships with growth in normal subjects and in subjects with intrauterine growth retardation. *Pediatr Res* 1991;29:219-225.
- Verhaeghe J, Van Bree R, Van Herck R, Laureys J, Bouillon R, Van Assche FA. C-peptide, insulin-like growth factors-I and II, and IGF-binding protein I in umbilical cord serum: correlations with birth-weight. *Am J Obstet Gynecol* 1993;169:89-97.
- Giudice LC, de Zegher F, Gargosky S, Dsupin BA, de las Fuentes L, Crystal RA, Hintz RL, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factors and their binding proteins in the term and preterm human fetus and neonate with normal and extremes of intrauterine growth. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:1548-1555.
- Nieto-Díaz A, Villar J, Matorras-Weining R, Valenzuela-Ruiz P. Intrauterine growth retardation at term: association between anthropometric and endocrine parameters. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1996;75:127-131.
- Ostlund E, Bang P, Hagenas L, Fried G. Insulin like-growth factor I in fetal serum obtained by cordocentesis is correlated with intrauterine growth retardation. *Hum Reprod* 1997;12:840-844.
- Stafaniadis K, Solomou E, Mouzakioti E, Stefanos T, Farmakides G. Comparison of somatomedin-C (SMC/IGF-I), human placental lactogen, and Doppler velocimetry between appropriate and small-for-gestational-age pregnancies. *Clin Exp Obstet Gynecol* 1998;25:20-22.
- Cance-Rouzaud A, Laborie S, Bieth E, Tricoire J, Rolland M, Grandjean H, Rochiccioli P, Tauber M. Growth hormone, insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 are regulated differentially in small-for-gestational-age and appropriate-for-gestational-age neonates. *Biol Neonate* 1998;73:347-355.
- Cianfarani S, Germani D, Rossi P, Rossi L, Germani A, Ossicini C, Zuppa A, Argiro G, Holly JM, Branca F. Intrauterine growth retardation: evidence for the activation of the insulin-like growth factor (IGF)-related growth-promoting machinery and the presence of a cation-independent IGF binding protein-3 proteolytic activity by two months of life. *Pediatr Res* 1998;44:374-380.
- Cianfarani S, Germani D, Rossi L, Argiro G, Boemi S, Lemon M, Holly GM, Branca F. IGF-I and IGF-binding protein-1 are related to cortisol in human cord serum. *Eur J Endocrinol* 1998;138:424-429.
- Shubring C, Kiess W, Englaro P, Rascher W, Dotsch J, Hanitsch S, Atanasio A, Blum WF. Levels of leptin in maternal serum, amniotic fluid, and arterial and venous cord blood: relation to neonatal and placental weight. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1480-1483.
- Ertl T, Funke S, Sarkany I, Szabo I, Rascher W, Blum WF, Sulyok E. Postnatal changes of leptin levels in full-term and preterm neonates: their relation to intrauterine growth, gender and testosterone. *Biol Neonate* 1999;75:167-176.
- Geary M, Pringle PJ, Persaud M, Wilshin J, Hindmarsh PC, Rodeck CH, Brook CG. Leptin concentrations in maternal serum and cord blood: relationship to maternal anthropometry and fetal growth. *Br J Obstet Gynaecol* 1999;106:1054-1060.
- Gómez L, Carrascosa A, Yeste D, Potau N, Rique S, Ruiz-Cuevas P, Almar J. Leptin values in placental cord blood of human newborns with normal intrauterine growth after 30-42 weeks of gestation. *Horm Res* 1999;51:10-14.
- Shaarawy M, el-Mallah SY. Leptin and gestational weight gain: relation of maternal and cord blood leptin to birth weight. *J Soc Gynecol Investig* 1999;6:70-73.
- Shubring C, Siebler T, Kratzsch J, Englaro P, Blum WF, Triep K, Kiess W. Leptin serum concentrations in healthy neonates within the first week of life: relation to insulin and growth hormone levels, skinfold thickness, body mass index and weight. *Clin Endocrinol* 1999;51:199-204.
- Lin KC, Hsu SC, Kuo CH, Zhou JY. Difference of plasma leptin levels in venous and arterial cord blood: relation to neonatal and placental weight. *Kao Hsiung I Hsueh Ko Hsueh Tsa Chih* 1999;15:679-685.
- Ripa S, Ripa R. Zinc and the growth hormone system. *Minerva Med* 1996;87:25-31.
- Mantzoros CS, Prasad AS, Beck FW, Grabowski S, Kaplan J, Adair C, Brewer GJ. Zinc may regulate serum leptin concentrations in humans. *J Am Coll Nutr* 1998;17:270-275.
- National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on high blood pressure in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 2000;183:S1-S22.
- Redman CWG. Current topic: pre-eclampsia and placenta. *Placenta* 1991;12:301-308.
- Halhali A, Bourgues H, Carrillo A, Garabedian M. Lower circulating insulin-like growth factor I and 1,25-dihydroxyvitamin D levels in preeclampsia. *Rev Invest Clin* 1995;47:259-266.
- Giudice LC, Martina NA, Crystal RA, Tazuke S, Druzin M. Insulin-like growth binding protein-1 at the maternal-fetal interface and insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-II, and insulin-like growth factor binding-I in the circulation of women with severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176:751-758.
- Halhali A, Tovar AR, Torres N, Bourgues H, Garabedian M, Larrea F. Preeclampsia is associated with low circulating levels of insulin-like growth factor I and 1,25-dihydroxyvitamin D in maternal and umbilical cord compartments. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1828-1833.

26. Mise H, Sagawa N, Matsumoto T, Yura S, Nanno H, Itoh H, Mori T, Masuzaki H, Hosoda K, Ogawa Y, Nakao K. Augmented placental production of leptin in preeclampsia: possible involvement of placental hypoxia. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83:3225-3229.
27. Kokot F, Wiecek A, Adamczak M, Ulman I, Spiechowicz U, Cieplik J, Mesjasz J. Pathophysiological role of leptin in patients with chronic renal failure, in kidney transplant patients, in patients with essential hypertension, and pregnant women with preeclampsia. *Artif Organs* 1999;23:70-74.
28. McCarthy JF, Misra DN, Roberts JM. Maternal plasma leptin is increased in preeclampsia and positively correlates with fetal cord concentration. *Am J Obstet Gynecol* 1999;180:731-736.
29. Laiuori H, Kaaja R, Koistinen SL, Andersson S, Koivisto V, Ylikorkala O. Leptin during and after preeclamptic or normal pregnancy: its relation to serum insulin and insulin sensitivity. *Metabolism* 2000;49:259-263.
30. Sattar N, Greer IA, Pirwani I, Gibson J, Wallace AM. Leptin levels in pregnancy: marker for fat accumulation and mobilization? *Acta Obstet Gynecol Scand* 1998;77:278-283.
31. Bassiouni BA, Foda AI, Rafci AA. Maternal and fetal plasma zinc in pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1979;9:75-80.
32. Kiiholma P, Paul R, Pakarinen P, Gronroos M. Copper and zinc in pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1984;63:629-631.
33. Zimmerman AW, Dunham BS, Nochimson DJ, Kapla BM, Clive JM, Kunkel SL. Zinc transport in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1984;149:523-529.
34. Brophy MH, Harris NF, Crawford IL. Elevated copper and lowered zinc in the placenta of pre-eclamptics. *Clin Chim Acta* 1985;145:107-111.
35. Adeniyi FA. The implications of hypozincemia in pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1987;66:579-582.
36. Lao TT, Chin RK, Swaminathan R, Mak YT. Plasma and erythrocyte zinc concentrations in pre-eclampsia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1989;30:117-122.
37. Lazebnik N, Kuhnert BR, Kuhner PM. Zinc, cadmium, and hypertension in parturient women. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:437-440.
38. Lemeshow S, Hosmer DW, Klar J, Lwanga SK. Sample size for continuous response variables. In: World Health Organization, editor. *Adequacy of sample size in health studies*. New York: John Wiley & Sons; 1990. pp. 36-40.
39. Lubchenco LO, Hansman C, Dressler M, Boyd E. Intrauterine growth as estimated from liveborn birth-weight data at 24 to 42 week of gestation. *Pediatrics* 1963;79:3-800.
40. Capurro H, Konichezky S, Fonseca D, Caldeyro-Barcia R. A simplified method for diagnosis of gestational age in the newborn infant. *J Pediatr* 1978;93:120-122.
41. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
42. Daughaday WH, Mariz IK, Blethen SL. Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites: a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol-extracted serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;51:781-788.
43. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
44. Hossenlopp P, Seurin D, Segovia-Quinson B, Hardouin S, Binoux M. Analysis of serum insulin-like growth factor binding proteins using Western blotting: use of the method for titration of binding proteins and competitive binding studies. *Anal Biochem* 1986;154:138-143.
45. Jones JJ, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995;16:3-34.
46. Tazuke SI, Mazure NM, Sugawara J, Carland G, Faessen GH, Suen LF, Irwin JC, Powell DR, Giaccia AJ, Giudice LC. Hypoxia stimulates insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) gene expression in HepG2 cells: a possible model for IGFBP-1 expression in fetal hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:10188-10193.
47. Roth HP, Kirchgessner M. Influence of alimentary zinc deficiency on the concentration of growth hormone (GH), insulin-like growth factor I (IGF-I) and insulin in the serum of force-fed rats. *Horm Metab Res* 1994;26:404-408.
48. Ninh NX, Thissen JP, Maiter D, Adam E, Mulumba N, Ketelslegers JM. Reduced liver insulin-like growth factor-I gene expression in young zinc-depleted rats is associated with a decrease in liver growth hormone (GH) receptors and serum GH-binding protein. *J Endocrinol* 1995;144:449-456.
49. Ninh NX, Thissen JP, Collette L, Gerard G, Khoi HH, Ketelslegers JM. Zinc supplementation increases growth and circulating insulin-like growth factor I (IGF-I) in growth-retarded Vietnamese children. *Am J Clin Nutr* 1996;63:514-519.
50. Nishiyama S, Kiwaki K, Miyazaki Y, Hasuda T. Zinc and IGF-I concentrations in pregnant women with anemia before and after supplementation with iron and/or zinc. *J Am Coll Nutr* 1999;18:261-267.
51. Mantzoros CS, Moschos SJ. Leptin: in search of role(s) in human physiology and pathophysiology. *Clin Endocrinol* 1998;49:551-567.

Papel fisiológico del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 y sus proteínas transportadoras durante el embarazo

Eulises Díaz Díaz,* Raúl Pichardo-Bahena,** Fernando Larrea Gallo,* Ali Halhali Baghdad*

Resumen

El factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) y sus proteínas transportadoras (IGFBPs), desempeñan un papel importante en la regulación del crecimiento fetal. Estos factores proteínicos son producidos virtualmente por todos los órganos fetales desde el desarrollo temprano y son potentes estimuladores de la división y la diferenciación celular. Esta revisión está encaminada a discutir algunos aspectos generales del papel fisiológico del IGF-I y sus IGFBPs durante el embarazo, la regulación de las acciones biológicas del IGF-I por sus IGFBPs y las alteraciones de estos factores durante el retraso del crecimiento intrauterino y la preeclampsia.

Palabras clave: IGF-I, IGFBPs, GH placentaria, hPL, crecimiento fetal.

Introducción

Durante la gestación se establece una interrelación morfológica y fisiológica entre la madre y el feto en desarrollo. Esta interrelación es finamente regulada por factores hormonales que regulan el metabolismo materno, el funcionamiento óptimo de la placenta y garantizan el crecimiento adecuado del feto en desarrollo. Entre estos factores hormonales podemos citar al IGF-I y sus IGFBPs. Estos factores proteínicos son producidos virtualmente por todos los órganos fetales desde etapas muy tempranas del desarrollo y son potentes estimuladores de la división y la diferenciación celular. El IGF-I es el factor de crecimiento que mejor se correlaciona con el peso del feto en desarrollo a lo largo de la gestación; observándose alteraciones en sus concentraciones circulantes en condiciones en las cuales el crecimiento fetal se ve comprometido. Esta revisión

Abstract

Insulin-like growth factor I (IGF-I) and its binding proteins (IGFBPs), have a very important role in the regulation of fetal growth. These protein factors are produced virtually by all fetal organs since early development and are powerful stimulators of cellular division and differentiation. The objective of this review is discuss about the physiological role of IGF-I and its IGFBPs during pregnancy, the regulation of the biological actions of IGF-I by its IGFBPs, and the alterations of this factors during the intrauterine growth retardation and preeclampsia.

Key words: IGF-I, IGFBPs, placental GH, hPL, fetal growth.

está encaminada a discutir algunos aspectos generales del papel fisiológico del IGF-I y sus IGFBPs durante el embarazo, la regulación de las acciones biológicas del IGF-I por sus IGFBPs y las alteraciones de estos factores durante el retraso del crecimiento intrauterino y la preeclampsia.

IGF-I e IGFBPs

El factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-I, del inglés Insulin-Like Growth Factor-I), así como sus 6 proteínas transportadoras conocidas como IGFBPs (del inglés Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins) son proteínas de secreción, por lo que comparten los mismos mecanismos de biosíntesis y secreción de otras proteínas tales como albúmina, enzimas pancreáticas e insulina.

Regulación de la expresión génica de IGF-I y sus IGFBPs

El gen que codifica para IGF-I se encuentra localizada en el brazo largo del cromosoma 12.¹ Los genes que codifican para IGFBP-1 y para IGFBP-3 están localiza-

* Departamento de Biología de la Reproducción. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" (INCMNSZ). México, D.F.

** Departamento de Anatomía Patológica. Fundación Clínica Médica Sur. México, D.F.

dos en el brazo corto del cromosoma 7, ambos están asociados con el gen HOX A; los que codifican para IGFBP-2 y para IGFBP-5 están localizados en el brazo largo del cromosoma 2, asociados con el gen HOX D, el que codifica para IGFBP-4 se encuentra en el brazo largo del cromosoma 17, asociado con el gen HOX B y el que codifica para IGFBP-6 en el cromosoma 12 asociado con el gen HOX C.²

El IGF-I es una hormona de naturaleza peptídica de bajo peso molecular, que es expresada por todos los tejidos adultos y fetales desde las primeras etapas de la vida. El gen del IGF-I abarca más de 45 kb del ADN genómico y está conformado por 6 exones y 5 intrones y posee al menos dos sitios promotores.³ Se han descrito varios transcritos (ARNm) del gen producido por cortes y empalmes alternativos de los diferentes exones que lo conforman^{3,4} (Figura 1). Debido a que las tallas moleculares reportadas por los diferentes autores no siempre coinciden, se han utilizado intervalos para su detección que van desde 0.9-1.2, 1.5-1.9, 4.7 y 7-7.5 kb. Todos estos transcritos producen, al final del proceso de maduración, un único producto proteínico de 7.6 kDa con estructura muy similar a la de la proinsulina. Al igual que la proinsulina, el IGF-I está formado por una cadena polipeptídica simple y posee tres puentes disulfuros intracatenarios. Tanto el IGF-I como la proinsulina poseen regiones hidrofóbicas idénticas, asimismo, las cadenas A y B del IGF-I son muy similares a las de la insulina.⁵

La expresión del IGF-I y de sus IGFbps es regulada por factores hormonales tales como la hormona del crecimiento (GH) los esteroides sexuales, las hormonas tiroideas y la insulina. Los factores nutricionales como el consumo de proteínas, energía y micronutrientes como el zinc (Zn) son también importantes reguladores de su síntesis.^{6,7}

El IGF-I puede tener acciones endocrinas, paracrina y autocrinas.^{8,9} La presencia de dos sitios promotores en el gen del IGF-I garantiza la expresión diferencial que ocurre entre el hígado y el resto de los tejidos. Se han descrito dos tipos fundamentales de transcritos (ARNm) del IGF-I, identificados como uno en el tejido hepático y el otro en el resto de tejidos, los cuales codifican para el mismo péptido maduro. Estos ARNm contienen diferentes regiones 5' no traducible debido al uso de diferentes sitios de iniciación en el exón 1 o en el exón 2. Los transcritos a partir del exón 2 son producidos por el hígado, son regulados fundamentalmente por la GH, la ingesta de proteínas y energía, así como los micronutrientes tales como el Zn. Su producto proteínico está destinado a cumplir las funciones endocrinas del IGF-I. Los transcritos producidos a partir del exón 1 se encuentran en todos los tejidos extrahepáticos y su regulación no es por GH; en su

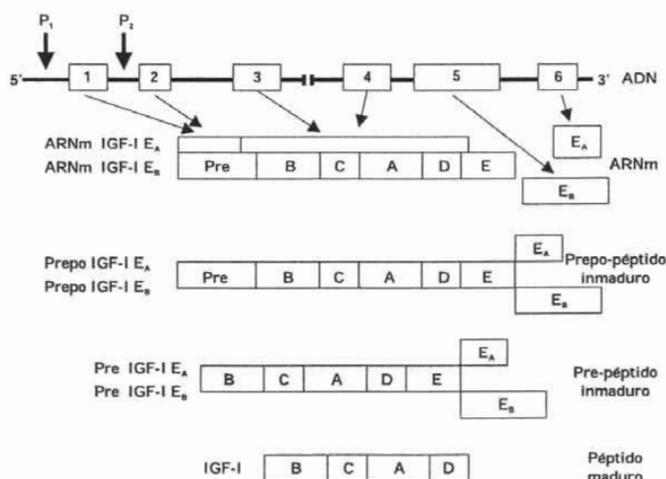


Figura 1. Representación esquemática del procesamiento del gen IGF-I. Se muestra la distribución de los exones y los intrones, los dos sitios promotores (P₁ y P₂), la región del péptido señal (Pre), los dominios A-E y la forma final de IGF-I maduro conteniendo los dominios A-D [Adaptado de Rotwein P. Structure, evolution, expression and regulation of insulin-like growth factors I and II. *Growth Factors* 1991; 5(1): 3-18].

lugar otras hormonas tales como los estrógenos sexuales y las hormonas tiroideas son las reguladoras fundamentales. El IGF-I producido en los tejidos extrahepáticos desempeña funciones autocrina-paracrina¹⁰ (Figura 1).

Durante la vida posnatal, el hígado representa la fuente de mayor producción de IGF-I y de sus IGF-BPs, y su síntesis está regulada por el estado nutricional y la GH, quien promueve la transcripción del gen del IGF-I¹¹ y de algunas de sus IGF-BPs, fundamentalmente de la IGF-BP-3.² Los factores nutricionales como el aporte energético, proteínico y de Zn están también involucrados en la regulación de la síntesis del IGF-I y de sus IGF-BPs, así como del crecimiento.^{6,7,12} El Zn es considerado como un factor de crecimiento, lo cual ha sido ampliamente comprobado, ya que la administración de este nutriente a niños desnutridos estimula el crecimiento y se asocia con un incremento en los niveles de IGF-I.¹³ En experimentación animal, se ha demostrado que el Zn aumenta la expresión de IGF-I y modifica la producción de sus IGF-BPs.¹⁴ También se ha visto que la suplementación con IGF-I no es eficiente para garantizar el crecimiento en condiciones de deficiencia de Zn.¹⁵

Síntesis y regulación de IGF-I durante el embarazo

Como hemos mencionado, la síntesis del IGF-I y de sus IGF-BPs es regulada por factores hormonales como la GH, las hormonas tiroideas, la insulina y por factores nutricionales como el consumo de proteínas, energía y micronutrientes como el Zn.^{6,7}

Durante el embarazo, la producción hipofisaria de GH está disminuida, mientras que la concentración de IGF-I aumenta a lo largo del embarazo, alcanzándose las mayores concentraciones al final del embarazo. Este aumento se asocia al incremento en la síntesis de GH placentaria cuya estructura es muy similar a la hipofisaria pero es codificada por un gen diferente.¹⁶⁻¹⁸ La GH placentaria es secretada a la circulación materna, donde ejerce un efecto importante en la estimulación de la producción hepática de IGF-I en la madre. En el compartimiento fetal la GH placentaria no presenta efectos ya que no es capaz de cruzar la barrera placentaria. En el compartimiento materno, el IGF-I estimula los procesos anabólicos, lo que resulta en el aumento del tejido graso y del glucógeno hepático.¹⁶⁻¹⁸ La secreción de GH placentaria a la circulación materna es menor en mujeres embarazadas con retraso del crecimiento intrauterino. Lo anterior resulta en una menor producción hepática de IGF-I y por tanto en la dis-

minución de los procesos anabólicos, lo que garantiza una mayor disponibilidad de nutrientes en la circulación materna para ser transportados hacia el feto en crecimiento bajo condiciones desfavorables. Sin embargo, este mecanismo compensatorio no es suficiente para garantizar el adecuado crecimiento fetal, lo que sugiere la participación de otros factores.

Otro factor hormonal involucrado en la regulación de la síntesis del IGF-I durante el embarazo es el lactógeno placentario humano (hPL).¹⁸ El lactógeno placentario humano, la hormona proteínica más abundantemente producida por la placenta pasa a la circulación materna y fetal, donde desempeña diversos papeles. En la circulación materna, el hPL presenta un efecto anti-insulínico, lo que induce a la acumulación de nutrientes en la circulación materna, los cuales pueden ser transportados preferentemente hacia el feto a través de la placenta.¹⁷ En la circulación fetal, el hPL estimula la síntesis de IGF-I y de glucógeno hepático, además de estimular el crecimiento fetal al unirse a receptores tipo lactogénicos.¹⁸

Síntesis de IGF-I durante la vida posnatal

En los primeros días posteriores al nacimiento, las concentraciones de IGF-I disminuyen con respecto a las concentraciones encontradas en la circulación fetal al final del embarazo. En los días posteriores al parto, las concentraciones circulantes de IGF-I aumentan y siguen incrementándose a lo largo de toda la niñez, alcanzando niveles máximos en la pubertad, lo que coincide con el incremento de los esteroides sexuales. A partir de los 25 años de edad y hasta los 60, las concentraciones séricas de IGF-I se mantienen constantes, observándose una disminución en dichas concentraciones a partir de los 60 años de edad.¹⁹

Transporte de IGF-I en la circulación

Después de ser sintetizado, el IGF-I es liberado a la circulación donde es transportado por sus IGF-BPs. Solamente el 1% del IGF-I circula en forma libre ya que el 75% circula unido a la IGF-BP-3, formando un complejo macromolecular que no puede atravesar el endotelio vascular, aumentando su vida media de 10 minutos cuando está libre a 15 horas cuando está unido a la IGF-BP-3. El otro 24% se encuentra unido al resto de las IGF-BPs, fundamentalmente a la IGF-BP-1 e IGF-BP-2 que son de menor tamaño y sí son capaces de atravesar el endotelio vascular.²

Funciones biológicas del IGF-I

El IGF-I es capaz de estimular el crecimiento del cartílago, la síntesis de ARN, de ADN y de proteínas; así como de estimular procesos anabólicos. Durante el embarazo, estimula la división celular y el crecimiento de los tejidos maternos, a la vez que estimulan los procesos anabólicos que dan como resultado el incremento del tejido graso, de las reservas de glucógeno hepático, así como el desarrollo de las glándulas mamarias entre otras modificaciones. En esencia el IGF-I tiene efectos similares a los de la insulina sobre el músculo y la placenta al estimular el transporte de aminoácidos y glucosa, así como inhibir la lipólisis en el tejido adiposo. Por otra parte, el IGF-I juega un papel importante en el crecimiento como lo demuestra la estrecha correlación entre las concentraciones circulantes de este factor y la velocidad de crecimiento de los niños.²⁰

Regulación de la actividad biológica del IGF-I por sus IGFBPs

Es bien conocido que los efectos del IGF-I son modulados por sus IGFBPs.² Para que el IGF-I pueda ejercer su efecto anabólico y estimular el crecimiento y maduración

fetal, es necesario que éste pase del torrente sanguíneo hacia el espacio extravascular y se ponga en contacto con su receptor específico sobre la superficie de sus células blanco. Para que esto ocurra son necesarios dos procesos: que el IGF-I se libere de la IGFBP-3, la que es considerada el reservorio biológico de IGF-I en la circulación, que por su tamaño no puede atravesar el endotelio vascular, esto se logra a través de la degradación enzimática de la IGFBP-3, produciendo una disminución entre 20-30 veces de su afinidad por el IGF-I, lo que se traduce en mayor concentración de IGF-I libre²¹ (Figura 2). Durante el embarazo se produce un incremento en la proteólisis de la mayoría de las proteínas transportadoras del IGF-I, fundamentalmente de la IGFBP-3. Se ha observado que el nivel de proteólisis de la IGFBP-3 es más marcado en mujeres con embarazo múltiple o en condiciones de insuficiencia útero-placentaria, donde la demanda fetal de IGF-I es mayor.²² Este fenómeno de proteólisis ha sido ampliamente descrito en el suero materno,^{23,24} pero parece también producirse en alguna medida en el suero proveniente de fetos con retraso en el crecimiento intrauterino, sin embargo, la regulación del ensamblaje de la IGFBP-3 con su subunidad sensible a condiciones ácidas, parece ser la forma fundamental de regular la concentración de IGFBP-3 en la circulación fetal.²⁵

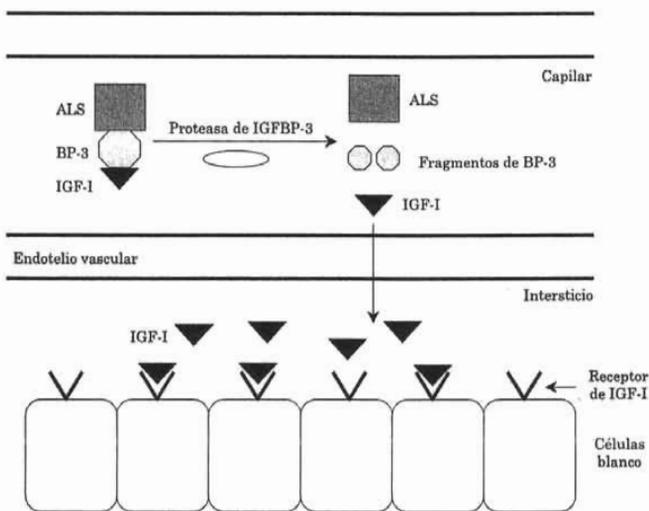


Figura 2. Representación esquemática del mecanismo de regulación de la actividad biológica del IGF-I por la IGFBP-3. Se muestra el transporte de IGF-I, la degradación enzimática de la IGFBP-3 y la liberación del IGF-I, quien atraviesa el endotelio vascular y se pone en contacto con su receptor específico. ALS (acid-labile subunit), BP-3 (binding protein-3), IGF-I (insulin-like growth factor I), ALS+BP-3+IGF-I (complejo ternario: forma en que circula el 75% del IGF-I).

Otro mecanismo para modular la actividad biológica del IGF-I, es su transporte desde el torrente sanguíneo hasta el espacio intersticial por proteínas transportadoras de bajo peso molecular como las IGFBP-1, 2 y 4, las cuales son capaces de atravesar el endotelio vascular^{26,27} (Figura 3) y ponerse en contacto con la superficie de las células blanco como lo hace la IGFBP-1 a través de su receptor de tipo $\alpha 5\beta 1$ -integrina, lo que genera por un lado la acumulación de IGF-I sobre la superficie de las células blanco, a la vez que se producen cambios conformacionales en la molécula de IGFBP-1 que induce una disminución de la afinidad por el IGF-I, liberándose éste, pudiendo interaccionar con su receptor específico y ejercer su efecto estimulador sobre el crecimiento²⁸ (Figura 3). Por otro lado, se ha descrito que la unión de la IGFBP-1 a su receptor de tipo $\alpha 5\beta 1$ -integrina estimula el crecimiento de manera similar a la ejercida por el IGF-I.^{29,30} Existen varios reportes del efecto potenciador de la IGFBP-1 sobre las funciones del IGF-I.^{31,32} No obstante, otros reportes también han demostrado un efecto inhibitorio de la IGFBP-1 sobre la respuesta celular a IGF-I *in vitro*.³³⁻³⁵

Relación entre IGF-I, IGFBPs y el retraso del crecimiento fetal

Durante el embarazo, el IGF-I y sus IGFBPs son importantes para el crecimiento y diferenciación tanto de

los tejidos maternos como fetales. Desde etapas muy tempranas del desarrollo, tanto la placenta como el resto de los tejidos fetales producen estos péptidos y expresan sus receptores específicos.^{9,36-40} Las concentraciones de IGF-I tanto fetal^{41,42} como maternas,⁴³ aumentan a lo largo del embarazo y al final del embarazo su concentración correlaciona positivamente con el peso al nacer.^{42,44,45}

Los recién nacidos que han sufrido de retraso del crecimiento intrauterino, como ocurre bajo condiciones nutricionales desfavorables, presentan menores concentraciones circulantes de IGF-I e IGFBP-3 y mayores concentraciones de IGFBP-1 que los recién nacidos con peso adecuado para la edad gestacional.⁴⁶ De manera similar, estudios recientes han descrito una menor concentración de IGF-I tanto en la circulación materna como del cordón umbilical,⁴⁷⁻⁴⁹ así como alteraciones en las concentraciones circulantes de la IGFBP-1 y de la IGFBP-3 durante el embarazo complicado con preeclampsia, enfermedad hipertensiva inducida por el embarazo que se caracteriza por la presencia de retraso del crecimiento intrauterino.^{48,50}

La IGFBP-1 es la proteína transportadora predominante en el fluido amniótico³⁷ y una de las más abundantes en el plasma fetal.^{38,51} La IGFBP-1 se incrementa a lo largo del embarazo en la circulación materna⁵² y fetal^{45,53} y al final del embarazo su concentración se asocia negativamente con el peso al nacer, lo que sugiere un

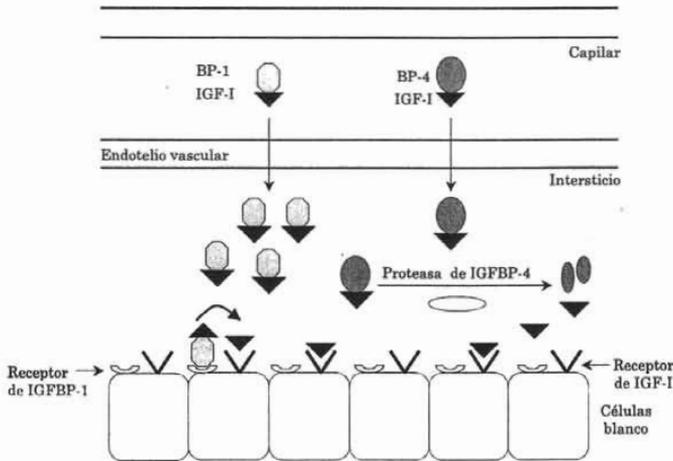


Figura 3. Representación esquemática del transporte de IGF-I por proteínas transportadoras de bajo peso molecular. La IGFBP-1 interacciona con su receptor específico y pierde afinidad por el IGF-I. La IGFBP-4 sufre un ataque proteolítico y pierde afinidad por el IGF-I. A través de ambos mecanismos se facilita la interacción del IGF-I con su receptor específico.

papel inhibitorio sobre el crecimiento fetal y un modulador local de la acción del IGF-I. El grado de fosforilación de la IGFBP-1 afecta la afinidad por el IGF-I, siendo las más fosforiladas las de mayor afinidad. Durante la vida posnatal, la IGFBP-1 se sintetiza y se mantiene en circulación como una única isoforma altamente fosforilada. Durante el embarazo, la IGFBP-1 de origen decidual y hepático se sintetiza también como una isoforma única altamente fosforilada. Sin embargo, en la circulación materna, fetal y el líquido amniótico la IGFBP-1 sufre cambios ya que se encuentra como una mezcla de isoformas altamente fosforiladas, de menor grado de fosforilación y desfosforiladas.³⁴ Las isoformas que presentan menor grado de fosforilación tienen menor afinidad por el IGF-I y potencian los efectos biológicos del IGF-I, mientras que las isoformas altamente fosforiladas de la IGFBP-1 inhiben la actividad biológica del IGF-I.^{55,56}

En 1998, Iwashita y col.⁵⁷ demostraron que los recién nacidos con bajo peso al nacer poseen igual cantidad de la forma no fosforilada de la IGFBP-1 que los recién nacidos con peso adecuado para la edad gestacional, pero la cantidad de la forma altamente fosforilada era mayor por lo que la relación isoforma no fosforilada/IGFBP-1 total era menor en los recién nacidos con bajo peso al nacer para la edad gestacional, lo que sugiere que no solamente la cantidad total de IGFBP-1 sino que la proporción de isoformas con diferentes grados de fosforilación son importantes para la regulación del crecimiento fetal.

Conclusión

El factor de crecimiento similar a la insulina tipo I, es el factor de crecimiento que mejor correlaciona con el crecimiento fetal a lo largo de toda la gestación. Esta relación estrecha entre el IGF-I y el crecimiento fetal se debe al papel que este factor hormonal desempeña en la modulación del metabolismo materno, en la estimulación del crecimiento y diferenciación de la placenta y en la estimulación del transporte de nutrientes a través de la misma, lo que a su vez garantiza el adecuado crecimiento del feto en desarrollo. No solamente las concentraciones de IGF-I son importantes para modular el crecimiento placentario y fetal, sino también sus proteínas transportadoras las que modulan las acciones biológicas del IGF-I. El retraso del crecimiento intrauterino asociado a la desnutrición proteica-energética y la preeclampsia, son dos condiciones patológicas en las cuales se produce un retraso del cre-

cimiento intrauterino asociado con alteraciones en las concentraciones circulantes del IGF-I y de sus IGFBPs.

Referencias

1. Rotwein P, Pollock KM, Didier DK, Krivi GG. Organization and sequence of the human insulin-like growth factor I gene. Alternative RNA processing produces two insulin-like growth factor I precursor peptides. *J Biol Chem* 1986; 261: 4828-4832.
2. Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995; 16: 3-34.
3. Rotwein P. Structure, evolution, expression and regulation of insulin-like growth factors I and II. *Growth Factors* 1991; 5: 3-18.
4. Daughaday WH, Rotwein P. Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev* 1989; 10: 68-91.
5. Rinderknecht E, Humbel RE. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 1978; 253: 2769-2776.
6. Ketelslegers JM, Maiter D, Maes M, Underwood LE, Thissen JP. Nutritional regulation of insulin-like growth factor-I. *Metabolism* 1995; 44: 50-57.
7. Tovar AR, Halhali A, Torres N. Effect of nutritional rehabilitation of undernourished rats on serum insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding proteins. *Rev Invest Clin* 1999; 51: 99-106.
8. D'Ercole AJ, Stiles AD, Underwood LE. Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 935-939.
9. Fant M, Munro H, Moses AC. An autocrine/paracrine role for insulin-like growth factors in the regulation of human placental growth. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63: 499-505.
10. LeRoith D, Roberts CT Jr. Insulin-like growth factor I (IGF-I): a molecular basis for endocrine versus local action? *Mol Cell Endocrinol* 1991; 77: 57-61.
11. Emler CA, Schalch DS. Nutritionally-induced changes in hepatic insulin-like growth factor I (IGF-I) gene expression in rats. *Endocrinology* 1987; 120: 832-834.
12. Clegg MS, Keen CL, Donovan SM. Zinc deficiency-induced anorexia influences the distribution of serum insulin-like growth factor-binding proteins in the rat. *Metabolism* 1995; 44: 1495-1501.
13. Ninh NX, Thissen JP, Collette L, Gerard G, Khol HH, Ketelslegers JM. Zinc supplementation increases growth and circulating insulin-like growth factor I (IGF-I) in growth-retarded Vietnamese children. *Am J Clin Nutr* 1996; 63: 514-519.
14. Lee WH, Gaylord TD, Bowsler RR, Hlaing M, Moorehead H, Liechty EA. Nutritional regulation of circulating insulin-like growth factors (IGFs) and their binding proteins in the ovine fetus. *Endocr J* 1997; 44: 163-173.
15. Cha MC, Rohhani A. Failure of IGF-I infusion to promote growth in Zn deficient hypophysectomized rats. *J Trace Elem Med Biol* 1998; 12: 141-147.
16. Alsat E, Guibourdenche J, Couturier A, Evain-Brion D. Physiological role of human placental growth hormone. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 140: 121-127.

17. Greenspan FS, Gardner DG. Endocrinología del embarazo, in *Endocrinología Básica y Clínica*. 5ª Edición, Manual Moderno. México, D.F. 2003; 639-660.
18. Handwerker S, Freemark M. The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000; 13: 343-356.
19. Tirapegui J, Fukushima SE, Grimaldi C. Growth, somatomedin and nutrition. *Arch Latinoam Nutr* 1993; 43: 94-104.
20. Clemmons DR, Busby WH, Arai T, Nam TJ, Clarke JB, Jones JJ, Ankrap D. Role of insulin-like growth factor binding proteins in the control of IGF actions. *Prog Growth Factor Res* 1995; 6: 357-366.
21. Binoux M, Lalou C, Lassarre C, Blat C, Hossenlopp P. Limited proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3): a physiological mechanism in the regulation of IGF bioavailability. *Adv Exp Med Biol* 1993; 343: 293-300.
22. Lassarre C, Hardouin S, Daffos F, Forestier F, Franckne F, Binoux M. Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in the human fetus. Relationships with growth in normal subjects and in subjects with intrauterine growth retardation. *Pediatr Res* 1991; 29: 219-225.
23. Hossenlopp P, Segovia B, Lassarre C, Roghani M, Bredon M, Binoux M. Evidence of enzymatic degradation of insulin-like growth factor-binding proteins in the 150K complex during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71: 797-805.
24. Giudice LC, Farrell EM, Pham H, Lamson G, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factor binding proteins in maternal serum throughout gestation and in the puerperium: effects of a pregnancy-associated serum protease activity. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71: 806-816.
25. Bang P, Stangenberg M, Westgren M, Rosenfeld RG. Decreased ternary complex formation and predominance of a 29 kDa IGFBP-3 fragment in human fetal serum. *Growth Regul* 1994; 4: 68-76.
26. Bar RS, Boes M, Clemmons DR, Busby WH, Sandra A, Dake BL, Booth BA. Insulin differentially alters transcapillary movement of intravascular IGFBP-1, IGFBP-2 and endothelial cell IGF-binding proteins in the rat heart. *Endocrinology* 1990; 127: 497-499.
27. Bar RS, Clemmons DR, Boes M, Busby WH, Booth BA, Dake BL, Sandra A. Transcapillary permeability and subendothelial distribution of endothelial and amniotic fluid insulin-like growth factor binding proteins in the rat heart. *Endocrinology* 1990; 127: 1078-1086.
28. Jones JJ, Gockerman A, Busby WH, Jr., Wright G, Clemmons DR. Insulin-like growth factor binding protein 1 stimulates cell migration and binds to the alpha 5 beta 1 integrin by means of its Arg-Gly-Asp sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 10553-10557.
29. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69: 11-25.
30. Jones JJ, Doerr ME, Clemmons DR. Cell migration: interactions among integrins, IGFs and IGFBPs. *Prog Growth Factor Res* 1995; 6: 319-327.
31. Elgin RG, Busby WH Jr., Clemmons DR. An insulin-like growth factor (IGF) binding protein enhances the biologic response to IGF-I. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 3254-3258.
32. Busby WH, Hossenlopp P, Binoux M, Clemmons DR. Purified preparations of the amniotic fluid-derived insulin-like growth factor-binding protein contain multimeric forms that are biologically active. *Endocrinology* 1989; 125: 773-777.
33. Rutanen EM, Pekonen F, Makinen T. Soluble 34K binding protein inhibits the binding of insulin-like growth factor I to its cell receptors in human secretory phase endometrium: evidence for autocrine/paracrine regulation of growth factor action. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66: 173-180.
34. Liu L, Brinkman A, Blat C, Harel L. IGFBP-1, an insulin like growth factor binding protein, is a cell growth inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 174: 673-679.
35. Lewitt MS, Denyer GS, Cooney GJ, Baxter RC. Insulin-like growth factor-binding protein-1 modulates blood glucose levels. *Endocrinology* 1991; 129: 2254-2256.
36. Marshall RN, Underwood LE, Voina SJ, Foushee DB, Van Wyk JJ. Characterization of the insulin and somatomedin-C receptors in human placental cell membranes. *J Clin Endocrinol Metab* 1974; 39: 283-292.
37. Drop SL, Kortleve DJ, Guyda HJ. Isolation of a somatomedin-binding protein from preterm amniotic fluid. Development of a radioimmunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 59: 899-907.
38. Drop SL, Kortleve DJ, Guyda HJ, Posner BI. Immunoassay of a somatomedin-binding protein from human amniotic fluid: levels in fetal, neonatal, and adult sera. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 59: 908-915.
39. Han VK, Lund PK, 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: 422-429.
40. 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 fetomaternal interface. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 2680-2693.
41. Gluckman PD, Johnson-Barrett JJ, Butler JH, Edgar BW, Gunn TR. Studies of insulin-like growth factor -I and -II by specific radioligand assays in umbilical cord blood. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1983; 19: 405-413.
42. Ashton IK, Zapf J, Einschenk I, MacKenzie IZ. Insulin-like growth factors (IGF) 1 and 2 in human foetal plasma and relationship to gestational age and foetal size during midpregnancy. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1985; 110: 558-563.
43. Hall K, Enberg G, Hellem E, Lundin G, Ottosson-Seeberger A, Sara V, Trygstad O, Olverholm U. Somatomedin levels in pregnancy: longitudinal study in healthy subjects and patients with growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 59: 587-594.
44. Hall K, Hansson U, Lundin G, Luthman M, Persson B, Pova G, Stangenberg M, Olverholm U. Serum levels of somatomedins and somatomedin-binding protein in pregnant women with type I or gestational diabetes and their infants. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 63: 1300-1306.
45. Verhaeghe J, Van Bree R, Van Herck E, Laureys J, Bouillon R, Van Assche FA. C-peptide, insulin-like growth factors I and II, and insulin-like growth factor binding protein-1 in umbilical cord serum: correlations with birth weight. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169: 89-97.
46. Giudice LC, de Zegher F, Gargosky SE, Dsupin BA, de las Fuentes L, Crystal RA, Hintz RL, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factors and their binding proteins in the term and preterm human fetus and neonate with normal and extremes of intrauterine growth. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 1548-1555.
47. Halhail A, Bourges H, Carrillo A, Garabedian M. Lower circulating insulin-like growth factor I and 1,25-dihydroxyvitamin D levels in preeclampsia. *Rev Invest Clin* 1995; 47: 259-266.

48. Halhali A, Tovar AR, Torres N, Bourges H, Garabedian M, Larrea F. Preeclampsia is associated with low circulating levels of insulin-like growth factor I and 1,25-dihydroxyvitamin D in maternal and umbilical cord compartments. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 1828-1833.
49. Diaz E, Halhali A, Luna C, Diaz L, Avila E, Larrea F. Newborn birth weight correlates with placental zinc, umbilical insulin-like growth factor I, and leptin levels in preeclampsia. *Arch Med Res* 2002; 33: 40-47.
50. Giudice LC, Martina NA, Crystal RA, Tazuke S, Druzin M. Insulin-like growth factor binding protein-1 at the maternal-fetal interface and insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-II, and insulin-like growth factor binding protein-1 in the circulation of women with severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 176: 751-757.
51. Wang HS, Chard T. Chromatographic characterization of insulin-like growth factor-binding proteins in human pregnancy serum. *J Endocrinol* 1992; 133: 149-159.
52. Howell RJ, Perry LA, Choglay NS, Bohn H, Chard T. Placental protein 12 (PP12): a new test for the prediction of the small-for-gestational-age infant. *Br J Obstet Gynaecol* 1985; 92: 1141-1144.
53. Wang HS, Lim J, English J, Irvine L, Chard T. The concentration of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-1 in human umbilical cord serum at delivery: relation to fetal weight. *J Endocrinol* 1991; 129: 459-464.
54. Westwood M, Gibson JM, Davies AJ, Young RJ, White A. The phosphorylation pattern of insulin-like growth factor-binding protein-1 in normal plasma is different from that in amniotic fluid and changes during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 1735-1741.
55. Jones JI, D'Ercole AJ, Camacho-Hubner C, Clemmons DR. Phosphorylation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 1 in cell culture and *in vivo*: effects on affinity for IGF-I. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 7481-7485.
56. Yu J, Iwashita M, Kudo Y, Takeda Y. Phosphorylated insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-1 (IGFBP-1) inhibits while non-phosphorylated IGFBP-1 stimulates IGF-I-induced amino acid uptake by cultured trophoblast cells. *Growth Horm IGF Res* 1998; 8: 65-70.
57. Iwashita M, Sakai K, Kudo Y, Takeda Y. Phosphoisoforms of insulin-like growth factor binding protein-1 in appropriate-for-gestational-age and small for-gestational-age fetuses. *Growth Horm IGF Res* 1998; 8: 487-493.

Correspondencia:
Eulises Díaz Díaz
Departamento de Biología de la
Reproducción, Instituto Nacional
de Ciencias Médicas y Nutrición
"Salvador Zubirán",
Vasco de Quiroga 15,
Col. Sección XVI,
Delegación Tlalpan,
14050, México, D.F.



CLINICAL BIOCHEMISTRY

Dr. K. Adeli
Editor-in-Chief
Clinical Biochemistry
The Hospital for Sick Children
University of Toronto
555 University Avenue
Toronto, ON
M5G 1X8 CANADA
Tel: (416) 813-8552
Fax: (416) 813-6257
k.adeli@utoronto.ca

Editorial Office:
Susan Marcantonio
Assistant Editor
Tel/Fax: (416) 813-8599
susan.marcantonio@sickkids.ca

Prof. Dr. M. Oellicher
Associate Editor
Department of Clinical Chemistry
George-August University
Robert-Koch-Str 40
37075 Göttingen
GERMANY
Tel: 49-551-39-8561
Fax: 49-551-39-8551

Dr. R.H. Christenson
Associate Editor
Clinical Chemistry Laboratories
University of Maryland
22 South Greene Street
Baltimore, MD
21201 - 1595 USA
Tel: (410) 328-8672
Fax: (410) 328-5880

Dr. E.E. Delvin
Associate Editor
Département de biochimie
Hôpital Sainte-Justine
3178, Côte Ste-Catherine
Montréal, QC
H3T 1C5 CANADA
Tel: (514) 345-4931, ext.5635
Fax: (514) 345-4803

Dr. C.A. Hammett-Stabler
Reviews Editor
Dept of Pathology & Laboratory Medicine
University of North Carolina at Chapel Hill
1077 East Wing
101 Manning Drive
Chapel Hill, NC
27599 - 7325, USA
Tel: (919) 966-3724
Fax: (919) 966-6718

October 27, 2004

Dr. Ali Halhali
Department of Reproductive Biology
Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutricion Salvador Zubiran
Vasca de Quiroga 15
Delegacion Tlalpan
CP 14000 Mexico

RE: MS # 04-183

Dear Dr. Halhali:

Your revised manuscript entitled, "*Placental insulin and insulin-like growth factor I receptors in normal and preeclamptic pregnancies*" has been received. I am happy to inform you that your paper is now acceptable for publication in *Clinical Biochemistry*. The manuscript has been forwarded to the publisher, and you can expect to receive your proofs in 6 to 8 weeks.

Thank you for your interest in *Clinical Biochemistry*.

Sincerely,

Khosrow Adeli, Ph.D.; FCACB, DABCC
Editor-in-Chief
Clinical Biochemistry

T. Amesley, Ann Arbor, MI USA · V. Armstrong, Göttingen GERMANY · J. Atlas, Detroit, MI USA · N. Bhagavan, Honolulu, HI USA · V. Bhatnagar, London, ON CANADA · P.S. Bunting, Ottawa, ON CANADA
J. Clements, Queensland AUSTRALIA · J.S. Cohn, Sydney AUSTRALIA · D.E.C. Cole, Toronto, ON CANADA · P.O. Collinson, London UK · J.D. Cook, Baltimore, MD USA · T. Dewfel, Jena GERMANY
E.P. Diamantis, Toronto, ON CANADA · J.G. Donnelly, New York, NY USA · K. Dooley, Halifax, NS CANADA · G. Ellis, Livingston UK · A.D. Fraser, Halifax, NS CANADA · J. Friedrich, Vancouver, BC CANADA
V.L. Grey, Hamilton, ON CANADA · N. Hamasaki, Fukuoka JAPAN · T. Higgins, Edmonton, AB CANADA · S. Hill, Hamilton, ON CANADA · B.R. Hoffman, Toronto, ON CANADA · D.W. Hill, London UK
A. Johnston, London, UK · J. Kalra, Saskatoon, SK CANADA · J. Krahn, Winnipeg, MB CANADA · L. Langman, Surrey, BC CANADA · D. Lehotay, Regina, SK CANADA · N. Lepage, Ottawa, ON CANADA
R. Lepage, Fleurimont, QC CANADA · A.W. Lyon, Calgary, AB CANADA · J. Massé, Quebec, QC CANADA · R. Moris, Woodville, SA AUSTRALIA · M.M. Miller, Vienna AUSTRIA · T. Nilsson, Örebro SWEDEN
D.M. Parry, Winnipeg, MB CANADA · M. Pisanò, Padova ITALY · J.M. Queraltó, Barcelona SPAIN · N. Rifkin, Boston, MA USA · W. Schneider, Montreal, QC CANADA · A. Thériault, Honolulu, HI USA
H.A. Toktagal, Bursa TURKEY · G.J. Tsongalis, Hartford, CT USA · I.D. Watson, Liverpool UK · E. Wieland, Stuttgart GERMANY · J. Whitfield, Sydney AUSTRALIA · E. Young, Hamilton, ON CANADA



ELSEVIER

SCIENCE @ DIRECT®

Clinical Biochemistry xx (2004) xxx–xxx

CLINICAL
BIOCHEMISTRY1
2

3 Placental insulin and insulin-like growth factor I receptors in 4 normal and preeclamptic pregnancies

5 Eulises Díaz^a, Mario Cárdenas^a, Ana C. Ariza^a, Fernando Larrea^a, Ali Halhali^{a,b,*}

6 ^aDepartment of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga No. 15, Col. Tlalpan,
7 C.P. 14000 México D.F., México

8 ^bDepartment of Health, Universidad Iberoamericana, México D.F., México

9 Received 3 June 2004; received in revised form 14 October 2004; accepted 27 October 2004

10

11 Abstract

12 **Objectives:** To assess the ligand binding characteristics of insulin and insulin-like growth factor I receptors in normal and preeclamptic
13 placentas.

14 **Design and methods:** This study was done cross sectionally in trophoblast membranes obtained from 10 normotensive and 9
15 preeclamptic pregnant women. The affinity and number of binding sites of insulin and insulin-like growth factor I receptors were assessed by
16 binding assays and Scatchard plot analysis.

17 **Results:** Placental and newborn birth weights were significantly ($P < 0.001$) lower in the preeclamptic group. The K_d values of placental
18 insulin receptors (IR) were significantly higher in the preeclamptic group than in the normotensive group ($1.08 \pm 0.24 \times 10^{-9}$ vs. $0.81 \pm$
19 0.13×10^{-9} M, $P < 0.01$), without differences in the number of receptors. In contrast, no differences were observed in the affinity and the
20 number of insulin-like growth factor I receptors (IGF-IR) between groups. Placental weight was associated negatively with the K_d values of
21 IR ($P < 0.05$) and positively with the number of placental IGF-IR ($P < 0.05$); while newborn birth weight was associated positively with the
22 number of IGF-IR ($P < 0.05$). In addition, both systolic and diastolic blood pressure correlated significantly with K_d values of placental IR
23 ($P < 0.01$).

24 **Conclusions:** These data demonstrate that preeclampsia is associated with low placental IR affinity. In addition, this study suggests an
25 association between the affinity of IR and number of IGF-IR with placental and/or fetal growth. Furthermore, high blood pressure may affect
26 the affinity of placental IR, but not the affinity or number of placental IGF-1 receptors.

27 © 2004 Published by The Canadian Society of Clinical Chemists.

28 **Keywords:** Insulin receptor; IGF-1 receptor; Placenta; Preeclampsia

29 30 Introduction

31 Preeclampsia is a pregnancy-induced hypertension disease. Among several alterations, intrauterine growth retardation has been found in preeclampsia [1,2]. Insulin and
32 insulin-like growth factor I (IGF-1) are involved in fetal
33
34

35 growth, and their anabolic and mitogenic activities are
36 mediated via their cell surface tyrosine kinase receptors
37 [3,4]. The insulin receptor (IR) and IGF-1 receptor (IGF-
38 IR) are structurally similar and in certain regions, such as
39 the tyrosine kinase domain, share about 85% of homology
40 [5]. We and others [1,2,6–8] have observed intrauterine
41 growth retardation in more than 30% of the infants born
42 from preeclamptic women, which was associated with low
43 IGF-1 circulating levels in maternal and umbilical cord
44 compartments [6–9]. The observation of positive associa-
45 tions between newborn birth weight and IGF-1 suggests
46 that fetal growth is regulated, at least in part, by this growth

* Corresponding author. Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga No. 15 Col. Tlalpan, C.P. 14000 México D.F., México. Fax: +52 55 56 55 98 59.

E-mail address: alih@quetzal.innsz.mx (A. Halhali).

47 factor [6–9]. Results regarding insulin and insulin resistance
48 during preeclampsia are controversial; some authors have
49 reported hyperinsulinemia and insulin resistance [10–12],
50 while others have not found these alterations [13]. Placenta
51 is involved in nutrients transport and is considered an
52 endocrine organ. Both insulin and IGF-1 receptors are
53 abundant in placenta, mainly in trophoblastic tissue [14–17],
54 which suggests that their ligands are regulators of amino
55 acids and glucose transport needed for placental and fetal
56 growth. Since preeclampsia is associated with intrauterine
57 growth retardation, the objective of this study was to
58 determine whether IR and IGF-1R ligand binding character-
59 istics are altered in preeclamptic placentas.

60 Materials and methods

61 Reagents

62 Human recombinant IGF-1 and [¹²⁵I]IGF-1 (specific
63 activity: 2000 Ci/mmol) were purchased from Amersham
64 (Amersham Pharmacia Biotech, London, UK). Human
65 recombinant insulin was obtained from Novo Nordisk
66 (Novolin^{MR}, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark). Insulin
67 was dialyzed during 72 h in sodium phosphate 0.05 M, pH
68 7.4 buffer, and radiolabeled with Na¹²⁵I (Amersham
69 Pharmacia Biotech) using the chloramine-T method [18].
70 [¹²⁵I]insulin was separated from free Na¹²⁵I by gel filtration.
71 The final specific activity of purified [¹²⁵I]insulin was
72 260 µCi/µg.

73 Subjects

74 The protocol of this study was approved by the Human
75 Ethics Committee of the Instituto Nacional de Ciencias
76 Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, and each woman
77 signed a written informed consent form. Term placentas
78 were obtained after delivery from 9 preeclamptic (PE
79 group) and 10 normotensive (NT group) pregnant women
80 of similar biological and gestational age (normal control
81 group). All subjects studied were chosen in a consecutive
82 manner. All the subjects had similar demographic character-
83 istics and belonged to urban population of Mexico City.
84 The diagnosis of preeclampsia was based on the simulta-
85 neous presence of hypertension (systolic blood pressure
86 ≥140 mm Hg and/or diastolic blood pressure ≥90 mm Hg)
87 and proteinuria (≥2+ of protein on dipstick: ≥100 mg/dl)
88 [2]. Patients with known preexisting hypertension or
89 previous preeclampsia, liver, renal, heart, and any other
90 endocrine disorders, as well as the use of nutritional
91 supplements, diuretics, and any kind of hormonal treatment,
92 were excluded from the study. Only women delivering a
93 single newborn with Apgar scores of 7–10 were included.
94 Newborns small for gestational age were classified accord-
95 ing to the criteria of Lubchenco et al. [19] (birth weight
96 below the 10th percentile of Lubchenco standards).

Placental cell membranes

97

98 After delivery, cotyledons were obtained, rinsed in
99 0.9% NaCl at room temperature to remove blood, and
100 frozen in liquid nitrogen. Cell membranes were obtained
101 by differential centrifugation as previously described [20].
102 Tissue homogenizations and membrane preparations were
103 done at 4°C. Placental cotyledon tissues (10 g) were
104 homogenized in four volumes of 50 mM Tris-HCl, pH 7.7
105 containing 0.25 M sucrose, 5 mM EDTA, 20 µg/ml
106 phenylmethyl-sulfonyl fluoride (PMSF), and 1.4 mg/ml
107 bacitracin. The homogenates were centrifuged at 600 × g
108 for 10 min. Thereafter, the pellets were discarded and the
109 supernatants were centrifuged at 10,500 × g for 30 min.
110 The resulting supernatants were centrifuged at 39,000 × g
111 for 30 min. Each pellet was twice resuspended in Tris-
112 HCl, pH 7.7, and centrifuged at 39,000 × g for 30 min.
113 The final pellets were resuspended in Tris-HCl, pH 7.7, 5
114 mM EDTA, 20 µg/ml phenylmethyl-sulfonyl fluoride
115 (PMSF), and 1.4 mg/ml bacitracin, aliquoted and frozen
116 at -70°C until assayed. Protein concentrations were
117 determined by Bradford method using BSA as standard
118 [21].

Insulin and IGF-1 receptor binding assays

119

120 Binding assays of insulin and IGF-1 to placental
121 membranes were carried out as follows. Insulin, IGF-1,
122 and their corresponding [¹²⁵I]-labeled forms were dis-
123 solved in 50 mM Tris-HCl, pH 7.7, containing 0.5%
124 BSA, 20 µg/ml PMSF, 1.4 mg/ml bacitracin, and 10 mM
125 MgCl₂. An aliquot of 90–100 µg of membrane protein
126 (100 µl) was incubated with 100 µl of [¹²⁵I]insulin
127 (0.0150 nM) or [¹²⁵I]IGF-1 (0.0075 nM) and increasing
128 concentration of insulin (0–7.95 nM) or IGF-1 (0–1.14
129 nM) in a final volume of 300 µl. Incubations were
130 performed overnight at 4°C under orbital agitation. After
131 incubation, 1 ml of Tris-HCl, pH 7.7, containing 8%
132 (w/v) polyethylene glycol (PEG 8000) was added to all
133 tubes and centrifuged at 3000 rpm for 30 min at 4°C.
134 Supernatants were discarded and tubes were inverted on
135 absorbent paper to remove all residual droplets. Radio-
136 activity was determined in a gamma counter (Crystal
137 Plus, Multidetector RIA System, Packard Instrument
138 Company Inc., Downers Grove, IL, USA). Nonspecific
139 binding was determined in parallel incubation containing
140 an excess of unlabeled insulin (31.7 nM) or IGF-1 (9.12
141 nM). Binding data were obtained by Scatchard plot
142 analysis [22].

Statistical analysis

143

144 Results are expressed as mean ± SD. Statistical differ-
145 ences between groups were analyzed by two-tailed *t* test.
146 The comparison of the frequency of nulliparous and SGA
147 newborns were performed using χ^2 test. The associations

t1.1 Table 1
t1.2 Clinical characteristics of the normotensive (NT) and preeclamptic (PE)
t1.3 groups

	NT group (n = 10)	PE group (n = 9)	P
t1.4 Maternal age (years)	24.0 ± 5.3	23.4 ± 5.2	0.82
t1.5 Gestational age (weeks)	39.2 ± 0.9	39.0 ± 0.8	0.66
t1.6 Frequency of multiparous	3/10	5/9	0.37
t1.7 Newborn birth weight (g)	2972 ± 142	2462 ± 110	<0.001
t1.8 Frequency of SGA newborns	0/10	4/9	0.03
t1.9 Placental weight (g)	529 ± 25	390 ± 60	<0.001

t1.10 Values are given as mean ± SD. SGA: small for gestational age.

148 between variables were analyzed using Pearson correlation.
149 Differences were considered statistically significant at $P <$
150 0.05. All statistical analyses were done using Statview 4.02
151 statistical package (Abacus Concepts, Inc., Berkeley, CA,
152 USA).

153 Results

154 Clinical characteristics

155 As shown in Table 1, placental and newborn birth
156 weights were significantly ($P < 0.001$) lower in the
157 preeclamptic group, despite similar maternal and gestational
158 ages. Furthermore, 44.4% of the newborns from the
159 preeclamptic group were small for gestational age (SGA)
160 whereas all those from the normotensive group had
161 appropriate weight for gestational age (AGA).

Receptor binding assays

162 Protein concentrations of placental membranes were not
163 significantly different between the normotensive and preeclamptic
164 groups (1.59 ± 0.29 and 1.64 ± 0.42 mg/ml,
165 respectively).

166 Unlabeled insulin competed with its labeled form in a
167 dose-dependent manner in both groups. The binding
168 assays showed that the half of placental IR were occupied
169 at a concentration of 0.8 nM (K_d value) of insulin
170 (Fig. 1A). As determined by Scatchard plot analysis, the
171 affinity of IR was significantly ($P < 0.05$) lower in the
172 preeclamptic group as compared with the normotensive
173 group. However, the number of IR was not different
174 between groups (Table 2).

175 As observed for insulin, unlabeled IGF-1 displaced in a
176 dose-dependent manner its labeled form. The binding assay
177 showed that the half of placental IGF-1R were occupied at
178 a concentration of 0.17 nM (K_d value) of IGF-1 (Fig. 1B).
179 The affinity and number of IGF-1R were not significantly
180 different between the normotensive and preeclamptic groups
181 as analyzed by Scatchard plots (Table 2).

Association studies

182
183 The associations of placental and newborn birth weights
184 with the affinity and number of IR and IGF-1R were
185 evaluated. As shown in Table 3, placental weight of the
186 normotensive and preeclamptic groups together correlated
187 positively with placental IGF-1R and negatively with the K_d
188

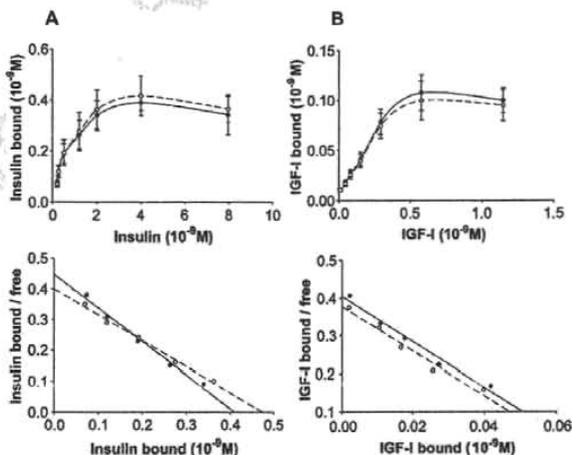


Fig. 1. Binding of insulin (A) and IGF-1 (B) to placental membranes from normotensive (closed circles) and preeclamptic (open circles) groups. Tubes containing 95 µg of protein, [125 I]insulin (0.0150 nM), or [125 I]IGF-1 (0.0075 nM) in the presence of increasing concentrations of their corresponding unlabeled ligands were incubated during 18 h at 4°C. Nonspecific binding was estimated in parallel incubations containing an excess of unlabeled ligand (1000×). Bound and free fractions were separated by addition of PEG. Scatchard plots (bottom panels) were derived from binding data shown in upper panels.

t2.1 Table 2
Binding characteristics of placental insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor I receptor (IGF-1R) of the normotensive (NT) and preeclamptic (PE) groups

t2.3 Binding characteristics	NT group (n = 10)	PE group (n = 9)	P
t2.4 IR			
t2.5 Dissociation constant (10^{-9} M)	0.81 ± 0.13	1.08 ± 0.24	0.006
t2.6 Receptor number (fmol/mg protein)	1181 ± 210	1220 ± 369	0.78
t2.7 IGF-1R			
t2.8 Dissociation constant (10^{-9} M)	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.03	0.83
t2.9 Receptor number (fmol/mg protein)	215 ± 32	197 ± 32	0.24

t2.10 Values are given as mean ± SD.

189 values of IR, while the newborn birth weight of both groups
190 taken together correlated positively with placental IGF-1R.
191 When the normotensive and preeclamptic groups were
192 analyzed separately, newborn birth weight correlated with
193 the number of IGF-1R in the normotensive group; however,
194 placental weight did not correlate significantly with any of
195 the variables studied in both groups.

196 The associations of blood pressure with placental and
197 newborn birth weights were also evaluated. When the
198 normotensive and preeclamptic groups were analyzed
199 together, systolic blood pressure correlated significantly
200 with placental weight ($r = -0.81$, $P < 0.0001$) and with
201 newborn birth weight ($r = -0.61$, $P = 0.005$). In addition,
202 diastolic blood pressure also correlated significantly with
203 placental weight ($r = -0.84$, $P < 0.0001$) and with newborn
204 birth weight ($r = -0.67$, $P = 0.02$). When the normotensive
205 and preeclamptic groups were analyzed separately, these
206 significant correlations were not observed.

207 The association between blood pressure (last before
208 delivery) and binding characteristics of placental IR and
209 IGF-1R were also evaluated. As shown in Table 4, maternal
210 systolic and diastolic blood pressure correlated significantly
211 with K_d values of placental IR when the normotensive and
212 preeclamptic groups were analyzed together. However,
213 blood pressure did not correlate significantly with any of

t3.1 Table 3
Association of placental and newborn birth weights with the binding characteristics of placental insulin and insulin-like growth factor I receptors

t3.3	NT + PE groups (n = 19)	NT group (n = 10)	PE group (n = 9)
t3.4 Placental weight versus			
t3.5 IR K_d	-0.54*	-0.15	-0.05
t3.6 IGF-1R number	0.49*	0.48	0.58
t3.7 Newborn birth weight versus			
t3.8 IR K_d	-0.35	0.17	0.17
t3.9 IGF-1R number	0.48*	0.79**	0.28

t3.10 Values are given as Pearson correlation coefficients (r).

t3.11 * $P < 0.05$.

t3.12 ** $P < 0.01$.

Table 4
Association of maternal systolic and diastolic blood pressures with the binding characteristics of placental insulin and insulin-like growth factor I receptors

	NT + PE groups (n = 19)	NT group (n = 10)	PE group (n = 9)
Systolic blood pressure versus			
IR K_d	0.67**	0.19	0.42
IGF-1R number	-0.31	-0.28	-0.13
Diastolic blood pressure versus			
IR K_d	0.70**	0.55	0.41
IGF-1R number	-0.34	-0.29	-0.17

Values are given as Pearson correlation coefficients (r).

* $P < 0.05$.

** $P < 0.01$.

the binding characteristics when both groups were analyzed
separately.

Discussion

Studies regarding IR alterations in gestational hypertension are controversial. It has been observed in erythrocytes that IR number and affinity are not altered in gestational hypertension and preeclampsia [23]. However, in another study [24], placental IR binding has been found decreased in gestational hypertension with insulin resistance. In the present study, the number of placental IR was not significantly different between the normotensive and preeclamptic groups, as has been previously reported during intrauterine growth retardation [25]. However, the affinity of placental IR was significantly lower in the preeclamptic group as compared with the normotensive group, which may be involved in decreased placental amino acid and glucose transport in preeclampsia. This may explain the lower placental and fetal weights observed in preeclampsia. The low affinity of the placental IR observed in the preeclamptic group and the high correlation observed between the K_d values of placental IR and both systolic and diastolic blood pressure suggest that hypertension is associated with low insulin sensitivity, at least at the placental level.

Regarding IGF-1 and its association with fetal growth, we and others [6-9] have observed that intrauterine growth retardation seen in preeclampsia is associated with low IGF-1 circulating levels. It has been shown that IGF-1 binding to purified erythrocyte receptors is increased in preeclampsia, which has been suggested as a compensatory mechanism [23]. The results obtained in the present study did not demonstrate alteration in the affinity and number of IGF-1R. However, the significant association between newborn birth weight and placental IGF-1R number may suggest that IGF-1R is closing associated with fetal growth. Indeed, the reported decreased of IGF-1R mRNA and protein in intrauterine growth retardation in rats support this affirmation [25]. In the other hand, the absence of

252 significant correlation between blood pressure and the IGF-
253 IR characteristics suggests that hypertension is a patho-
254 logical condition which does not affect significantly the
255 affinity or number of placental IGF-1 receptors.

256 In conclusion, the results of this study demonstrate that
257 preeclampsia is associated with low placental IR affinity. In
258 addition, this study suggests that the affinity of IR and
259 number of IGF-1R are involved in placental and/or fetal
260 growth. The negative association found between blood
261 pressure and the affinity of placental IR suggest that
262 hypertension may affect the affinity of placental IR.

263 Acknowledgments

264 This work was supported in part by grants from
265 National Council of Science and Technology (CONA-
266 CYT, Grant No. 26238-M, México), the Latin American
267 Program of Training and Research in Human Reproduc-
268 tion (PLACIRH, México), and the Special Programme of
269 Research, Development, and Research Training in
270 Human Reproduction of the World Health Organization
271 (Geneve, Switzerland). We thank the staff of the Hospital
272 General M. Gea González, SSA, for placental tissue
273 donation.

274 References

275

276 [1] Long PA, Abell DA, Beischer NA. Fetal growth retardation and pre-
277 eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol* 1980;87:13–8.

278 [2] Report of the National High Blood Pressure Education Program
279 Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy. *Am J Obstet*
280 *Gynecol* 2000;183:S1–22.

281 [3] Yarden Y, Ullrich A. Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu*
282 *Rev Biochem* 1988;57:443–78.

283 [4] Jones JI, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding
284 proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995;16:3–34.

285 [5] Czech MP. Signal transmission by the insulin-like growth factors. *Cell*
286 *1989;59:235–8*.

287 [6] Halhali A, Bourges H, Carrillo A, Garabedian M. Lower circulating
288 insulin-like growth factor I and 1,25-dihydroxyvitamin D levels in
289 preeclampsia. *Rev Invest Clin* 1995;47:259–66.

290 [7] Halhali A, Tovât AR, Torres N, Bourges H, Garabedian M, Larrea F.
291 Preeclampsia is associated with low circulating levels of insulin-like
292 growth factor I and 1,25-dihydroxyvitamin D in maternal and
293 umbilical cord compartments. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:
294 1828–33.

295 [8] Díaz E, Halhali A, Luna C, Díaz L, Avila E, Larrea F. Newborn birth
296 weight correlates with placental zinc, umbilical insulin-like growth
297 factor I, and leptin levels in preeclampsia. *Arch Med Res* 2002;
298 33:40–7.

357

[9] Giudice LC, Martina NA, Crystal RA, Tazuke S, Druzin M. Insulin-
like growth factor binding protein-I at the maternal-fetal interface
and insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-II, and
insulin-like growth factor binding protein-I in the circulation of
women with severe preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1997;176:
751–7 [discussion 757–8].

[10] Sowers JR, Saleh AA, Sokol RJ. Hyperinsulinemia and insulin
resistance are associated with preeclampsia in African-Americans. *Am*
J Hypertens 1995;8:1–4.

[11] Martinez-Abundis E, Gonzalez-Ortiz M, Quinones-Galvan A,
Ferrannini E. Hyperinsulinemia in glucose-tolerant women with
preeclampsia. A controlled study. *Am J Hypertens* 1996;9:610–4.

[12] Kaaja R, Laivuori H, Laakso M, Tikkanen MJ, Ylikorkala O.
Evidence of a state of increased insulin resistance in preeclampsia.
Metabolism 1999;48:892–6.

[13] Caruso A, Ferrazzani S, De Carolis S, Lucchese A, Lanzone A,
De Santis L, et al. Gestational hypertension but not pre-eclampsia is
associated with insulin resistance syndrome characteristics. *Hum*
Reprod 1999;14:219–23.

[14] Jones CJ, Hartmann M, Blaschitz A, Desoye G. Ultrastructural
localization of insulin receptors in human placenta. *Am J Reprod*
Immunol 1993;30:136–45.

[15] Desoye G, Hartmann M, Jones CJ, Wolf HJ, Kohlen G, Kosanke G,
et al. Location of insulin receptors in the placenta and its progenitor
tissues. *Microsc Res Tech* 1997;38:63–75.

[16] Milio LA, Hu J, Douglas GC. Binding of insulin-like growth factor I
to human trophoblast cells during differentiation in vitro. *Placenta*
1994;15:641–51.

[17] Holmes R, Porter H, Newcomb P, Holly JM, Soothill P. An
immunohistochemical study of type I insulin-like growth factor
receptors in the placenta of pregnancies with appropriately grown
or growth restricted fetuses. *Placenta* 1999;20:325–30.

[18] Hunter WM, Greenwood FC. Preparation of iodine-131 labelled
human growth hormone of high specific activity. *Nature* 1962;194:
495–6.

[19] Lubchenco LO, Hansman C, Dressler M, Boyd E. Intrauterine growth
as estimated from liveborn birth-weight data at 24 to 42 weeks of
gestation. *Pediatrics* 1963;79:3–800.

[20] Jacobs S, Cuatrecasas P. Purification of insulin receptor from human
placenta. In: Colowick SP, Kaplan NO, editors. *Methods in*
enzymology. Academic Press, Inc; 1985. p. 399–405.

[21] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of
microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye
binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.

[22] Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions.
Ann N Y Acad Sci 1949;51:660–72.

[23] Sowers JR, Jacobs DB, Simpson L, al-Homsy B, Grunberger G, Sokol
R. Erythrocyte insulin and insulin-like growth factor-I receptor
tyrosine kinase activity in hypertension in pregnancy. *Metabolism*
1995;44:1308–13.

[24] Valensise H, Liu YY, Federici M, Lauro D, Dell'anna D, Romanini C,
et al. Increased expression of low-affinity insulin receptor isoform and
insulin/insulin-like growth factor-I hybrid receptors in term placenta
from insulin-resistant women with gestational hypertension. *Diabeto-*
logia 1996;39:952–60.

[25] Reid GJ, Flozak AS, Simmons RA. Placental expression of insulin-
like growth factor receptor-I and insulin receptor in the growth-
restricted fetal rat. *J Soc Gynecol Investig* 2002;9:210–4.

356