

## CONTROVERSIAS EN INDICACIONES Y TRATAMIENTO CON HORMONA DE CRECIMIENTO (HGH)

## Problemática de las determinaciones hormonales del eje GH-IGF. (hormona de crecimiento - factor de crecimiento insulinoide tipo I)

M<sup>a</sup> Luisa Granada Ybern<sup>1</sup>, Carolina Gómez Gómez<sup>1</sup>, Fernando Moreno Flores<sup>1</sup>, Laura Audí Parera<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Servicio de Bioquímica, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona.

<sup>2</sup> Unidad de Endocrinología Pediátrica, CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER) Vall d'Hebron, Institut de Recerca (VHIR), Hospital Vall d'Hebron, Barcelona.

### Resumen

La evaluación del eje somatotrofo resulta compleja en parte por su propia fisiología: la secreción pulsátil de la hormona de crecimiento (GH), su regulación, la variación de la secreción en diferentes etapas de la vida, etc. que dificultan el establecimiento de normalidad o suficiencia y obliga a realizar pruebas de estimulación o supresión para diagnosticar el déficit o el exceso de secreción, respectivamente. La interpretación de las concentraciones de GH históricamente habían presentado grandes dificultades por la variabilidad de los resultados en función del inmunoensayo empleado. Esto propició la necesidad de consensuar criterios en relación a la estandarización de los ensayos y la especificidad de los anticuerpos que fueron aprobados por la mayoría de las sociedades científicas internacionales. En los últimos años la aplicación de estos criterios se ha traducido en una mejor comparabilidad de los resultados de GH.

**Palabras clave:** hormona de crecimiento, IGF, IGFBP-3, Subunidad ácido lábil, inmunoensayo, estandarización.

Las concentraciones de IGF-1 y algunas de sus proteínas transportadoras reflejan la secreción integrada de GH aunque también están regulados por otros múltiples factores que pueden afectar su expresión y su acción. La determinación de IGF-1 presenta dificultades metodológicas debido a que circula en su mayor parte unido a proteínas transportadoras que interfieren en su determinación. En la actualidad existen grandes discrepancias en los resultados de IGF-1 obtenidos por distintos inmunoensayos. Existen nuevos métodos para evaluar la IGF-1 biológicamente activa, aunque no están extendidos en la práctica clínica.

El objetivo de este trabajo es revisar los aspectos fisiológicos y metodológicos para la correcta inter-

pretación de las pruebas de valoración del eje somatotrofo.

### Introducción

El diagnóstico bioquímico de los trastornos del eje somatotrofo se realiza mediante la determinación de las principales hormonas de este eje, la hormona de crecimiento (GH), los factores de crecimiento a través de los cuales realiza su acción y algunas de sus proteínas transportadoras, reguladas a su vez por la propia GH.

La evaluación de este eje resulta compleja en parte por aspectos inherentes a su propia fisiología: la hormona de crecimiento tiene una secreción pulsátil y un ritmo circadiano con picos máximos coincidiendo con las fases del sueño profundo, su regulación neuroendocrina es compleja ya que se halla regulada por factores estimuladores hipotalámicos (GHRH) o del cortex cerebral e inhibidores (somatostatina), y las pautas de secreción presentan grandes variaciones en las diferentes etapas de la vida, en función del sexo, de la edad y del estadio puberal, etc. que dificultan el establecimiento de normalidad o suficiencia de secreción de GH y obligan a realizar pruebas de estimulación o de supresión para diagnosticar la presencia de déficit o de exceso de secreción de GH, respectivamente. La interpretación de las concentraciones plasmáticas de GH medidas por inmunoensayos históricamente había presentado grandes dificultades por la gran variabilidad de los resultados en función del inmunoensayo empleado. Esto puso en evidencia la necesidad de consensuar criterios en relación a las principales causas de confusión de los inmunoensayos como son la estandarización y la especificidad de los anticuerpos empleados, que fueron aprobadas por la mayoría de las sociedades científicas internacionales. En los últimos años se

ha universalizado la aplicación de estos criterios lo que se ha traducido en una mejor comparabilidad de los resultados de GH.

Las concentraciones de IGF-1 y algunas de sus proteínas transportadoras tienen una producción fundamentalmente hepática y reflejan la secreción integrada de GH pero también están regulados por múltiples factores como por ejemplo citocinas, factores de crecimiento, lipoproteínas, hormonas esteroideas, etc. que pueden afectar en gran manera su expresión y su acción. La determinación de las concentraciones plasmáticas de IGF-1 presenta además dificultades desde el punto de vista metodológico debido a que circula en su mayor parte unido con gran afinidad a proteínas transportadoras con las que forman complejos de alto peso molecular que interfieren en su determinación. Actualmente se están llevando a la práctica clínica nuevos métodos utilizados en plataformas de investigación, como por ejemplo la espectrometría de masas que se propone como alternativa a los inmunoanálisis; asimismo se han desarrollado métodos que pueden evaluar la IGF-1 biológicamente activa, que aunque no están extendidos en la práctica clínica podrían abrir nuevas vías de conocimiento en el futuro.

El objetivo de este trabajo es revisar los aspectos fisiológicos y metodológicos que es importante conocer para la correcta interpretación de las pruebas de valoración del eje somatotropo.

## PROBLEMÁTICA EN LA DETERMINACIÓN DE GH

Debido a la naturaleza pulsátil de la secreción de la GH, la medida aislada de la concentración de GH plasmática tiene escaso interés diagnóstico. Las pruebas para diagnosticar el déficit de secreción de GH valoran fundamentalmente el incremento de GH en respuesta a estímulos fisiológicos o farmacológicos, mientras que para detectar un exceso de secreción se evalúa la capacidad de inhibición de la secreción de GH. Sin embargo la secreción de GH tanto estimulada como espontánea varía en función de la edad, el sexo, el estadio puberal y del estado nutricional del individuo. Es, por lo tanto, prácticamente imposible disponer de valores de referencia para las diferentes pruebas, en las distintas edades, sexo y estadios puberales. Así pues, en general, suelen adoptarse los valores de corte publicados en la literatura o consensuados internacionalmente. Durante muchos años se ha utilizado el punto de corte de 10 ng/mL que fue establecido en los años 70s utilizando radioinmunoensayos policlonales. Sin embargo, la concentración de GH medida depende del método utilizado y no siempre es posible extrapolar los resultados de GH obtenidos con distintos métodos. Esta falta de concordancia en los resultados de GH medidos por diferentes inmunoensayos tiene varias causas, si bien hay que reconocer que

el esfuerzo realizado por las diferentes Sociedades Científicas para homogeneizar algunos de los factores responsables de las discrepancias, sobre todo en relación a la estandarización y a la especificidad de los anticuerpos de los inmunoensayos, está empezando a dar sus frutos y en los últimos años se ha conseguido disminuir en gran medida la variabilidad.

## Causas de variabilidad en los inmunoensayos para medir hormona de crecimiento.

### Heterogeneidad de la molécula de la GH

La GH es una proteína secretada por las células somatotropas de la hipófisis anterior que tiene 191 aminoácidos (aa) y una estructura tridimensional condicionada por la presencia de 2 puentes disulfuro. Está codificada por el gen GH1 localizado en el brazo largo del cromosoma 17. El mRNA de GH1 se traduce principalmente en una proteína de 191 aa y un peso molecular de 22 kD que es la forma de GH circulante más abundante en sangre (aproximadamente el 75%), pero presenta transcritos alternativos que dan lugar a otras formas de GH hipofisaria (GH 20 kD y GH 17,5 kD) aunque en menor cantidad que la forma principal<sup>1</sup>. Una vez en sangre periférica las diferentes formas de GH se pueden unir a proteínas transportadoras, formar dímeros, trímeros, oligómeros o derivados desamidados o N-acetilados lo que resulta en una gran heterogeneidad de formas circulantes, que tienen distintos tiempos de semivida y por tanto su proporción relativa varía en función del tiempo transcurrido desde el último pico secretor<sup>2</sup>. Esta variabilidad molecular ha sido responsable de gran parte de las diferencias observadas en las concentraciones medidas por distintos inmunoensayos.

### Cambios en los componentes principales de los inmunoensayos

- Anticuerpos anti-GH

Los primeros ensayos para determinar GH fueron radioinmunoensayos (RIA) competitivos. Estos ensayos tenían poca sensibilidad analítica pero utilizaban antisueros policlonales que reconocían la mayoría de las formas moleculares de GH circulantes. La aparición de métodos inmunométricos que utilizaban 2 anticuerpos distintos, generalmente monoclonales, para reconocer 2 epítopes distintos de una misma molécula supuso una gran mejora en la sensibilidad y especificidad de los inmunoensayos, pero en el caso de la GH este aumento de especificidad resultó en una gran disparidad de los resultados obtenidos con los diferentes ensayos<sup>3,4</sup>. Esto era debido a que en cada inmunoensayo las diferentes combinaciones de anticuerpos permitían reconocer una, varias o todas las formas moleculares de la GH. Además hay que recordar que en

aquel momento las determinaciones hormonales se realizaban con kits comerciales manuales y existía una amplia oferta comercial, siendo habitual que en una misma área geográfica cada laboratorio utilizase un kit comercial distinto.

- Ensayos inmunofuncionales

La enorme discrepancia en los resultados de la GH se atribuyó en parte a que se estaban midiendo diferentes proporciones de moléculas de GH inmunoreactivas (las que son detectadas por los anticuerpos) y no la GH bioactiva (aquella con actividad biológica). En este sentido Strassburger desarrolló un ensayo inmunofuncional: LIFA (*Ligand Immuno Functional Immunoassay*)<sup>5</sup> para cuantificar la GH biológicamente activa. Este ensayo utiliza un anticuerpo monoclonal anti-GH con especificidad frente a uno de los lugares de unión de la GH al receptor (*receptor binding site 2*) y en lugar de un segundo anticuerpo utiliza la proteína de transporte relacionada con el receptor de la GH (GHBP recombinante) que se une a la GH a través del *receptor binding site 1*. Tras incubación y lavado, se añade un anticuerpo anti-GHBP marcado y la señal es proporcional a la cantidad de GH en la muestra funcionalmente activa. Aunque conceptualmente era un método ideal para el diagnóstico de las alteraciones del eje somatotrofo, estudios comparativos no demostraron ventajas apreciables respecto a otros inmunoensayos comercializados, los puntos de corte eran muy distintos<sup>6</sup> y, en la actualidad, al no estar automatizado, su uso está poco extendido. Posiblemente podría ser útil en aquellos raros casos en que se sospecha la presencia de GH biológicamente inactiva.

- Estandarización de los ensayos de GH

Otro factor que ha sido causa de discrepancia en los resultados de GH ha sido los cambios en la estandarización de los inmunoensayos. Los calibradores utilizados en los inmunoensayos se estandarizan frente a estándares internacionales (IS), cuya potencia biológica en UI o bioactividad se acordada después de una exhaustiva valoración por expertos en estudios internacionales colaborativos. El primer estándar para GH procedía de un extracto de pituitaria bovina (WHO IS 55/1) y se le asignó una bioactividad de 1 (1IU/mg proteína). Los siguientes estándares se obtuvieron de extractos hipofisarios humanos y su bioactividad se valoró teniendo como referencia el primer estándar, así al WHO IS (66/217) se le asignó una bioactividad de 3,5 UI/1,75 mg de proteína por lo que para convertir las UI en ng/mL había que aplicar un factor de "2"; al siguiente estándar, el WHO IS (80/505) se le asignó una potencia de 4,4 IU/1,7 mg y por lo tanto el factor de conversión era de 2,6. Estos estándares obtenidos de extractos hipofisarios contenían las diferentes formas moleculares de la GH secre-

tadas por la hipófisis, sin embargo su cantidad era limitada, por lo que cuando se agotaban debían ser substituidos por un nuevo candidato, con diferente proporción de formas moleculares, cuya actividad había que valorar y consensuar nuevamente. De tal manera que en la práctica ocurría que durante años coexistían en un mismo período de tiempo inmunoensayos calibrados frente a diferentes estándares internacionales con diferentes factores de conversión<sup>7</sup>. Además, las concentraciones de GH se expresaban en mUI/mL y/o en ng/mL lo que resultaba en una fuente más de confusión.

El resultado de todos estos factores, fundamentalmente la coexistencia de métodos con diferentes anticuerpos y estándares, resultó en un aumento de la variabilidad global de los resultados de GH emitidos por los diferentes laboratorios que según los datos del programa de calidad externo UK NEQAS for Peptide Hormones en el Reino Unido pasó de un 20% en el año 1989 a más del 30% en el año 1998<sup>8</sup>.

### Sensibilidad de los inmunoensayos de GH

Otro factor importante a tener en cuenta en los inmunoensayos de GH es su sensibilidad analítica. Ésta ha ido mejorando progresivamente en los últimos años y actualmente en la mayoría es inferior a 0,05 ng/mL aunque con diferencias importantes entre inmunoensayos<sup>9</sup>. Este aspecto es importante sobre todo para la interpretación de las pruebas de supresión de GH tras sobrecarga oral de glucosa que se realizan para descartar un exceso de secreción de GH, pero tiene poca trascendencia en las pruebas que se realizan en Pediatría ya que es excepcional la presencia de un exceso de secreción de GH durante la infancia.

### Adopción de acuerdos internacionales para armonizar los resultados de GH

A partir de este punto hubo una reacción de las Sociedades Científicas que dio lugar a la planificación de una serie de medidas orientadas a solventar el problema de comparabilidad de los resultados de GH ya que tenía un impacto muy negativo en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con alteraciones del eje somatotrofo<sup>10</sup>. Con el fin de disponer de un estándar definitivo, en el año 1994, se estableció por primera vez un estándar internacional para GH (WHO IRP 88/624)<sup>11</sup> procedente de DNA recombinante 22 kD rhGH lo cual aseguraba una producción ilimitada. En el 2001 se aprobó un segundo estándar recombinante (WHO IS 98/574)<sup>12</sup> similar al anterior pero en el que se había mejorado el control de las impurezas y se definió la concentración de proteína en función de la GH 22 kD monomérica presente consensuándose una actividad específica de 3 IU/mg. Estos nuevos estándares recombinantes tenían

la desventaja de no representar la heterogeneidad real de la molécula natural de GH ya que contienen únicamente la isoforma 22 kD, sin embargo la posibilidad de producirlos de manera indefinida evitaría la necesidad de más cambios en el futuro.

Las Sociedades Internacionales Clínicas, de Laboratorio y de la industria farmacéutica consensuaron una serie de medidas para armonizar los resultados de GH: adoptar el nuevo estándar recombinante WHO IS 98/574 para calibrar los inmunoensayos, informar las concentraciones de GH en unidades masa (ng/mL o ug/L) y utilizar anticuerpos en los inmunoensayos que reconociesen la forma molecular principal de la GH (la GH 22 kD). La implementación de estas medidas ha requerido unos años, pero en la actualidad se han adoptado de manera casi generalizada a nivel internacional <sup>13</sup>.

### Situación actual de los inmunoensayos para medir GH

Paralelamente, el laboratorio clínico hormonal ha sufrido grandes transformaciones. La aparición de inmunoensayos que no utilizaban isótopos radioactivos permitió su incorporación en analizadores automatizados, que progresivamente han ido sustituyendo las determinaciones con kits manuales. En el caso de la GH y, como veremos posteriormente, también de la IGF-1, las plataformas automatizadas que ofrecen la GH en su panel es bastante limitada por lo que de una forma indirecta las determinaciones de GH se han ido concentrando progresivamente en unos pocos analizadores y en todos ellos se han implementado las medidas consensuadas internacionalmente para armonizar las determinaciones de GH.

La aplicación del nuevo estándar internacional se tradujo en una disminución de las concentraciones de GH medidas. En un estudio, realizado en siete hospitales de toda España, se compararon las concentraciones de GH obtenidas en 1047 muestras medidas en el analizador Immulite (Siemens) con ambos estándares, observándose que los resultados de GH obtenidos con el nuevo estándar eran un 25% más bajas que con el anterior:

$$\text{GH ng/mL (IS 98/574)} = 0,74 \times \text{GH ng/mL (IS 80/505)} + 0,01.$$

80/505) + 0,01.

Se calcularon las equivalencias y se enviaron sendas notas explicativas elaboradas por los miembros de la Comisión de Hormonas de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular (SEQC) en las que se informaba de las nuevas equivalencias (Tabla 1) y que fueron publicadas en las revistas de la Sociedad de Endocrinología y Nutrición y en la de Pediatría <sup>14</sup>.

Chaler *et al* <sup>15</sup>, reevalúan el punto de corte para las pruebas de estimulación farmacológicas de GH que habían situado en 6,1 ng/mL con un ensayo calibrado frente al estándar anterior (IRP 80/505) y lo establecen en 4,7 ng/mL que es el equivalente utilizando un inmunoensayo calibrado frente al nuevo estándar IS 98/574. En esta línea, las publicaciones más recientes abogan por disminuir el punto de corte para las pruebas de estímulo de la GH y situarlo entre 4 -7 ng/mL <sup>15, 16, 17</sup>.

En un estudio en el que participaron varios hospitales de nuestro país se compararon resultados de GH obtenidos con las principales plataformas automatizadas de GH: Immulite 2000 (Siemens), LIAISON (DiaSorin), IDS-iSYS (VITRO) y COBAS e411 (ROCHE). Todos ellos son ensayos inmunométricos quimioluminiscentes, calibrados frente al nuevo estándar IS 98/574, que utilizan una combinación de anticuerpo monoclonal y policlonal (COBAS e411 e IMMULITE 2000) o dos anticuerpos monoclonales (LIAISON e IDS-iSYS). Los resultados pusieron de manifiesto que no habían diferencias significativas entre los inmunoensayos que, además del mismo estándar, utilizaban dos anticuerpos monoclonales (LIAISON e IDS-iSYS), aunque sí las había entre los métodos que utilizaban una combinación de anticuerpo monoclonal y policlonal (Figura 1) <sup>18</sup>. Esto apoya otros trabajos publicados que sugieren que la adopción de un único estándar ha mejorado la comparabilidad de los métodos para determinar GH y que, en el momento actual, el tipo de anticuerpo utilizado parece ser la principal causa de variabilidad. En Holanda la adopción de un único estándar se tradujo en una disminución de la variabilidad entre los inmunoensayos de GH de un 25% a un 15% <sup>19</sup>.

A partir de los datos del programa de Control Externo de Calidad de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular en el que participan la mayoría de los laboratorios clínicos de nuestro país, se pueden conocer los métodos utilizados por los participantes para los diferentes parámetros y la variabilidad de los resultados. En el caso de la GH, el último informe disponible que corresponde a los resultados analizados en el año 2011 reveló que del total de laboratorios que participaron en el control externo para GH (n=72), el 87,9 % de laboratorios (n=62) utilizaba la plataforma Immulite de Siemens,

Tabla 1. Tabla de equivalencia de las concentraciones de GH medidas con el nuevo estándar internacional (IS 98/574) por analizador Immulite (Siemens).

IS 80/505	IS 98/574
10 ng/ml	7,4 ng/ml
6 ng/ml	4,4 ng/ml
3 ng/ml	2,2 ng/ml
1 ng/ml	0,75 ng/ml

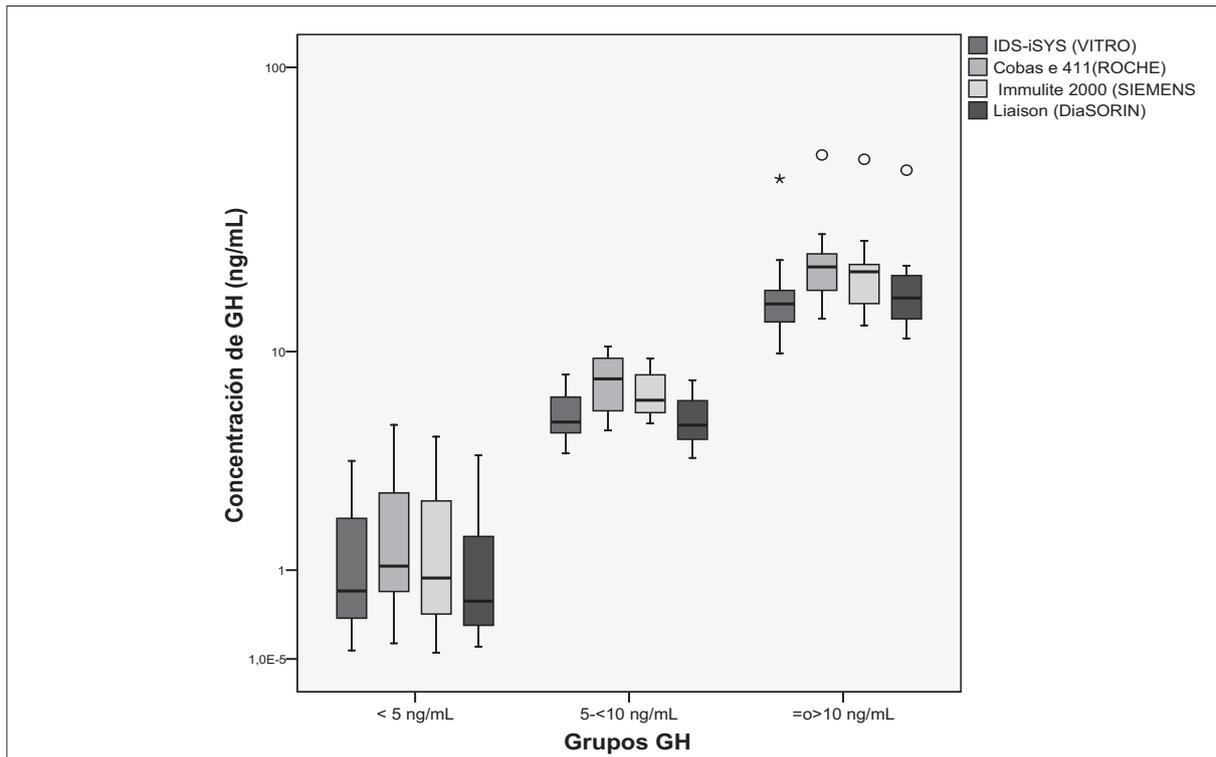


Figura 1. Comparación de los resultados de GH obtenidos mediante 4 inmunoensayos automatizados. Se muestran las concentraciones medianas (P25-P75) de GH (ng/mL) en 112 muestras de 72 pacientes, de edades comprendidas entre 4 y 79 años, basales (67) y tras estímulo (45) en las que se ha determinado la GH por 4 analizadores automáticos: Immulite 2000 (Siemens), LIAISON (DiaSorin), IDS-iSYS (VITRO) y COBAS e411 (ROCHE). Los resultados se han estratificado en 3 grupos en función de la concentración de GH. Se observaron diferencias significativas entre los grupos, excepto entre los resultados de LIAISON y IDS-iSYS en los grupos 5-10 ng/mL y > 10 ng/mL.

<sup>18</sup> Mauri M, Casamitjana R, Jaén M, Alfayate R, Bastande N, Cardona J, Granada ML. Comparación de cuatro métodos automatizados para la determinación de somatotropina (GH) después de la unificación de la estandarización. V Congreso Nacional del Laboratorio Clínico, 9-11 de Noviembre de 2011, Málaga.

9 utilizaban otras plataformas automatizadas [Accesss Unicel DxI (Izasa), Architect (Abbot), Liaison (DiaSorin), Centauro (Siemens), iSYS (IDS)] y sólo uno realizaba un método inmunométrico manual y destacaron que el coeficiente de variación global para la GH fue de 9,4%, mientras que el año anterior (2010) había sido del 19,96% <sup>20</sup>.

En general podemos decir que en la actualidad se ha logrado reducir mucho la variabilidad de los resultados aunque existen todavía factores que justifican discrepancias, entre los que podemos citar las diferencias en la matriz utilizada para los calibradores, diferencias en las interferencias con las proteínas de transporte de la GH (GHBP) o con algunos fármacos (como el Pegvisomant), en la reactividad cruzada con las otras formas moleculares de la GH, entre otras.

### PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE GH (GHBP)

La hormona de crecimiento circula unida a una proteína transportadora de alta afinidad, la GHBP (*growth hormone binding protein*) que se corresponde con el dominio extracelular del receptor tisular de la GH <sup>21</sup>.

Este se libera al torrente circulatorio por un mecanismo de proteólisis, se une a la GH y alarga su vida media.

### Interés de su determinación y métodos de cuantificación

La medición de GHBP en suero ha sido considerada de interés en síndromes de insensibilidad a la GH como reflejo de la abundancia de GHR, sobre todo de origen hepático, de modo que sus concentraciones estarán muy bajas o serán indetectables en las patologías genéticas o adquiridas que cursan con disminución o pérdida de la expresión de GHR. Entre las formas genéticas destaca el síndrome de Laron, enfermedad autosómica recesiva debida a mutaciones inactivadoras en el gen GHR que afecta a la expresión de GHR y cursa con talla baja y resistencia a la GH. En los pacientes con resistencia a la GH por mutaciones en el gen GHR, las concentraciones séricas de GHBP son muy bajas o indetectables en las mutaciones localizadas en los exones 3 a 7 que afectan a la porción extracelular de la proteína GHR, pero son normales o incluso elevadas en las mutaciones menos frecuentes que

afectan a la porción transmembrana o intracelular de la proteína. Por otro lado, las concentraciones de GHBP pueden estar disminuidas por causas adquiridas de insensibilidad a la GH como pueden ser los estados catabólicos o la malnutrición.

La medición de la GHBP en suero se realizaba clásicamente con ensayos de unión seguidos de inmunoprecipitación, adsorción con carbón dextrano o mediante cromatografía de filtración en gel<sup>22</sup>. Sin embargo eran métodos muy engorrosos, laboriosos, lentos y caros que se han ido abandonando progresivamente. Posteriormente se desarrollaron inmunoensayos funcionales, es decir, que cuantifican la GHBP funcionalmente activa<sup>23, 24</sup> y existen también ELISA comerciales.

Se ha descrito un polimorfismo del gen del receptor de la GH (GHR) que consiste en la retención o delección del exón 3 que da lugar a isoformas del receptor con el exón 3 eliminado (3-deleted o d3-GHR) o completo (*full-length* o fl-GHR). La distribución de este polimorfismo en la población española ha revelado que en los pacientes con talla baja y SGA es superior la frecuencia de la forma alélica fl/fl respecto a la población adulta de talla normal<sup>25</sup>. La forma homocigota d3/d3 se ha asociado a mayor respuesta al tratamiento con GH en algunos estudios<sup>26</sup> y a alteraciones en el desarrollo puberal, aunque en otros no se hallan diferencias significativas en la respuesta a la GH exógena ni en la pubertad<sup>27</sup>. Aunque el análisis de polimorfismos se hace mediante estudios genéticos, recientemente se han desarrollado alternativas que consisten en inmunoensayos capaces de medir la proteína de transporte GHBP 3-positiva [E3(+)-GHBP] y la total, de modo que, de la relación entre ambas, se puede establecer el estado del polimorfismo<sup>28, 29</sup>.

#### **FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA DE TIPO I Y PROTEÍNAS DE TRANSPORTE DE LOS IGFs (IGFBPs)**

Los IGFs son péptidos con una estructura homóloga a la proinsulina. Existen 2 tipos de IGFs, el IGF-1 que es el que tiene interés en la evaluación del eje somatotropo y es al que nos referiremos en este capítulo y el IGF-2 que parece tener importancia durante la vida fetal y que puede estar aumentado en algunas neoplasias<sup>30</sup>. El IGF-1 es el que mejor se correlaciona con el estado secretor de GH en la vida postnatal, se sintetiza en el hígado y en múltiples tejidos bajo la acción de la GH y es el principal mediador de su acción. Tiene acción estimuladora de crecimiento, potencia la acción de la insulina y regula la proliferación celular. Ejerce un retrocontrol negativo sobre la secreción de la GH, a nivel hipofisario e hipotalámico. Las proteínas de transporte de los IGFs (IGFBPs) forman una gran familia de la que se han descrito 6 formas principales. Además, se

han descrito otras proteínas estructuralmente relacionadas, las IGFBPrp (*IGFBP related proteins*) que presentan menor afinidad para los IGFs y unas proteasas tisulares de las IGFBP, que fragmentan estas proteínas alterando su unión con los IGFs<sup>31</sup>. Estas proteínas junto a los propios IGFs y sus receptores se engloban actualmente en el llamado sistema IGF que tiene una gran trascendencia en el crecimiento y diferenciación de células normales y malignas.

#### **Factor de crecimiento similar a la insulina de tipo 1 (IGF-1)**

Es el principal marcador periférico de acción de la GH. Se utiliza en el diagnóstico de los déficits de GH, aunque tiene baja sensibilidad, y en el diagnóstico del exceso de secreción de GH para el que es un marcador sensible y específico. Es un marcador importante en los casos de insensibilidad o resistencia a la GH, en los que las concentraciones de GH pueden estar aumentadas, y sirve para monitorizar el efecto del tratamiento con GH exógena.

#### **Factores a considerar en relación a las medidas de IGF-1**

El IGF-1 circula en su mayor parte unido a IGFBP-3 o a IGFBP-5 y a otra proteína llamada subunidad ácido-lábil con las que forma un complejo ternario de alto peso molecular que alarga su vida media. A diferencia de la GH, las concentraciones de IGF-1 permanecen relativamente estables durante el día y no se ven afectadas por la ingesta ni por el tipo de alimento, por lo que la extracción de la muestra para la determinación de IGF-1 durante el día no necesita una estricta estandarización<sup>32</sup>.

Existe sin embargo una gran variabilidad biológica de la IGF-1, tanto intraindividual como interindividual. Diversos estudios han demostrado que la variabilidad intraindividual en las concentraciones de IGF-1 se halla entre el 10 y el 21% y la interindividual entre el 44 y el 77%. En el estudio de Milani *et al.*<sup>33</sup> compararon el IGF-1 en 2 muestras de suero de un mismo sujeto con un intervalo de 2 semanas, en un grupo de 84 voluntarios con edades entre 50 y 90 años y observaron una variabilidad entre la primera y la segunda medida de entre el 10 y el 30%. Nguyen *et al.* determinaron IGF-1 en 3 muestras de suero de 1100 atletas de élite voluntarios con 2-3 semanas de diferencia, obteniendo una variabilidad intraindividual del 21%, muy superior a la imprecisión del ensayo (6%); observaron además que individuos con valores extremos tendían a normalizarse en las siguientes extracciones<sup>34</sup>. Erotokritou-Mulligan *et al.* determinaron los niveles de IGF-1 en 4 muestras de 381 voluntarios, a lo largo de un año, obteniendo una variación intraindividual del 14-16% y una variación interindividual del 44-77% con un coeficiente de variación (CV) del ensayo del 4%<sup>35</sup>.

Teniendo presente esta gran variabilidad biológica, deberían comprobarse aquellas determinaciones con concentraciones de IGF-1 cercanas a los límites de decisión.

Se cree que gran parte de esta variabilidad interindividual en el IGF-1 tiene una causa genética<sup>36</sup>. También se han descrito factores raciales como causa de variabilidad entre sujetos. En un estudio transversal realizado en más de 6.000 individuos en Norte América [*US National Health and Nutrition Examination Survey III (NHANES III)*]<sup>37</sup> se detectaron diferencias importantes en función de la raza siendo las concentraciones de IGF-1 significativamente inferiores en las mujeres blancas con respecto a las negras mientras que los valores más elevados del cociente IGF-I/IGFBP-3 fueron hallados en hombres blancos. En un estudio longitudinal realizado en niños y adolescentes en Estados Unidos, observaron que las concentraciones de IGF-1 eran significativamente más elevadas en los niños negros prepúbereles con respecto a los blancos y que, durante la pubertad, las concentraciones de IGFBP-3 disminuían, por lo que el cociente IGF-I/IGFBP-3 era más alto en los varones de raza negra<sup>38</sup>. Se desconoce si las diferencias halladas entre razas pueden ser secundarias a distintos hábitos alimentarios, a diferencias en la distribución de la grasa o a diferencias en hábitos tóxicos.

Las concentraciones de IGF-1 presentan grandes variaciones en función de la edad, el sexo y el desarrollo puberal por lo que es fundamental disponer de valores de referencia adecuados para la correcta interpretación de los resultados. En los primeros años de la vida son muy bajas, aumentan progresivamente durante la infancia y al llegar a la pubertad presentan un fuerte incremento que es paralelo al aumento de la secreción de hormona de crecimiento y de los esteroides gonadales. Las concentraciones son máximas en el adulto joven y, a partir de entonces, durante la vida adulta se produce una disminución lenta y progresiva. Las concentraciones de IGF-1 son algo más elevadas en el sexo femenino, sobre todo en la pubertad, adelantándose en 1-2 años el pico máximo debido fundamentalmente a las diferencias madurativas<sup>39, 40</sup>. Por el contrario, en adultos, el promedio de IGF-1 en hombres es algo más alto que en mujeres aunque en muchos estudios las diferencias no llegan a ser significativas<sup>41</sup>. Debido a esta variabilidad de los valores de referencia es de gran utilidad, sobre todo en el seguimiento de los pacientes, transformar las concentraciones de IGF-1 en puntuaciones de desviación estándar (SDS) respecto a la edad, sexo y estadio puberal. Para cualquier edad, la normalidad está comprendida entre  $\pm 2$  SDS<sup>42</sup>.

Otro factor importante a considerar en relación al IGF-1 es el estado nutricional. Existe una relación

en forma de "U" entre los valores de IGF-1 estandarizados (IGF-1-SDS) y los marcadores de estado nutricional como son el índice de masa corporal (IMC) o el perímetro de cintura<sup>43</sup>. Se observa disminución en el IGF-1-SDS, tanto en sujetos con IMC inferior a la normalidad como en sujetos con obesidad importante<sup>44</sup>.

### Métodos para la determinación de IGF-1 en plasma

Las concentraciones plasmáticas de IGF-1 se determinan mediante inmunoensayos competitivos o en la actualidad más frecuentemente inmunométricos, y se utilizan antisueros policlonales o anticuerpos monoclonales<sup>45</sup>. Uno de los principales problemas que presenta su determinación deriva de que el IGF-I circula unido a proteínas transportadoras de alta afinidad que interfieren en la unión con el anticuerpo<sup>46</sup>. El método de referencia para separar el IGF-1 de sus proteínas transportadoras es la cromatografía de filtración con columna de Sephadex a pH ácido, pero es un método muy laborioso que no es aplicable en el laboratorio clínico. Se han utilizado diferentes métodos de extracción para separar los IGFs de sus proteínas transportadoras con eficiencia variable como la cromatografía en fase sólida, la precipitación con ácido-etanol, la ultracentrifugación entre otros<sup>47</sup>. En la actualidad el método más utilizado es el de la separación funcional descrito inicialmente por Blum<sup>48</sup> ya que se ha podido adaptar fácilmente a las plataformas de inmunoensayos automatizados. Consiste en acidificar el medio para separar los IGFs de las IGFBPs y de la ALS y, a continuación, bloquear los lugares de unión de las IGFBPs con un exceso de IGF-2 con lo que todo el IGF-1 queda libre en la muestra y puede ser medido. Existe pues mucha variabilidad en los resultados de IGF-1 medidos por diferentes ensayos ya que, a los factores clásicos de variabilidad como son los diferentes anticuerpos y la estandarización, se añade la variabilidad de los métodos para separar las proteínas transportadoras<sup>41</sup>.

Durante años la mayoría de los inmunoensayos para medir IGF-1 estaban calibrados frente al patrón internacional WHO NIBSC 87/518. Se trataba de un estándar de baja pureza (alrededor del 44%), cuyo contenido proteico fue asignado por consenso y en el que posteriormente se demostró que la concentración asignada era mayor que la "real"<sup>49</sup> (medida por análisis cuantitativo de aminoácidos); por lo tanto, la mayoría de datos sobre concentraciones de IGF-1 disponibles en la literatura sobrestiman las concentraciones reales de IGF-1. Sin embargo, las reservas de este preparado se agotaron y hubo que buscar una alternativa. Recientemente se ha aprobado un nuevo estándar internacional para IGF-1, codificado como WHO NIBSC IS 02/254, que contiene IGF-1 recombinante (r-IGF-1) con una pu-

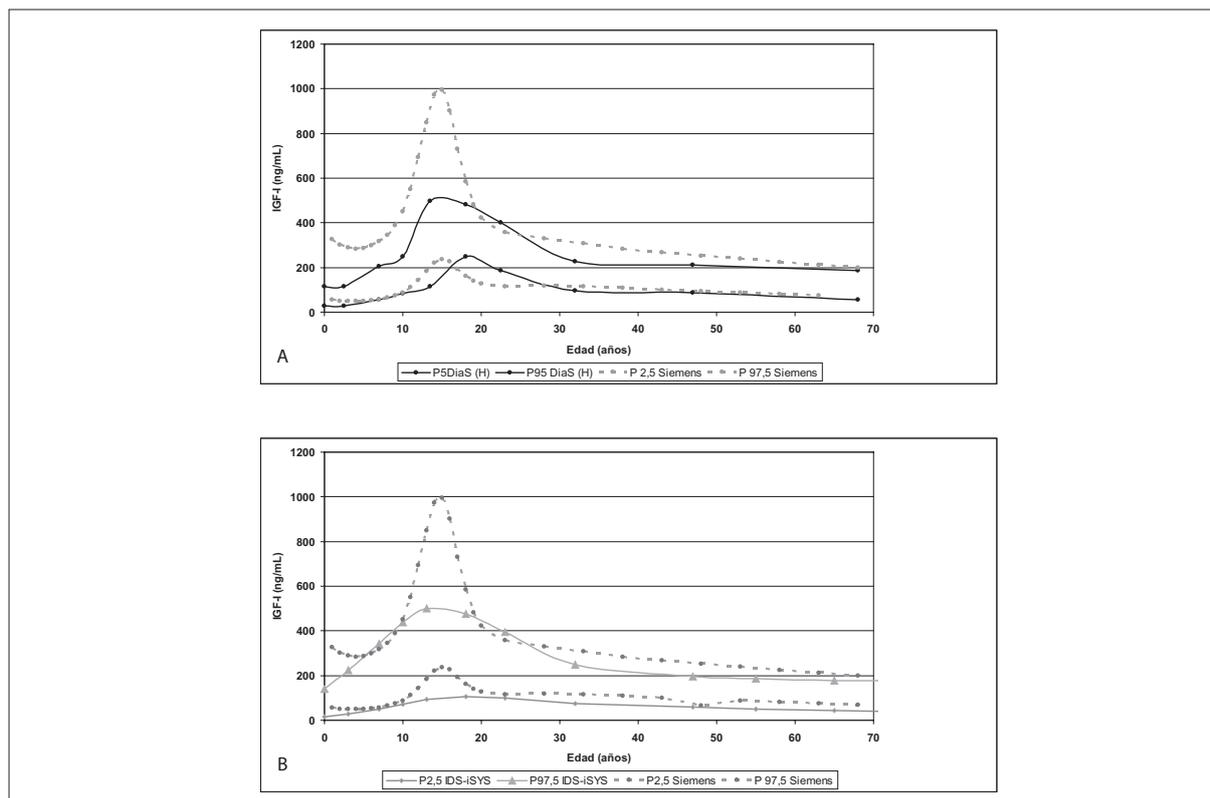


Figura 2. Comparación de los valores de referencia para IGF-1 para las diferentes edades para según los datos aportados en el prospecto de la casa comercial. (A) Immulite (Siemens) y Liaison (DiaSorin). En el caso del Liaison (DiaSorin) existen valores para ambos sexos y se han utilizado los valores correspondientes al sexo masculino. (B) Immulite (Siemens) e iSYS (IDS).

reza superior al 97%<sup>50</sup>. Dado que la estandarización de los ensayos tiene una gran repercusión en la cuantificación de cualquier hormona es de esperar que los resultados obtenidos con el nuevo estándar se modifiquen mostrando concentraciones más bajas.

La situación de los inmunoensayos para IGF-1 es paralela a la comentada en el caso de la GH, pero en este caso la oferta de plataformas automatizadas es aún más restringida. En los últimos años gran parte de los laboratorios nacionales e internacionales habían automatizado la determinación de IGF-1 con el analizador Immulite (Siemens). Pero desde finales del 2012 el suministro de este reactivo se ha visto interrumpido por haberse detectado ciertos problemas en su fabricación. Esto ha obligado a la mayoría de laboratorios a buscar una alternativa que, en el caso de ensayos automatizados, es muy limitada. El cambio de método en el caso del IGF-1 conlleva el cambio en los valores de referencia que en algunos casos son muy diferentes y durante un tiempo habrá que evaluar si el nuevo método se adapta a nuestras necesidades ya que las referencias publicadas con los nuevos sistemas son todavía escasas. En general, los métodos actualmente disponibles están calibrados frente al nuevo estándar WHO NIBSC IS 02/254 de IGF-1 recombinante, mientras que el método Immulite (Siemens) aun no había hecho el cambio en su estandarización. A

modo de ejemplo se muestran los gráficos que se corresponden con los límites de referencia para el método Immulite (Siemens) y dos de las alternativas disponibles (Liaison de DiaSorin) (Figura 2A) y (iSYS de IDS) (Figura 2B) donde se puede ver la gran diferencia en los valores de referencia de los distintos métodos. En este sentido, hay que remarcar la necesidad de expresar los resultados como puntuación Z (SDS respecto a los valores normales para edad y sexo) que permitirá realizar el seguimiento evolutivo de los pacientes a pesar de realizar cambios en los inmunoensayos<sup>51</sup>.

### Otros ensayos para medir IGF-1

Dado que las acciones mitogénicas y metabólicas del IGF-1 se producen tras su unión al receptor se han desarrollado ensayos que permiten valorar la cantidad de IGF-1 capaz de unirse al receptor quinasa y activarlo, es decir el que es biológicamente activo. Se llaman ensayos KIRA (del inglés *Kinase Receptor Activating Assays*) y cuantifican la autofosforilación intracelular del receptor al unirse la molécula de IGF-1<sup>52</sup>. Los resultados con este bioensayo se han comparado con el de algunos inmunoensayos y se han establecido valores de referencia<sup>53</sup>. Aunque actualmente es básicamente una herramienta de investigación ya que es una metodología no disponible comercialmente, los resultados obtenidos con ensayos como el KIRA sin duda pro-

porcionarán nuevos conocimientos sobre los factores que regulan la bioactividad del IGF-1 en la circulación en estados de salud y enfermedad<sup>54</sup>.

Actualmente, algunos de los métodos empleados en las plataformas de investigación se están llevando a la práctica clínica como alternativa a los inmunoanálisis como, por ejemplo, la espectrometría de masas. Los primeros estudios sobre la determinación de IGF-1 mediante este método se aplicaron al estudio de atletas en el marco del control antidoping (los análogos sintéticos de IGF-1 con una elevada biodisponibilidad presentan diferencias respecto al endógeno en algún aminoácido y esto sólo puede ser detectado con análisis de espectro de masas). Sin embargo, recientemente se han publicado trabajos realizados con este método que incluyen valores de referencia realizados en un número importante de sujetos normales y que permite elucidar que en el futuro podría ser un método útil en el diagnóstico clínico<sup>55</sup>. Sin embargo, en la actualidad, se trata de un método muy laborioso, con gran dificultad desde el punto de vista técnico y que requiere en equipamiento muy caro.

### IGF-I no ligado a proteínas (IGF-I libre) en plasma

El IGF-1 circula en su mayor parte unido a proteínas transportadoras, principalmente formando complejos ternarios estables con la IGFBP-3 o la IGFBP-5 y la subunidad ácido lábil, pero también en forma de complejos binarios con las IGFBPs que son más fácilmente dissociables. En individuos sanos y en condiciones fisiológicas, la concentración de IGF-I libre muestra una estrecha correlación con las de IGF-1 total. Las variaciones observadas en IGF-I en las diferentes etapas del desarrollo humano se asocian a cambios paralelos en la concentración de IGF-I libre. En el déficit de GH, la disminución de IGF-I se asocia a una disminución paralela de IGFBP-3 y de ALS con lo cual se mantiene la relación entre el IGF-I total y el libre. Sin embargo, en algunos estados patológicos, la relación entre el IGF-I total y el libre puede debilitarse debido a variaciones en la producción de otras IGFBPs, en especial de IGFBP-1 e IGFBP-2. Éste es el caso de la insuficiencia renal crónica, la diabetes mellitus tipo 1 o tras ayuno prolongado en los que se observa una disminución importante en el IGF-1 libre con poca o nula afectación de los niveles de IGF-I total.

A diferencia del IGF-1 total, las concentraciones de IGF-1 libre varían a lo largo del día, con un pico durante la mañana y una disminución de las concentraciones de IGF-1 libre durante la noche, paralelo a un aumento de la IGFBP-1<sup>56</sup>. Además, las concentraciones se pueden modificar en función de la ingesta de alimentos por lo que la muestra para determinar IGF-1 libre debe ser extraída de manera estandarizada (por la mañana y en ayunas)<sup>57</sup>.

### Métodos para determinar IGF-1 libre

Existen fundamentalmente dos métodos para determinar la fracción libre de IGF-1: el método de ultrafiltración mediante centrifugación y los inmunoensayos directos con anticuerpos específicos para la fracción no unida a proteína.

La ultrafiltración mediante centrifugación es el método considerado de referencia ya que permite separar el IGF-1 no unido sin alterar el equilibrio existente entre la fracción libre y la fracción unida a proteínas. Es un método laborioso que precisa que sea realizado en laboratorios técnicamente cualificados<sup>58</sup>.

Los ensayos inmunométricos directos son métodos más sencillos y rápidos, lo que permite su aplicación a grandes series de muestras. Sin embargo, tienen el inconveniente de que además del IGF-1 libre miden porcentajes variables del IGF-1 ligado a IGFBPs, formando complejos binarios, por lo que se pueden producir diferentes grados de disociación que se traducirá en aumentos variables de la concentración de IGF-1 libre medida<sup>59</sup>.

### Proteínas enlazantes de IGFs (IGFBP-3)

La IGFBP-3 o subunidad ácido estable del complejo ternario es la principal proteína transportadora de IGFs. Está regulada por la GH y también por el propio IGF-1 y en menor grado por el estado de nutrición. Sus concentraciones plasmáticas presentan variaciones en función de la edad, el sexo y el estadio puberal, paralelas a las observadas en el IGF-1 aunque menos pronunciadas<sup>60</sup>. Las concentraciones plasmáticas se pueden modificar en función de la ingesta de alimentos por lo que es importante extraer la sangre en ayunas para su determinación<sup>61</sup>. La IGFBP-3 presenta una menor variabilidad intraindividual que la IGF-1 (es del 10,1 %) pero la variabilidad interindividual es muy elevada (63,9%) debido fundamentalmente a variabilidad genética<sup>62</sup>.

La IGFBP-3 sufre degradación proteolítica por proteasas específicas presentes en diferentes tejidos que desdoblan la IGFBP-3 nativa en fragmentos de menor tamaño que presentan en general menos afinidad por los anticuerpos dirigidos frente a la forma intacta. Este fenómeno fue inicialmente detectado en mujeres embarazadas que presentaban concentraciones de IGFBP-3 inmunorreactiva disminuídas respecto a individuos normales acompañadas por un aumento de fragmentos proteolíticos de menor tamaño (29-30 kDa) medidos por *Ligand Immunoblot*<sup>63</sup>. Actualmente se conoce la existencia de diversas proteasas tejido específicas como el PSA (*prostate-specific antigen*), la plasmina, etc. que ge-

neran fragmentos con capacidad de potenciar o inhibir la acción del IGF-1.

### Métodos de determinación de IGFBP-3

La medición de IGFBP-3 se realiza en los laboratorios clínicos mediante inmunoensayos. No requiere ningún proceso de extracción previo, pero es muy importante saber si los anticuerpos utilizados reconocen únicamente la molécula intacta o también los diferentes fragmentos.

### Subunidad ácido lábil (ALS)

Es una glicoproteína de aproximadamente 85 kDa que está regulada por la GH y que se une a los complejos IGFBP-3/IGF-1 o IGFBP-5/IGF-1 formando complejos de alto peso molecular que prolongan su vida media. Las concentraciones plasmáticas varían en función de la edad. Son bajas en el recién nacido, aumentan durante la infancia y adolescencia y se mantienen relativamente constantes durante la vida adulta<sup>64</sup>. Se han descrito mutaciones del gen ALS que se asocian a talla baja y a concentraciones muy bajas de IGF-1 y de IGFBP-3 y aumentadas de GH<sup>65</sup>. Las concentraciones plasmáticas de ALS aumentan tras el tratamiento con GH exógena pero no después de tratamiento con r-IGF-1<sup>66</sup>. El primer inmunoensayo para medir la ALS en suero fue un RIA desarrollado Baxter RC<sup>67</sup>. Posteriormente se han desarrollado varios inmunoensayos comerciales siendo los resultados obtenidos con diferentes métodos bastante consistentes<sup>68</sup> aunque pueden haber discrepancias debidas a diferencias en la glicosilación de la molécula de ALS.

### Bibliografía

- Baumann G. Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants, and binding proteins. *Endocr Rev.* 1991;12:424-49.
- J. D. Wallace, R. C. Cuneo, M. Bidlingmaier, P. A. Lundberg, L. Carlsson, C. L. Boguszewski, J. Hay, M.-L. Healy, R. Napoli, R. Dall, T. Rosén, and C. J. Strasburger. The Response of Molecular Isoforms of Growth Hormone to Acute Exercise in Trained Adult Males *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001; 86: 200 - 6.
- Granada ML, Sanmartí A, Lucas A, Salinas I, Carrascosa A, Foz M, Audí L: Assay-dependent results of immunoassayable spontaneous 24-hour growth hormone secretion in short children. *Acta Paediatr Scand* 1990;370:63-70.
- Celnicker AC, Chen AB, Wert RM, Sherman BM: Variability in the quantitation of circulating growth hormone using commercial immunoassays. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;68: 469-76.
- Strasburger CJ, Wu Z, Pflaum CD. Dressendorfer RA Immunofunctional assay of human growth hormone (hGH) in serum: a possible consensus for quantitative hGH measurement. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81: 2613-20.
- Stark S, Willig RP. Growth hormone determination in children using an immunofunctional assay in comparison to conventional assays. *Horm Res.* 2007;68:171-7.
- Strasburger CJ, Bidlingmaier. How robust are laboratory measures of growth hormone status? *Horm Res* 2005;64 (Suppl 2):1-5.
- Seth J, Ellis A, Al-Sadie R: Serum Growth Hormone Measurements in Clinical Practice: An Audit of Performance from the UK National External Quality Assessment Scheme. *Horm Res* 1999;51(Suppl.1):13-9.
- Arafat AM, Möhlig M, Weickert MO, Perschel FH, Purschwitz J, Spranger J, Strasburger CJ, Schöfl C, Pfeiffer AF. Growth hormone response during oral glucose tolerance test: the impact of assay method on the estimation of reference values in patients with acromegaly and in healthy controls, and the role of gender, age, and body mass index. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 ;93:1254-62
- Chaler E, Belgorosky A, Maceiras M, Mendioroz M, Rivarola MA. Between-Assay Differences in Serum Growth Hormone (GH) Measurements: Importance in the Diagnosis of GH Deficiency in Childhood. *Clin Chem* 2001; 47:1735-8.
- Bristow AF, Gaines-Das R, Jeffcoate SL, Schuster D: The first international standard for somatropin: Report of an international collaborative study. *Growth Reg* 1995;5:133-41
- Bristow AF, Jespersen AM. The Second International Standard for Somatropin (Recombinant DNA-derived Human Growth Hormone): Preparation and Calibration in an International Collaborative Study. *Biologicals*, 2001;29: 97-106.
- Clemmons DR. Consensus statement on the standardization and evaluation of growth hormone and insulin-like growth factor assays. *Clin Chem.* 2011 ;57:555-9.
- L. Audí Parera, ML Granada Ybern, M Mauri Dot, M Gutierrez Agullo. Estandarización inmunoanálisis de GH. *Endocrinol Nutr.* 2010;57:285-8
- Chaler EA, Ballerini G, Lazzati JM, Maceiras

- M, Frusti M, Bergada I, Rivarola MA, Belgorosky A, Ropelato G. Cut-off values of serum growth hormone (GH) in pharmacological stimulation tests (PhT) evaluated in short-statured children using a chemiluminescent immunometric assay (ICMA) calibrated with the International Recombinant Human GH Standard 98/574. *Clin Chem Lab Med*. 2012 Sep 18. doi:pii: PMID: 23095200.
16. Binder G, Huller E, Blumenstock G, Schweizer R. Auxology-based cut-off values for biochemical testing of GH secretion in childhood. *Growth Horm IGF Res*. 2011 ;21:212-8.
17. Binder G. Growth hormone deficiency: new approaches to the diagnosis. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2011 Sep;9 Suppl 1:535-7.
18. Mauri M, Casamitjana R, Jaén M, Alfayate R, Bastande N, Cardona J, Granada ML. Comparación de cuatro métodos automatizados para la determinación de somatotropina (GH) después de la unificación de la estandarización. V Congreso Nacional del Laboratorio Clínico 9-11 de Noviembre de 2011, Málaga.
19. Ross HA; Endocrinology section and project group "Calibration 2000" of the SKML (Dutch Foundation for Quality Assessment in Clinical Laboratories). Reporting growth hormone assay results in terms of one consensus recombinant standard preparation offers less than optimal reduction of between-method variation. *Clin Chem Lab Med*. 2008;46:1334-5
20. <http://www.contcal.org/qcweb/Documents/40%20Avaluacio%20anual/40%20Programes%202011/60.Hormonas-Inmunoanálisi.pdf> (Consultado en marzo 2013).
21. Baumann G, Mercado M. Growth hormone-binding proteins in plasma. *Nutrition*. 1993 ;9:546-53.
22. Llopis MA, Granada ML, Audí L, Sanmartí A, Bel J, Sánchez-Planell L, Formiguera X, Marin F, Corominas A. Analytical performance and clinical usefulness of two binding assays for growth hormone binding protein (GHBP) measurement: high performance liquid chromatography (HPLC)-gel filtration and dextran-coated charcoal adsorption. *Clin Chim Acta*. 1997 ;267:167-81.
23. Rajkovic IA, Valiontis E, Ho KK. Direct quantitation of growth hormone binding protein in human serum by a ligand immunofunctional assay: comparison with immunoprecipitation and chromatographic methods. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994; 78:772-7.
24. Fisker S, Frystyk J, Skriver L, Vestbo E, Ho KK, Orskov H. A simple, rapid immunometric assay for determination of functional and growth hormone-occupied growth hormone-binding protein in human serum. *Eur J Clin Invest*. 1996;26:779-85.
25. Audí L, Esteban C, Carrascosa A, Espadero R, Pérez-Arroyo A, Arjona R, Clemente M, Wollmann H, Fryklund L, Parodi LA; Spanish SGA Study Group. Exon 3-deleted/full-length growth hormone receptor polymorphism genotype frequencies in Spanish short small-for-gestational-age (SGA) children and adolescents (n = 247) and in an adult control population (n = 289) show increased fl/fl in short SGA. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 ;91:5038-43.
26. Dos Santos C, Essioux L, Teinturier C, Tauber M, Goffin V, Bougnères P. A common polymorphism of the growth hormone receptor is associated with increased responsiveness to growth hormone. *Nat Genet*. 2004 ;36:720-4.
27. Audí L, Carrascosa A, Esteban C, Fernández-Cancio M, Andaluz P, Yeste D, Espadero R, Granada ML, Wollmann H, Fryklund L; Spanish SGA Study Group. The exon 3-deleted/full-length growth hormone receptor polymorphism does not influence the effect of puberty or growth hormone therapy on glucose homeostasis in short non-growth hormone-deficient small-for-gestational-age children: results from a two-year controlled prospective study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 ;93:2709-15.
28. Kratzsch J, Schreiber G, Selisko T, Keller E, Pflaum CD, Strasburger CJ. Measurement of serum exon 3-retaining growth hormone-binding protein in children and adolescents by radioimmunoassay. *Horm Res*. 1997;48:252-7.
29. Wan J, Atzmon G, Hwang D, Barzilai N, Kratzsch J, Cohen P. Growth hormone receptor (GHR) exon 3 polymorphism status detection by dual-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 ;98:E77-81
30. Halje M, Nordin M, Bergman D, Engström W. Review: The effect of insulin-like growth factor II in the regulation of tumour cell growth in vitro and tumorigenesis in vivo. *In Vivo*. 2012;26:519-26.
31. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 1999; 20:761-87.
32. Juul A. Serum levels of insulin-like growth factor I and its binding proteins in health and disease. *Growth Horm. IGF Res*. 2003;13:113-70
33. Milani D, Carmichael JD, Welkowitz J, Ferris S, Reitz RE, Danoff A, Kleinberg DL. Variability and reliability of single serum IGF-I measurements: im-

- pact on determining predictability of risk ratios in disease development. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:2271-4.
34. Nguyen TV, Nelson AE, Howe CJ, Seibel MJ, Baxter RC, Handelsman DJ, Kazlauskas R, Ho KK. Within-subject variability and analytic imprecision of insulinlike growth factor axis and collagen markers: implications for clinical diagnosis and doping tests. *Clin Chem.* 2008 ;54:1268-76.
35. Erotokritou-Mulligan I, Eryl Bassett E, Cowan DA, Bartlett C, Milward P, Sartorio A, Sönksen PH, Holt RI. The use of growth hormone (GH)-dependent markers in the detection of GH abuse in sport: Physiological intra-individual variation of IGF-I, type 3 pro-collagen (P-III-P) and the GH-2000 detection score. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2010 .;72:520-6.
36. Harrela M, Koistinen H, Kaprio J, Lehtovirta M, Tuomilehto J, Eriksson J, Toivanen L, Koskenvuo M, Leinonen P, Koistinen R, Seppälä M. Genetic and environmental components of interindividual variation in circulating levels of IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, and IGFBP-3. *J Clin Invest.* 1996 ;98:2612-5.
37. Berrigan D, Potischman N, Dodd KW, Hursting SD, Lavigne J, Barrett JC, Ballard-Barbash R. Race/ethnic variation in serum levels of IGF-I and IGFBP-3 in US adults. *Growth Horm IGF Res.* 2009 ;19:146-55.
38. Casazza K, Higgins PB, Fernández JR, Goran MI, Gower BA. Longitudinal analysis of the insulin-like growth factor system in African-American and European American children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:4917-23.
39. Juul A, Dalgaard P, Blum WF, *et al.* Serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 (IGFBP-3) in healthy infants, children, and adolescents: the relation to IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-2, age, sex, body mass index, and pubertal maturation. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80: 2534-42.
40. Brabant G, von zur Mühlen A, Wüster C, Ranke MB, Kratzsch J, Kiess W, Ketelslegers JM, Wilhelmsen L, Hulthén L, Saller B, Mattsson A, Wilde J, Schemer R, Kann P; German KIMS Board. Serum insulin-like growth factor I reference values for an automated chemiluminescence immunoassay system: results from a multicenter study. *Horm Res.* 2003;60:53-60.
41. Granada ML, Ulied A, Casanueva FF, Pico A, Lucas T, Torres E, Sanmartí A. Serum IGF-I measured by four different immunoassays in patients with adult GH deficiency or acromegaly and in a control population. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008 ;68:942-50.
42. Growth Hormone Research Society. Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of growth hormone (GH) deficiency in childhood and adolescence: summary statement of the GH Research Society. GH Research Society. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 ;85:3990-3.
43. Friedrich N, Jørgensen T, Juul A, Spielhagen C, Nauck M, Wallaschofski H, Linneberg A. Insulin-like growth factor I and anthropometric parameters in a Danish population. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2012;120:171-4.
44. Schneider HJ, Saller B, Klotsche J, März W, Erwa W, Wittchen HU, Stalla GK. Opposite associations of age-dependent insulin-like growth factor-I standard deviation scores with nutritional state in normal weight and obese subjects. *Eur J Endocrinol.* 2006 ; 154:699-706.
45. Clemmons DR. Commercial assays available for insulin-like growth I and their use in diagnosing growth hormone deficiency. *Horm Res* 2001;55(suppl 2):73-79.
46. Bang P, and participants in the 3rd International symposium on insulin-like growth factors. Valid measurements of total IGF concentrations in biological fluids. *Endocrinology* 1995;136:816-7.
47. Mohan S, Baylink DJ. Development of a simple valid method for the complete removal of insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins from IGFs in human serum and other biological fluids: Comparison with acid-ethanol treatment and C18 Sep-Pak separation. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:637-47.
48. Blum WF, Breier BH. Radioimmunoassays for IGFs and IGFBPs. *Growth Regul* 1994;4 (suppl 1):1-19.
49. Quarmby V, Quan C, Ling V, Compton P, Canova-Davis E. How much insulin-like growth factor I (IGF-I) circulates? Impact of standardization on IGF-I assay accuracy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 ;83:1211-6.
50. Burns C, Rigsby P, Moore M, Rafferty B. The First International Standard For Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) for immunoassay: preparation and calibration in an international collaborative study. *Growth Horm IGF Res.* 2009;19:457-62.
51. Alberti C, Chevenne D, Mercat I, Josserand E, Armoogum-Boizeau P, Tichet J, Léger J. Serum concentrations of insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF binding protein-3 (IGFBP-3), IGF-1/IGFBP-3 ratio, and markers of bone turnover: reference values for French children and adolescents and z-score comparability with other references. *Clin Chem.* 2011 ;57:1424-35.

52. Chen JW, Ledet T, Orskov H, Jessen N, Lund S, Whittaker J, De Meyts P, Larsen MB, Christiansen JS, Frystyk J. A highly sensitive and specific assay for determination of IGF-I bioactivity in human serum. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 284:E1149-55
53. Brugts MP, Ranke MB, Hofland LJ, van der Wanssem K, Weber K, Frystyk J, Lamberts SW, Janssen JA.: Normal values of circulating insulin-like growth factor-I bioactivity in the healthy population: comparison with five widely used IGF-I immunoassays. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 2539- 45.
54. Janssen JA. Insulin-like growth factor I: pros and cons of a bioassay. *Horm Res Paediatr.* 2011;76 Suppl 1:106-10.
55. Bystrom C, Sheng S, Zhang K, Caulfield M, Clarke NJ, Reitz R. Clinical utility of insulin-like growth factor 1 and 2; determination by high resolution mass spectrometry. *PLoS One.* 2012;7:e43457. doi: 10.1371
56. Skjaerbaek C, Frystyk J, Kaal A, Laursen T, Møller J, Weeke J, Jørgensen JO, Sandahl Christiansen J, Orskov H. Circadian variation in serum free and total insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II in untreated and treated acromegaly and growth hormone deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2000 ;52:25-33.
57. Heuck C, Skjaerbaek C, Orskov H, Wolthers OD. Circadian variation in serum free ultrafiltrable insulin-like growth factor I concentrations in healthy children. *Pediatr Res.* 1999;45(5 Pt 1):733-6
58. Frystyk J, Skjærbæk C, Dinesen B, Ørskov H. Free insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) in human serum. *FEBS Lett* 1994;348:185-91.
59. Frystyk J, Ivarsen P, Støvring RK, Dall R, Bek T, Hagen C, et al. Determination of free insulin-like growth factor-I in human serum: comparison of ultrafiltration and direct immunoradiometric assay. *Growth Horm IGF Res* 2001;11:117-27.
60. Argente J, Barrios V, Pozo J, Muñoz MT, Hervás F, Stene M, Hernández M. Normative data for insulin-like growth factors (IGFs), IGF-binding proteins, and growth hormone-binding protein in a healthy Spanish pediatric population: age-and sex-related changes. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993 ;77:1522-8.
61. C Brand-Miller, V. Liu, P. Petocz, R:C: Baxter. The glycemic index of foods influences postprandial insulin-like growth factor-binding protein responses in lean young subjects, *Am. J. Clin Nutri.* 2005;82: 350-4.
62. Cheng I, DeLellis Henderson K, Haiman CA, Kolonel LN, Henderson BE, Freedman ML, Le Marchand L. Genetic determinants of circulating insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein (BP)-1, and IGFBP-3 levels in a multiethnic population. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 ;92:3660-6.
63. Giudice L, Farrell E, Pham H, Lamson G, Rosenfeld R. Insulin-like growth factor binding proteins in maternal serum throughout gestation and in the puerperium: effect of a pregnancy associated serum protease activity. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:806-16.
64. Barrios V, Pozo J, Muñoz MT, Buño M, Argente J. Normative data for total and free acid-labile subunit of the human insulin-like growth factor-binding protein complex in pre- and full-term newborns and healthy boys and girls throughout postnatal development. *Horm Res.* 2000;53:148-53.
65. Domené HM, Hwa V, Argente J, Wit JM, Camacho-Hübner C, Jasper HG, Pozo J, van Duyvenvoorde HA, Yakar S, Fofanova-Gambetti OV, Rosenfeld RG; International ALS Collaborative Group. Human acid-labile subunit deficiency: clinical, endocrine and metabolic consequences. *Horm Res.* 2009;72:129-41.
66. Labarta JI, Gargosky SE, Simpson DM, Lee PD, Argente J, Guevara-Aguirre J, Rosenfeld RG. Immunoblot studies of the acid-labile subunit (ALS) in biological fluids, normal human serum and in children with GH deficiency and GH receptor deficiency before and after long-term therapy with GH or IGF-I respectively. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1997;47:657-66.
67. Baxter RC. Circulating levels and molecular distribution of the acid-labile (alpha) subunit of the high molecular weight insulin-like growth factor-binding protein complex. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990 ;70:1347-53.
- 68 Baxter RC, Svejkar M, Khosravi MJ, Bennett GL, Hardman KV, Senese A, Mistry J, Walton PE, Quarmby V. Measurement of the acid-labile subunit of the insulin-like growth factor binding protein complex in human serum: a comparison of four immunoassays. *J Endocrinol.* 2000 ;165:271-9.