

Puesta al día: pruebas de laboratorio en Endocrinología y Nutrición

INSULIN-LIKE GROWTH FACTORS AND THEIR BINDING PROTEINS

Insulin-like growth factors (IGFs) are peptides which are structurally related to insulin and which stimulate growth, enhance the action of insulin, and regulate cell proliferation. Although IGF expression is ubiquitous, most circulating IGF is produced in the liver. One of the main functions of circulating IGF-I is to exercise inhibitory feedback on growth hormone (GH) secretion, in both the pituitary gland and hypothalamus. In plasma and biological fluids, IGFs mainly circulate together with insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs), which modulate their half-life and interaction with the receptor and possibly exert direct actions on cell proliferation. These proteins, together with IGFs and their receptors, are currently included under the term IGF system, which is of great importance in the growth and differentiation of both normal and malignant cells. Determination of the distinct components of the IGF system is highly useful in the diagnosis and monitoring of treatment in patients with alterations in the IGF-GH axis. The present article reviews the preanalytical and laboratory features that should be known for correct interpretation of results.

Key words: Insulin-like growth factors. IGF-1. IGF-II. Insulin-like growth factor binding proteins. IGFBP-3. Acid-labile subunit. Laboratory methods. Preanalytical conditions.

Factor de crecimiento similar a la insulina y sus proteínas de transporte

MARÍA LUISA GRANADA YBERN

Servicio de Bioquímica. Hospital Germans Trias i Pujol. Badalona. Barcelona. España.

Los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF, de *insulin-like growth factors*) son unos péptidos estructuralmente relacionados con la insulina, que tienen acción estimuladora del crecimiento, potencian la acción de la insulina y regulan la proliferación celular. Aunque la expresión de IGF es ubicua, la mayor parte del IGF circulante es de origen hepático. Parece ser que una de las principales funciones del IGF-I circulante es el retrocontrol inhibitorio de la secreción de somatotropina, tanto hipofisaria como hipotalámica. En el plasma y en los fluidos biológicos, las IGF circulan unidas en su mayor parte a proteínas transportadoras de alta afinidad, las *insulin-like growth factor binding proteins* (IGFBP) que modulan su vida media, su interacción con el receptor y posiblemente desempeñen acciones directas en la proliferación celular. A estas proteínas, junto a los propios IGF y sus receptores, se les engloba actualmente en el llamado sistema IGF, que tiene una gran trascendencia en el crecimiento y la diferenciación de células normales y malignas. La determinación de los diferentes componentes del sistema IGF tiene gran utilidad en el diagnóstico y la monitorización del tratamiento en pacientes con alteraciones del eje GH-IGF. En este artículo se revisarán los aspectos preanalíticos y analíticos que deben conocerse para la correcta interpretación de los resultados.

Palabras clave: Factores de crecimiento similares a la insulina. IGF-I. IGF-II. Proteínas enlazantes de los factores de crecimiento similares a la insulina. IGFBP-3. Subunidad acidolábil. Métodos de laboratorio. Condiciones preanalíticas.

INTRODUCCIÓN

Los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF, de *insulin-like growth factors*) son péptidos con una masa molecular de alrededor de 7,5 kDa que tienen una estructura homóloga a la proinsulina. Existen 2 tipos de IGF, el IGF-I o somatomedina C y el IGF-II. El IGF-I es el que mejor se correlaciona con el estado secretor de somatotropina (GH) en la vida posnatal, mientras que el IGF-II parece tener una mayor relevancia durante la vida fetal. Los IGF se sintetizan en el hígado y en múltiples tejidos por la acción de la GH y son los principales mediadores de las acciones de la GH. Tienen acción estimuladora del crecimiento, potencian la acción de la insulina y regulan la proliferación celular. Aunque la expresión de IGF-I es ubicua, el origen de la mayor parte del IGF circulante es hepático. Parece ser que una de las principales fun-

Correspondencia: Dra. M.L. Granada Ybern.
Servicio de Bioquímica. Hospital Germans Trias i Pujol.
Ctra. Canyet, s/n. 08916 Badalona. Barcelona. España.

Manuscrito recibido el 14-7-2005 y aceptado para su publicación el 17-8-2005.

ciones del IGF-I circulante es un retrocontrol inhibitorio de la secreción de GH, tanto hipofisaria como hipotalámica. En los fluidos biológicos, las IGF circulan unidas en su mayor parte a proteínas transportadoras que modulan su vida media y su interacción con el receptor y posiblemente desempeñen acciones directas en la proliferación celular. Las proteínas de transporte de los IGF, *insulin-like growth factor binding proteins* (IGFBP)¹ forman una gran familia de la que se han descrito 6 formas principales numeradas como IGFBP-1 a 6. Además de estas IGFBP se han descrito otras proteínas estructuralmente relacionadas denominadas IGFBPp, que presentan menor afinidad para los IGF y proteasas titulares de las IGFBP, que fragmentan estas proteínas alterando su unión con las IGF². Estas proteínas, junto a los propios IGF y sus receptores, se engloban actualmente en el llamado sistema IGF, que tiene una gran trascendencia en el crecimiento y la diferenciación de células normales y malignas.

La determinación en plasma de los diferentes componentes del sistema IGF, en especial del IGF-1, es de gran utilidad en el diagnóstico bioquímico y la monitorización del tratamiento de las alteraciones del eje somatotropo.

CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DEL IGF-1 Y SUS PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS

Las concentraciones plasmáticas de IGF-I presentan grandes variaciones en las diferentes etapas del desarrollo humano. En el recién nacido y en los primeros años de vida las concentraciones son muy bajas y aumentan progresivamente durante la infancia, aunque el rango de normalidad es relativamente amplio. El aumento más importante se produce durante la pubertad, de forma paralela al aumento en la secreción de GH, y se alcanzan concentraciones máximas al final del crecimiento, con concentraciones más elevadas en el sexo femenino^{3,4}. La cronología de la evolución de las concentraciones de IGF-I presenta diferencias entre los dos sexos debido a las diferencias madurativas: así el aumento durante la pubertad es función del estadio puberal y, por tanto, es más precoz en las niñas. Después de la adolescencia la secreción de GH disminuye aproximadamente un 14% cada década de la vida, lo que se acompaña de una disminución paralela de las concentraciones plasmáticas de IGF-1. En la vida adulta también existen diferencias en relación con el sexo, aunque menos marcadas, y las concentraciones son más bajas en las mujeres respecto a los varones de la misma edad⁵⁻⁷.

La evolución de las concentraciones de IGFBP-3 presenta patrones similares a los del IGF-I, aunque la magnitud de las variaciones es menos importante. De ese modo, durante la pubertad el IGF-I aumenta proporcionalmente más que la IGFBP-3, por lo que au-

menta significativamente la relación molar IGF-I/IGFBP-3 coincidiendo con la máxima velocidad de crecimiento⁸. Además, durante la pubertad no varían prácticamente ni IGF-II ni IGFBP-2, pero disminuyen progresivamente las concentraciones de IGFBP-1, por lo que hay un aumento de la fracción libre de IGF-I⁹.

La determinación de los IGF y sus proteínas transportadoras en el laboratorio clínico se realiza mediante inmunoanálisis. Los resultados obtenidos al medir un mismo parámetro con diferentes inmunoanálisis puede variar ampliamente debido a diferencias en la estandarización, los anticuerpos utilizados, los métodos utilizados para eliminar interferencias (p. ej., distintos métodos de extracción de las proteínas transportadoras en el caso de la determinación de IGF) o la presencia de formas moleculares que han sufrido modificaciones postraslacionales (p. ej., fosforilación, glucosilación o proteólisis en el caso de algunas IGFBP). Así pues, para poder valorar las concentraciones del IGF y péptidos relacionados, es necesario conocer los rangos de referencia obtenidos con el mismo método analítico en una población sana y estratificarlos en función de la edad, el sexo y el estadio puberal. Sin embargo, para facilitar la interpretación clínica de los resultados, es conveniente expresarlos en puntuaciones de desviación estándar (SDS, Standard Deviation Score)¹⁰. De este modo, el rango de referencia que incluye el 95% de la población normal se encuentra entre “-2 SDS y +2SDS”. Los resultados > 2 SDS son elevados y los < -2 SDS, bajos. La transformación de concentraciones en puntuaciones SDS es un cálculo sencillo una vez se tiene bien establecida la población de referencia. Debido a que las concentraciones de IGF-1 no siguen una distribución normal o gaussiana, en primer lugar es necesario aplicar una transformación logarítmica para normalizarla (también se puede realizar transformaciones cuadráticas o exponenciales, con idénticos resultados). En este punto, la fórmula a aplicar es: $SDS\ IGF-1 = (\ln\ IGF-1\ paciente - \ln\ IGF-1\ media\ en\ controles) / desviación\ estándar\ de\ la\ distribución\ de\ IGF-1\ en\ controles$. Existen también modelos matemáticos para obtener el cálculo de SDS, que aplican una ecuación polinómica, obtenida a partir de los valores en la población de referencia, que tiene en cuenta la edad, el sexo y el estadio puberal^{11,12}.

FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA DE TIPO I (IGF-I)

La IGF-1 circula en su mayor parte unida a IGFBP-3 y otra proteína llamada subunidad acidolábil (PM 88 kDa) con las que forma un complejo ternario. Las 3 proteínas del complejo ternario son de producción fundamentalmente hepática y están reguladas por la GH, por lo que la medida de su concentración plasmática es un reflejo del estado de secreción de GH. En los déficit de GH se hallan disminuidos, mientras que

en la acromegalia se encuentran muy elevados. Sin embargo, aunque la hormona de crecimiento es el principal regulador, existen otros factores que afectan a las concentraciones plasmáticas y tisulares de IGF-I. Entre ellos cabe destacar la desnutrición, que produce una disminución del 50% de la producción hepática de IGF-I, las enfermedades crónicas, los estados catabólicos, la edad, el sexo (en relación con la producción de esteroides gonadales) y el grado de adiposidad¹³. Se habrá de tener en consideración todos estos aspectos para interpretar las concentraciones de IGF-I.

Determinación de IGF-I en plasma

Las concentraciones plasmáticas de IGF-I se determinan mediante inmunoanálisis que pueden ser competitivos, o más frecuentemente inmunométricos. Utilizan antisueros policlonales o anticuerpos monoclonales y se detecta mediante señal isotópica (I-125), enzimática (ELISA) o quimioluminiscente¹⁴. La mayor parte de los inmunoanálisis comercializados están calibrados por el patrón internacional World Health Organization International Reference Preparation (WHO IRP) 87/518. Esto por un lado representa una ventaja, ya que supone una cierta homogeneidad entre inmunoanálisis, pero en contrapartida se trata de una preparación de poca pureza, que contiene una molécula de IGF modificada, cuyo peso molecular no coincide con el de la IGF-I recombinante humana¹⁵.

El principal problema que presenta la determinación de IGF deriva de su unión a proteínas transportadoras de alta afinidad que interfieren en la unión con los anticuerpos del inmunoanálisis¹⁶. Se utilizan diferentes métodos de extracción para separar las IGF de sus proteínas transportadoras, con eficiencia variable¹⁷: cromatografía de gel filtración con columna de Sephadex, cromatografía en fase sólida (SPE), precipitación con ácido etanol, bloqueo de IGFBP con exceso de IGF-II, y la ultracentrifugación, entre otros. La cromatografía de gel filtración con columna de Sephadex es el método de referencia aunque, debido a su complejidad metodológica y el gran volumen de muestra necesario, no es aplicable en el laboratorio clínico. La precipitación con ácido etanol es el más utilizado en inmunoanálisis manuales, mientras que el bloqueo de IGFBP mediante exceso de IGF-II es el principal método adaptado a los inmunoanálisis automatizados.

Extracción mediante cromatografía de fase sólida (SPE) (cartuchos de octadecasilil-sílice C-18 Sep-Paks; Waters)

Su uso está menos extendido por su menor practicabilidad, ya que cada muestra ha de ser aplicada a una columna de extracción y, tras pasar diferentes soluciones de manera secuencial, se ha de recoger el fluido y llevar a sequedad con nitrógeno seco. La eficiencia de eliminación de las IGFBP es cercana al 100% pero, en cambio, parte del IGF presente en la muestra se pierde

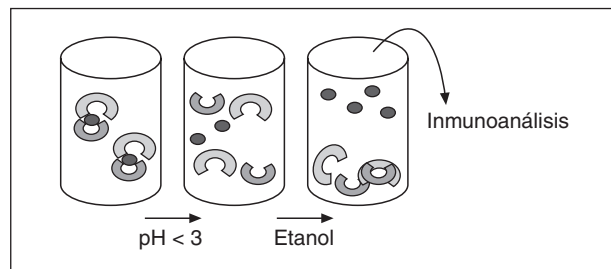


Fig. 1. Extracción mediante precipitación por ácido-etanol.

en el proceso de extracción, por lo que en el cálculo final de la concentración de IGF-I hay que aplicar un factor de corrección que presupone que la pérdida de IGF en las diferentes muestras es homogénea.

Precipitación con ácido-etanol

Descrita inicialmente por Daughaday¹⁸, se basa en el principio de que las proteínas de elevado peso molecular precipitan con etanol. Para ello, en primer lugar se somete la muestra a una extracción ácida (pH 3) que disociará de forma irreversible la unión del IGF a sus proteínas transportadoras. En una segunda etapa, se precipita las proteínas transportadoras (de mayor peso molecular), y el IGF-I queda en disolución (fig. 1). La recuperación de IGF-I tras este proceso de extracción es cercana al 100%. Sin embargo, la eliminación de IGFBP no es siempre completa, y quedan en el sobrenadante cantidades variables de estas proteínas. La eficiencia de este proceso de extracción es menor, sobre todo para la IGFBP-1 y la IGFBP-4. La cantidad de proteínas residuales en el sobrenadante puede ser variable y especialmente elevada en estados que se acompañan de grandes elevaciones de IGFBP-1, como la diabetes mellitus mal controlada o la desnutrición.

Separación funcional de IGF de las IGFBP y bloqueo mediante un exceso de IGF-II

Descrito inicialmente por Blum¹⁹, su uso se ha visto incrementado en los últimos años, principalmente por su facilidad de adaptación a inmunoanálisis automatizados. Este método consiste en disociar la IGF de su unión a las IGFBP mediante una acidificación del medio, seguida de una incubación con un exceso de IGF-II que bloqueará los lugares de unión de las IGFBP (fig. 2). Si se utiliza este sistema, es muy importante que el anticuerpo del inmunoanálisis no presente reactividad cruzada con IGF-II.

IGF-I NO LIGADA A PROTEÍNAS (IGF-I LIBRE)

El IGF-1 circula en su mayor parte unido a proteínas transportadoras, principalmente formando complejos ternarios estables con la IGFBP-3 y la subuni-

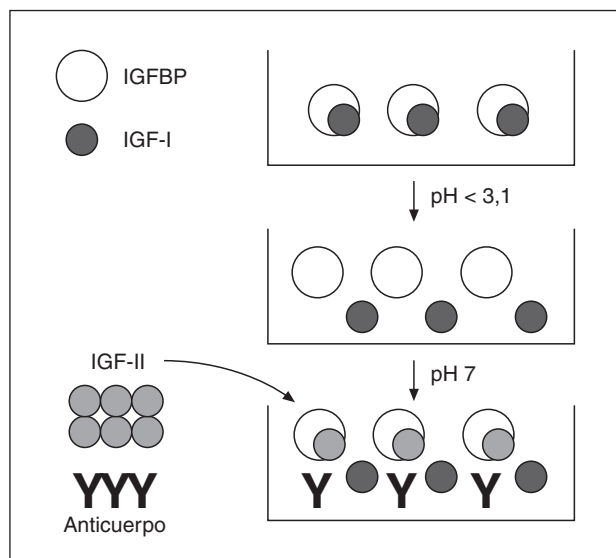


Fig. 2. Extracción y bloqueo de las IGFBP con exceso de IGF II.

dad acidolábil (SAL), pero también en forma de complejos binarios con las IGFBP que son más fácilmente disociables. En individuos sanos y en condiciones fisiológicas la concentración de IGF-1 libre muestra una estrecha correlación con las de IGF-1 total. Las variaciones observadas en IGF-1 en las diferentes etapas del desarrollo humano se asocian a cambios paralelos en la concentración de IGF-1 libre. En la acromegalia, el aumento de secreción de hormona de crecimiento estimula la producción IGF-I, pero también la de IGFBP-3 y de la SAL, con lo cual se mantiene la relación entre la IGF-I total y la libre. Lo mismo ocurre en el déficit de GH, en el que la disminución de IGF-I se asocia a una disminución paralela de IGFBP-3 y SAL. Sin embargo, en algunos estados fisiopatológicos la relación entre la IGF-I total y libre puede debilitarse o incluso desaparecer debido a variaciones en la producción de otras IGFbps, en especial de IGFBP-1 y IGFBP-2. Éste es el caso de la insuficiencia renal crónica, diabetes mellitus tipo 1 o tras ayuno prolongado en que se observa una disminución importante en la IGF-1 libre con poca o nula afectación de los niveles de IGF-I total. Por el contrario, en la obesidad las concentraciones de IGF-1 total suelen estar dentro de la normalidad, mientras que las concentraciones de IGF-1 libre están aumentadas lo que explica la inhibición de la secreción de GH en estos sujetos. Esta discrepancia entre el IGF-1 total que no aumenta de manera paralela al IGF-1 libre se debe a que en estos pacientes la producción de IGFBP-1 está prácticamente suprimida a causa del hiperinsulinismo.

Existen 2 métodos para determinar la fracción libre de IGF: el método de ultrafiltración mediante centrifugación e inmunoanálisis directos con anticuerpos específicos para la fracción no unida a proteína. La ultrafiltración mediante centrifugación es el método con-

siderado de referencia, ya que permite separar la IGF no unida sin alterar el equilibrio existente entre la fracción libre y la fracción unida a proteínas²⁰. Es un método laborioso que requiere realizarlo en laboratorios técnicamente cualificados. Se basa en la dilución previa de la muestra de suero con un tampón a pH 7,4, seguida de ultrafiltración mediante centrifugación a baja velocidad y a temperatura constante de 37 °C. La membrana de ultrafiltración deja pasar libremente la IGF libre, mientras que retiene las IGFbps. En una segunda etapa se cuantifica la concentración de IGF-I en el ultrafiltrado mediante un inmunoanálisis específico.

Los análisis inmunométricos directos, es decir, que no aislan la fracción libre de sus proteínas transportadoras, son métodos más sencillos y rápidos, lo que permite su aplicación a grandes series de muestras. Sin embargo, tienen el inconveniente de que además de la IGF libre miden porcentajes variables del IGF ligado a IGFBP formando complejos binarios²¹. En estos inmunoanálisis se realiza, en primer lugar, una incubación de la muestra con un anticuerpo monoclonal específico para IGF-1 libre que está unido a una fase sólida, y tras un lavado, se añade un segundo anticuerpo anti-IGF-1 marcado. A pesar de que la primera incubación se realiza a baja temperatura para minimizar la disociación de la fracción de IGF fácilmente disociable, se pueden producir diferentes grados de disociación, que estarán en función de cambios en la temperatura o el tiempo de incubación y se traducirá en aumentos variables de la concentración de IGF-1 libre medida.

PROTEÍNA DE TRANSPORTE DE IGF-3 (IGFBP-3)

La IGFBP-3 o subunidad β ácido estable del complejo ternario es la principal proteína transportadora de IGF. Está regulada por la GH y también por el propio IGF 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 pronunciadas⁸. Asimismo presenta concentraciones plasmáticas estables a lo largo del día, al igual que el IGF. Es un buen marcador de acción de la GH, y sus concentraciones se encuentran disminuidas en el déficit de GH y aumentadas en la acromegalia, aunque muestra menor sensibilidad diagnóstica que el IGF-I. Sin embargo, el hallazgo de concentraciones disminuidas puede ser útil en el diagnóstico del déficit de GH debido a su mayor especificidad diagnóstica.

Además de su función como proteína transportadora, la IGFBP-3 tiene funciones propias, independientes del IGF. Se ha demostrado que presenta una potente acción apoptótica y capacidad de inhibir la mitogénesis inducida por varios factores de crecimiento, probablemente mediando los efectos del factor de crecimiento transformador beta (TGF β)²². La molécula

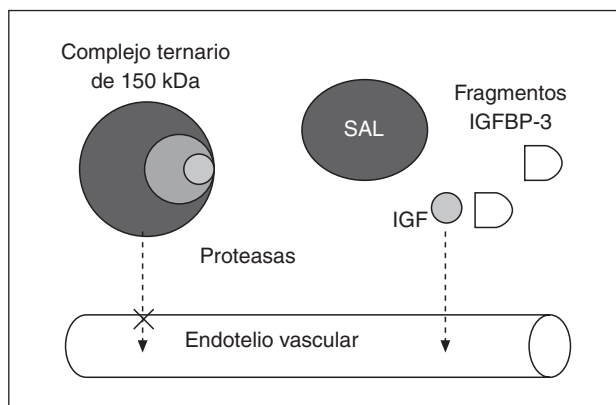


Fig. 3. Efecto de las proteasas en la biodisponibilidad del IGF. SAL: subunidad acidolábil.

la de IGFBP-3 sufre modificaciones postraslacionales como son la glucosilación y en especial la degradación proteolítica. Ésta se produce por acción de proteasas específicas presentes en diferentes tejidos que desdoblaron la IGFBP-3 nativa en fragmentos de menor tamaño que presentan, en general, menor afinidad por los anticuerpos dirigidos contra la forma intacta. Este fenómeno fue inicialmente detectado en mujeres embarazadas que presentaban concentraciones de IGFBP-3 inmunorreactiva disminuidas respecto a individuos normales, acompañadas por un aumento de fragmentos proteolíticos de menor tamaño (29-30 kDa) medidos por Ligand Immunoblot²³. Actualmente se conoce la existencia de diversas proteasas específicas de tejido (como el antígeno prostático específico [PSA], la plasmina, etc.) que generan fragmentos con capacidad de potenciar o inhibir la acción del IGF. La actividad proteolítica está incrementada en diversos estados fisiopatológicos, como la diabetes mellitus tipo 1, estados catabólicos, procesos infecciosos o el cáncer, entre otros, y supone un mecanismo de autorregulación de la biodisponibilidad del IGF (fig. 3).

Así, en la medición de IGFBP-3 por inmunoanálisis no es necesario ningún proceso de extracción previo como en el caso de los IGF, pero es muy importante saber si los anticuerpos utilizados reconocen únicamente la molécula intacta o también los diferentes fragmentos²⁴. Recientemente se ha aplicado un método inmunofuncional a la cuantificación de IGFBP-3 intacta. Este método, Ligand Immunofunctional Assay (LIFA), fue utilizado inicialmente por Strasburger para determinar las concentraciones plasmáticas de GH funcionalmente activa. Para la determinación de la IGFBP-3 intacta se realiza una extracción de los fragmentos proteolíticos con anticuerpos específicos, y posteriormente se utiliza IGF-I marcada en lugar de un segundo anticuerpo²⁵. En la tabla 1 se muestran los principales métodos de que disponemos para determinar IGFBP3 y su capacidad para detectar las diferentes formas o fragmentos moleculares.

SUBUNIDAD ACIDOLÁBIL

Es la subunidad α del complejo ternario de 150 kDa que transporta la mayor parte del IGF circulante. Se trata de una glucoproteína de 578 aminoácidos y un peso molecular de 85 kDa (63,3 kDa en su forma no glucosilada), producida fundamentalmente por el hepatocito²⁶. Su hallazgo se produjo al observar que la acidificación producía una disociación del complejo de 150 kDa en 3 componentes, uno de 7,5 kDa correspondiente el IGF estable, uno de aproximadamente 50 kDa correspondiente a la IGFBP-3 y un tercer componente que correspondía a una proteína de mayor peso molecular. Esta proteína, que se denominó subunidad acidolábil, se une específicamente a la IGFBP-3 unida a IGF y su unión a la IGFBP-3 induce cambios conformacionales que aumentan la afinidad de ésta por el IGF. También puede unirse a la IGFBP-5 y formar junto a los IGF complejos ternarios. Está regulada principalmente por la GH y su función principal parece ser incrementar el tamaño molecular del complejo IGF+IGFBP3 para limitar su acceso al espacio extravascular. La SAL circula formando complejos ternarios y también en forma libre, la forma mayoritaria.

La determinación de SAL en plasma se ha visto dificultada por varios factores: por un lado, su estructura tiene gran homología con otras proteínas séricas y las secuencias de aminoácidos más distintivas se hallan en su estado natural en zonas no accesibles de la molécula. Así pues, ha sido difícil generar anticuerpos específicos sin reactividad cruzada frente a proteínas análogas, y ha hecho necesario realizar pretratamientos para desplegar la molécula y así favorecer el reconocimiento de las zonas características situadas en los extremos N terminal y C terminal por los anticuerpos²⁷.

FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA DE TIPO II (IGF-II)

Su determinación tiene menor interés en el diagnóstico clínico, ya que sus concentraciones plasmáticas no están reguladas directamente por la GH, por lo que no se considera un marcador de su acción. Las concentraciones de IGF-II presentan variaciones poco importantes durante el desarrollo. Son bajas en el recién nacido y aumentan ligeramente hasta la pubertad, momento a partir del cual permanecen invariables durante el resto de la vida. Tampoco se modifican de forma significativa en el déficit o el exceso de GH, aunque se han descrito concentraciones disminuidas en el déficit de GH y aumentadas en la acromegalia²⁸. Se une con gran afinidad al receptor de IGF, el IGF-IR y al receptor IGF-II-manosa 6 fosfato, del que no se conoce su acción pero que al parecer tiene parte esencial en la regulación del propio IGF-II. Asimismo, el IGF-II muestra gran afinidad por la isoforma A del receptor de la insulina (IR-A), que se expresa especialmente en

TABLA 1. Principales métodos para determinar IGFBP-3 y su capacidad para detectar las diferentes formas o fragmentos moleculares

Western blot
Western ligand blot: sólo IGFBP-3 intacta
Western immunoblot: IGFBP-3 intacta y fragmentos
Immunoanálisis
Competitivos: utilizan antisueros policlonales que reconocen la IGFBP-3 intacta y sus fragmentos
Inmunométricos: dependiendo de la especificidad de los anticuerpos pueden medir la molécula intacta, los fragmentos o ambas fracciones
Ligand Inmuno Functional Assay (LIFA)
Extracción previa de fragmentos proteolíticos seguido de immunoanálisis para cuantificar IGFBP-3 intacta que utiliza IGF-I marcada en lugar de un segundo anticuerpo

células fetales y en células cancerosas, por lo que se lo ha implicado en el desarrollo fetal y de algunos cánceres.

En algunos tumores existe una sobreexpresión de IGF-II y del receptor IGF-IR, lo que produce la estimulación de la proliferación de las células cancerosas mediante un mecanismo autocrino. En los tejidos normales la IGF-II se transcribe a partir del alelo paterno, mientras que el alelo materno está silenciado por un mecanismo conocido como *imprinting* genómico. La activación del alelo materno puede dar lugar a carcinogénesis, como es el caso del rhabdomyosarcoma o el tumor de Wilms²⁹. En algunos tumores de origen mesenquimal que cursan con hipoglucemia hay una producción inadecuada de IGF-II. Estos tumores producen una forma inmadura de IGF-II llamada también *big IGF-II*. Esta forma anómala no puede unirse a la IGFBP-3 ni a la SAL, sino que circula en plasma unida a la IGFBP-2 en forma de complejos fácilmente dissociables que facilita su acceso a los tejidos diana y su unión al receptor. De este modo, la molécula de IGF-II que mantiene intacta su actividad biológica estimula la captación de glucosa por el músculo e inhibe la producción hepática de glucosa, lo que da lugar a hipoglucemia. La IGF-II inhibe la secreción de GH y disminuyen consecuentemente las concentraciones de IGF-I, IGFBP-3 y SAL. Sin embargo, en estos pacientes, las concentraciones plasmáticas de IGF-II no siempre están aumentadas, ya que fundamentalmente hay un aumento de la biodisponibilidad de la IGF-II que no siempre se traduce en concentraciones plasmáticas elevadas. Por otro lado, algunos immunoanálisis no son capaces de reconocer la molécula anómala de IGF-II, por lo que podemos hallar concentraciones plasmáticas normales o incluso disminuidas debido a la falta de inmunorreactividad³⁰.

La determinación de IGF-II se realiza mediante immunoanálisis y presenta los mismos problemas relacionados con la unión a las proteínas transportadoras que el IGF-I. Se pueden utilizar los mismos métodos para la extracción y separación de proteínas que los descritos para IGF-I. En el caso de utilizar el método de separación funcional, el bloqueo se hará mediante un exceso de IGF-I. El principal inconveniente en este caso es que algunas IGFBP (las IGFBP-2, 5 y 6) tienen mucha menor afinidad para IGF-I, y la separación

podría no ser completa. Después de la separación de las proteínas transportadoras se realizará un immunoanálisis específico para IGF-II.

FACTORES PREANALÍTICOS. ESTABILIDAD DE LAS MUESTRAS

Se puede utilizar muestras de suero o plasma (heparina o EDTA) para determinar los IGF y las IGFBP, pero los resultados obtenidos con los diferentes especímenes varían significativamente. Así, es importante utilizar el mismo espécimen con el que se han realizado los valores de referencia. En general las concentraciones de IGF-I medidas en muestras de suero son un 10% más elevadas que las obtenidas en plasma. Las diferencias en IGFBP-3 son inferiores (alrededor del 5%), pero algunas proteínas transportadoras presentan variaciones de hasta un 80% en función del espécimen utilizado³¹.

Las concentraciones en suero o plasma de IGF-I, IGF-II y IGFBP-3 son relativamente estables y no varían significativamente tras someter las muestras a 5 ciclos de "congelación-descongelación" siempre que no permanezcan mucho tiempo a temperatura ambiente. Se ha demostrado buena estabilidad del IGF-I en muestras de suero mantenidas a -70 °C durante años, pero, en cambio, se han observado resultados discrepantes en muestras almacenadas a -20 °C, con variaciones que dependen del immunoanálisis utilizado³².

UTILIDAD DE LA DETERMINACIÓN DE IGF E IGFBP EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

Aunque IGF-1, IGFBP-3, IGFBP-5 y SAL están reguladas por la GH, la medida de las concentraciones plasmáticas de IGF-I es el principal parámetro utilizado en el diagnóstico y la monitorización del tratamiento tanto del déficit de GH como de la acromegalia. Ante la sospecha de déficit de GH basada en datos clínicos (talla baja y velocidad de crecimiento disminuida en los niños; presencia de adenoma u otra lesión hipofisaria en el adulto), el diagnóstico se realiza fundamentalmente sobre la base de la falta de respuesta de la GH a las pruebas de estimulación^{33,34}. La IGF-1

total es el marcador bioquímico de acción de la GH más útil en el diagnóstico, aunque las concentraciones dentro del rango normal por edad y sexo no excluyen el diagnóstico de déficit de GH³⁵. El hallazgo de concentraciones de IGF-1 por debajo del rango normal en pacientes con sospecha de déficit de GH apoya el diagnóstico, si se excluye otras causas conocidas de descenso de las concentraciones de IGF-1 sérico como las hepatopatías, la desnutrición, la diabetes mellitus mal controlada o el hipotiroidismo³⁶.

La determinación de las concentraciones de IGFBP-3 o de SAL no presenta ventajas sobre las de IGF-1, aunque el hallazgo de concentraciones disminuidas apoya el diagnóstico de DGH.

La determinación de IGF-1 libre no ofrece ventajas respecto a la determinación de IGF-1 total en la mayoría de los pacientes. Solamente en algunas circunstancias, en que hay alteraciones significativas de proteínas transportadoras distintas de la IGFBP-3, su determinación puede ser de utilidad clínica³⁷, como es el caso de los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 o los pacientes desnutridos en los que la gran disminución de la producción de IGF-1 no se refleja suficientemente en las concentraciones totales, debido al aumento concomitante de IGFBP-1. En los tumores mesenquimales asociados a hipoglucemia, las concentraciones de IGF-1 y IGF-II libre están muy aumentadas, mientras que la fracción total, unida principalmente a IGFBP-2, está disminuida. En el caso de insuficiencia renal crónica la acumulación de IGFBP-3 en plasma se traduce en concentraciones de IGF falsamente elevadas que no reflejan el estado real del eje somatotrofo. Los análogos de la somatostatina de acción prolongada tiene un efecto inhibitorio en la producción de IGF-1, pero estimulan la síntesis de IGFBP-1, por lo que en algunos casos las concentraciones de IGF-1 total pueden verse falsamente elevadas. En este caso también puede ser útil la determinación de la fracción libre.

Ante la sospecha de acromegalia, los criterios de consenso incluyen que el hallazgo de concentraciones de GH < 0,4 ng/ml en valoración aislada o < 1 ng/ml en la prueba de sobrecarga oral de glucosa y concentraciones de IGF1 dentro del rango de referencia según sexo y edad, excluyen el diagnóstico de acromegalia³⁸.

Asimismo el IGF-1 es el principal parámetro bioquímico en la monitorización del tratamiento en los pacientes con acromegalia. Según los criterios de consenso en la monitorización del tratamiento de acromegalia, son indicativos de buen control la presencia de concentraciones de GH tras sobrecarga oral de glucosa < 1 ng/ml y concentraciones de IGF-1 dentro del rango normal según sexo y edad. Mientras que un nadir de GH durante la SOG > 1 ng/ml y una concentración de IGF1 elevada indican mal control o enfermedad residual.

El objetivo del tratamiento médico, quirúrgico o radioterápico es suprimir la secreción de GH y normali-

zar las concentraciones de IGF-1 total, es decir, que se sitúen dentro del rango establecido para individuos de la misma edad y sexo. En general el éxito o el fracaso del tratamiento se reflejan en las concentraciones de GH y de IGF-1. Sin embargo, hay ocasiones en que hay discrepancia entre los efectos del tratamiento en las concentraciones de GH y en las de IGF-1.

Las concentraciones séricas de IGF-I reflejan la secreción de GH integrada. Existe una relación directa entre la concentración promedio integrada de GH 24 horas y las concentraciones plasmáticas de IGF-1. Se trata de una relación curvilínea que llega a una meseta a concentraciones de GH superiores a 20 ng/ml. A partir de este punto, los incrementos de la GH no se asocian a incrementos paralelos en la concentración de IGF-1. Hay que tener en cuenta este hecho al tratar a pacientes con concentraciones medias de GH muy elevadas, que en tratamiento pueden mostrar disminuciones importantes de la concentración de GH sin apenas variar su concentración de IGF-1. También hay que tener en cuenta las diferencias entre sexos a la hora de interpretar la relación entre GH y IGF-1, ya que para una misma concentración de GH las concentraciones de IGF-1 son más bajas en el sexo femenino³⁹.

Una de las situaciones en que se observa discrepancias en la relación entre GH y IGF-I es en pacientes tratados con radioterapia hipofisaria, en los que se logra suprimir la secreción de GH en un alto porcentaje de pacientes, mientras que la normalización de las concentraciones de IGF-1 se consigue en mucha menor proporción⁴⁰.

Recientemente la utilización de antagonistas del receptor de la GH han demostrado gran efectividad en el tratamiento de la acromegalia⁴¹. Este fármaco tiene un mecanismo de acción completamente diferente de los otros tratamientos dirigidos a suprimir la secreción de GH. Los antagonistas del receptor al unirse al receptor de la GH bloquean su acción, lo que se traduce en la disminución de las concentraciones de IGF-1 y de otros péptidos regulados por la GH y en la mejoría de los síntomas y signos clínicos. Sin embargo, las concentraciones plasmáticas de GH no disminuyen por lo que en los pacientes tratados con Pegvisomat, la valoración bioquímica del efecto del tratamiento se basa en la monitorización de las concentraciones de IGF-1 plasmático⁴². A fin de evitar un exceso de tratamiento que podría provocar un déficit de GH funcional, se ha propuesto que un objetivo razonable sería mantener las concentraciones de IGF-1 por encima del percentil 95 de las concentraciones observadas en pacientes con déficit de GH y por debajo del percentil 95 en individuos sanos de la misma edad y sexo⁴³.

BIBLIOGRAFÍA

1. 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.

2. Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG. The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev.* 1999;20:761-87.
3. Argente J, Barrios V, Pozo J, Muñoz MT, Hervas F, Stene M, et al. 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.
4. Andrade Olivé MA, García-Mayor RV, González Lestón D, Rodríguez Sousa T, Segura Domínguez A, Álvarez-Novoa R, et al. Serum insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 and IGF-I levels during childhood and adolescence. A cross-sectional study. *Pediatr Res.* 1995;38:149-55.
5. Juul A, Bang P, Hertel NT, Main K, Dalgaard P, Jorgensen K, et al. Serum insulin-like growth factor-I in 1,030 healthy children, adolescents, and adults: relation to age, sex, stage of puberty, testicular size, and body mass index. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;78:744-52.
6. Bravant G, Von zur Muhlen A, Wuster C, Ranke MB, Kratzsch J, Kiess W, et al. Serum Insulin-like growth factor I reference values for an automated chemiluminescence immunoassay system: results from a multicentre study. *Horm Res.* 2003;60:53-60.
7. Landin-Wilhelmsen K, Wilhelmsen L, Lappas G, Rosen T, Lindstedt G, Lundberg PA, et al. Serum insulin-like growth factor I in a random population sample of men and women: relation to age, sex, smoking habits, coffee consumption and physical activity, blood pressure and concentrations of plasma lipids, fibrinogen, parathyroid hormone and osteocalcin. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1994;41:351-7.
8. Juul A, Dalgaard P, Blum WF, Bang P, Hall K, Michaelsen KF, 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.
9. Juul A, Holm K, Kastrup KW, Pedersen SA, Michaelsen KF, Scheike T, et al. Free insulin-like growth factor I serum levels in 1,430 healthy children and adults, and its diagnostic value in patients suspected of growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:2497-502.
10. Granada ML, Murillo J, Lucas A, Salinas I, Llopis MA, Castells I, et al. Diagnostic efficiency of serum IGF-I, IGF-binding protein-3 (IGFBP-3), IGF-I/IGFBP-3 molar ratio and urinary GH measurements in the diagnosis of adult GH deficiency: importance of an appropriate reference population. *Eur J Endocrinol.* 2000. 143:243-53.
11. Löfqvist C, Andersson E, Geland L, Rosberg S, Blum WF, Albertsson Wikland K. Reference values for IGF-I throughout Childhood and adolescence: a model that accounts simultaneously for the effect of gender, age, and puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:5870-6.
12. Löfqvist C, Andersson E, Geland L, Rosberg S, Hulthen L, Blum WF, et al. Reference Values for Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein-3 (IGFBP-3) and the Ratio of Insulin-Like Growth Factor-I to IGFBP-3 throughout Childhood and Adolescence. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:1420-7.
13. Gomez JM, Maravall FJ, Gomez N, Navarro MA, Casamitjana R, Soler J, et al. The IGF-I system component concentrations that decrease with ageing are lower in obesity in relationship to body mass index and body fat. *Growth Horm IGF Res.* 2004;14:91-6.
14. Clemmons DR. Commercial assays available for insulin-like growth I and their use in diagnosing growth hormone deficiency. *Horm Res.* 2001;55 Suppl 2:73-9.
15. Quamby 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.
16. 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.
17. 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.
18. Daughaday WH, Kapdiaq M, Mariz I. Serum somatomedin binding proteins: physiologic significance and interference in radioimmunoassays. *J Lab Clin Med.* 1987;109:355-63.
19. Blum WF, Breier BH. Radioimmunoassays for IGFs and IGFBPs. *Growth Regul.* 1994;4 Suppl 1:1-19.
20. Frystyk J, Skjærbaek C, Dinesen B, Ørskov H. Free insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) in human serum. *FEBS Lett.* 1994;348:185-91.
21. Frystyk J, Ivarsen P, Støving 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.
22. Rajah R, Valentinis B, Cohen P. Insulin-like growth factor-binding protein-3 induces apoptosis and mediates the effects of transforming growth factor- β on programmed cell death through a p53- and IGF- independent mechanism. *J Biol Chem.* 1997;272:12181-4.
23. 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.
24. Diamandi A, Mistry J, Krishna RG, Khosravi J. Immunoassay of insulin-like growth factor-binding protein-3 (IGFBP-3): new means to quantifying IGFBP-3 proteolysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:2327-33.
25. Lassare C, Binous M. Measurement of intact insulin-like growth factor-binding protein-3 in human plasma using a ligand immunofunctional assay. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:1260-6.
26. Baxter RC. Characterization of the acid-labile subunit of the growth hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein complex. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988;67:265-72.
27. Morrison KM, Wu Z, Bidlingmaier M, Strasburger CJ. Findings and theoretical considerations on the usefulness of the acid-labile subunit in the monitoring of acromegaly. *Growth hormone & IGF Research.* 2001;Suppl A:S61-3.
28. Renehan AG, Toogood AA, Ryder WD, Jones J, Potten CS, O'Dwyer ST, et al. Paradoxical elevations in serum IGF-II and IGF binding protein-2 in acromegaly: insights into the regulation of these peptides. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2001;55:469-75.
29. Le Roith D, Butler AA. Insulin-like growth factors in pediatric health and disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:4355-61.
30. Baxter RC, Daughaday WH. Impaired formation of the ternary insulin-like growth factor-binding protein complex in patients with hypoglycemia due to nonislet cell tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991;73:696-702.
31. Yu H, Mistry J, Nicar MJ, Khosravi MJ, Diamandis A, Van Doorn J, et al. Insulin-like growth factors (IGF-I, free IGF-I, and IGF-II) and insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP-2, IGFBP-3, IGFBP-6, and ALS) in blood circulation. *J Clin Lab Analysis.* 1999;13:166-72.
32. Khosravi J, Diamandi A, Bodani U, Khaja N, Krishna RG. Pitfalls of immunoassay and simple for IGF-I: comparison of different assay methodologies using various fresh and stored serum samples. *Clin Chem.* 2005;38:659-66.

33. Casamitjana R, Mauri M; Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Comisión de Hormonas. Diagnóstico bioquímico del retraso de crecimiento. *Quim Clin.* 1997;16:36-42.
34. Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of GH deficiency in childhood and adolescence: summary statement of the GH Research Society. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85:3990-3.
35. Shalet SM, Toogood A, Rahim A, Brennan BM. The diagnosis of growth hormone deficiency in children and adults. *Endocr Rev.* 1998;19:203-23.
36. Consensus guidelines for the diagnosis and treatment of adults with GH deficiency: summary statement of the GH Research Society workshop on adult growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:379.
37. Frystyk J. Use of free and total IGF assays in clinical practice and research. En: Strasburger CJ, editor. *Pituitary and periphery: communication in and out.* Trowbridge: BioScientifica, The Cromwell Press; 2003. p. 175-91.
38. Giustina A, Barkan A, Casanueva FF, Cavagnini F, Frohman L, Ho K, et al. Criteria for cure of acromegaly: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:526-9.
39. Parkinson C, Ryder WD, Trainer PJ. The relationship between serum GH and serum IGF-I in acromegaly is gender-specific. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:5240-4
40. Barkan AL, Halasz I, Dornfeld KJ, Jaffe CA, DeMott R, Chandler WF, et al. Pituitary irradiation is ineffective in normalizing plasma insulin-like growth factor I in patients with acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:3187-91.
41. Thorner MO, Strasburger CJ, Wu Z, Straume M, Bidlingmaier M, Pezzoli SS, et al. Growth hormone (GH) receptor blockade with a PEG-modified GH (B2036-PEG) lowers serum insulin-like growth factor-I but does not acutely stimulate serum GH. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84:2098-103.
42. Biochemical assessment and long-term monitoring in patients with acromegaly: statement from a joint consensus conference of the Growth Hormone Research Society and the Pituitary Society. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:3099-102.
43. Mukherjee A, Monson JP, Jonsson PJ, Trainer PJ, Shalet SM. Seeking the optimal target range for insulin-like growth factor I during the treatment of adult growth hormone disorders. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:5865-70.