

Rojas Rodríguez, Neide Yeline

Evaluación de dos ensayos quimioluminiscentes automatizados para la medida de IGF-I e IGFBP3

2021

Instituto: Ciencias de la Salud

Carrera: Bioquímica



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución – no comercial – sin obra derivada 4.0
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Documento descargado de RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital de la Universidad Nacional Arturo Jauretche

Cita recomendada:

Rojas Rodríguez, N. Y. (2021) Evaluación de dos ensayos quimioluminiscentes automatizados para la medida de IGF-I e IGFBP3 [tesis de grado Universidad Nacional Arturo Jauretche]

Disponible en RID - UNAJ Repositorio Institucional Digital UNAJ <https://biblioteca.unaj.edu.ar/rid-unaj-repositorio-institucional-digital-unaj>

TRABAJO FINAL

EVALUACIÓN DE DOS ENSAYOS QUIMIOLUMINISCENTES AUTOMATIZADOS PARA LA MEDIDA DE INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR I (IGF-I) E INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR BINDING PROTEIN 3 (IGFBP3)

Estudiante: Rojas Rodríguez, Neide Yeline

Directora: bioq. Tournier, Andrea

Fecha de entrega: 12 de Agosto

INSTITUTO DE CIENCIA DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA

2021

❖ Resumen

Introducción:

Insulin-like growth factor I (IGF-I) es un factor de crecimiento relacionado estructuralmente a la insulina, se produce en respuesta a la hormona de crecimiento (GH) e induce las actividades celulares subsecuentes, particularmente el crecimiento en longitud del hueso. La insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP3) es la principal proteína transportadora de IGF-I y la más dependiente de GH lo que permite obtener una idea aproximada de los valores circulantes de IGF-I, así como del estado de secreción-acción de GH. Tanto IGF-I como IGFBP-3 se miden en conjunto con GH para la evaluación y seguimiento de los trastornos del crecimiento. Su determinación se ve influenciada por diversos aspectos, existiendo discrepancias en los resultados obtenidos con los distintos inmunoensayos.

Objetivos:

Comparar dos inmunoensayos comerciales (Immulite® y Maglumi®) de diagnóstico in vitro para IGF-1 y IGF-BP3 utilizando muestras de pacientes a partir de la introducción en el mercado de una nueva plataforma automatizada. Evaluar la correlación y concordancia entre ambos.

Materiales y métodos:

Se midieron las concentraciones de IGF-I e IGFBP-3 por ambos métodos en 57 muestras de niños de ambos sexos con edades comprendidas entre 6 meses y 14 años que consultaron por retraso en el crecimiento o baja talla en el Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría Sor Maria Ludovica de la Plata, Argentina, durante el año 2020.

Análisis estadísticos: Se utilizó el análisis Bland-Altman o gráfico de diferencia en función del promedio y el método de regresión de Deming. Se calculó la pendiente, la intersección en el origen y el coeficiente de correlación, todo con un intervalo de confianza del 95% (IC=95%).

Resultado:

En la comparación de métodos mediante el procedimiento de regresión de Deming, la recta obtenida para IGF-I fue: $y = -13,52 + 1,146x$ y para IGFBP-3 $y = 0,239 + 1,047x$. El coeficiente de correlación para IGF-I es $r = 0,96$ y para IGFBP-3 $r = 0,84$.

Discusión y conclusión:

Según el análisis estadístico IGFBP3 medido por ambos métodos presentó un error sistemático constante de 0,5, mientras que el ensayo de IGF-I presentó un error sistemático proporcional. Existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores de IGF-I e IGFBP-3 medidos por ambos métodos, aunque clínicamente irrelevante. Los valores absolutos de IGF-I e IGFBP-3 por ambas metodologías fueron comparables, siendo ambas técnicas adecuadas para su utilización.

PÁGINAS

✓ Abreviaturas -----	4
✓ Introducción general -----	5
✓ Introducción específica -----	7
a) Eje hipotálamo-hipófisis-GH-----	7
b) Regulación de la GH-----	8
c) Transporte de IGF-I en la circulación-----	9
d) Regulación de la producción del IGF-I-----	11
e) Acción fisiológica de IGF-I-----	11
f) Actividad específica de IGF-I-----	12
g) Concentración plasmática del IGF-I e IGFBP-3-----	13
h) Factor a considerar en relación a la medición de la concentración de IGF-I en el suero-----	14
1) Variabilidad biológica interindividual de la IGF-I-----	14
2) Variabilidad biológica intraindividual de la IGF-I-----	14
3) Estado nutricional-----	15
4) Separador de la proteína transportadora-----	15
i) Evaluación del eje IGF-I e IGFBP-3-----	17
✓ Objetivos-----	19
✓ Materiales y métodos-----	20
1) Tamaño de la muestra-----	20
2) Método de dosaje-----	20
3) Plan de análisis estadísticos-----	22
✓ Resultado-----	23
✓ Discusión -----	28
✓ Conclusión -----	29
✓ Referencias bibliográficas-----	30

❖ Abreviaturas

- IGF-I: Factor de crecimiento insulino similar tipo 1
- IGFBP-3: proteína transportadora de IGF-I
- GH: hormona de crecimiento
- GHD: déficit de hormona de crecimiento
- GHBP: proteína transportadora de GH
- RGH: receptor de GH
- ALS: subunidad ácido lábil
- SS: somatotropina
- aa: aminoácidos
- ISS: talla baja idiopática
- KDa: kilo dalton
- CLIA: chemiluminescent Immuno Assay
- IS: internacional de estándar
- IRP: intervalo de referencia
- N: cantidad de variable
- IC: intervalo de confianza
- SD: desviación estándar

❖ Introducción general

La GH o la somatotropina es una molécula polipeptídica de cadena sencilla de 191 aa, la cual es sintetizada, almacenada y secretada por las células somatotrofas de la hipófisis anterior. La principal forma circulante de la GH (75%) es de 22 Kda. La hormona hipotalámica liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH) estimula su secreción, mientras que la somatostatina o factor inhibidor de la liberación de somatotropina (SS), la inhibe (1).

En circulación la GH se une a su proteína de alta afinidad (GHBP), esta proteína se genera por el clivaje proteolítico del dominio extracelular del receptor de GH (RGH), la unión de la GH al GHBP activa la transcripción del gen IGF-I, gen IGFBP3 (principal proteína de transporte de IGFs) y del gen ALS (subunidad ácido lábil) en hígado. IGF-I, IGFBP3 y ALS forman un complejo ternario que estabiliza al IGF-I en circulación. Una de las funciones principales de la IGFBP3 es prolongar la vida media de IGF-I y regular su biodisponibilidad ya que la fracción libre de IGF-I es la biológicamente activa (2).

IGF-I es un factor de crecimiento relacionado estructuralmente a la insulina, se produce en respuesta a la GH. Tiene acción estimuladora del crecimiento, potencia la acción de la insulina y regula la proliferación celular, induce las actividades celulares subsecuentes, particularmente sobre el crecimiento del hueso. Ejerce un retrocontrol negativo sobre la secreción de la GH, a nivel hipofisario e hipotalámico. Es el principal marcador periférico de acción de la GH y es el que mejor se correlaciona con el estado secretor de GH en la vida posnatal. La medición de su concentración en el suero es útil principalmente para el seguimiento y la evaluación de los trastornos del crecimiento (3).

La IGFBP3 es la principal transportadora de IGF-I y la más dependiente de GH lo que permite obtener una idea aproximada de los valores circulantes de IGF-I, así como del estado de secreción-acción de GH. La medición de su concentración al igual que la IGF-I también es útil para el seguimiento y la evaluación de los trastornos del crecimiento (3,f).

La determinación de IGF-I y su proteína transportadora 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 (por ej., distintos métodos de extracción de la proteína transportadoras en el caso de la determinación de IGF-I) o la presencia de formas moleculares que han sufrido modificaciones postraslacionales (por ej., fosforilación, glucosilación o proteólisis en el caso de algunas IGFBP). Así pues, para poder valorar las concentraciones de IGF y péptidos relacionados, es necesario conocer los rangos de referencia obtenidos con el mismo método analítico en una población sana (4).

Un correcto resultado de IGF-I e IGFBP-3 es imprescindible para el diagnóstico y seguimiento de los distintos desordenes del crecimiento, y como predictor de respuesta al tratamiento en niños con GHD y talla baja idiopática (ISS). Es por lo tanto importante determinar si ambos métodos arrojan resultados equivalentes.

❖ Introducción específica

✓ Eje hipotálamo-hipofisis-GH

La hormona de crecimiento (GH, *growth hormone*) es una hormona proteica que es producida por la adenohipófisis o hipófisis anterior constituida por una sola cadena que esta codificada en el brazo largo del cromosoma 17 en la región (17q22-24). El gen codificante de la GH, denominado GH1, forma parte del conjunto genético de GH localizado en el brazo largo del cromosoma 17. El gen GH1 se expresa en las células somatotropas de la hipófisis anterior. Su producto primario es una prohormona de 217 aa que contiene en su extremo N-terminal un péptido señal necesario para su translocación al interior del retículo endoplásmico en donde se completa su procesamiento mediante la escisión del péptido señal, lo que da lugar a una proteína de 191 aa y 22 KDa que corresponde a la GH propiamente dicha y la más abundantes (*f*), como se esquematiza en la **figura 1**.

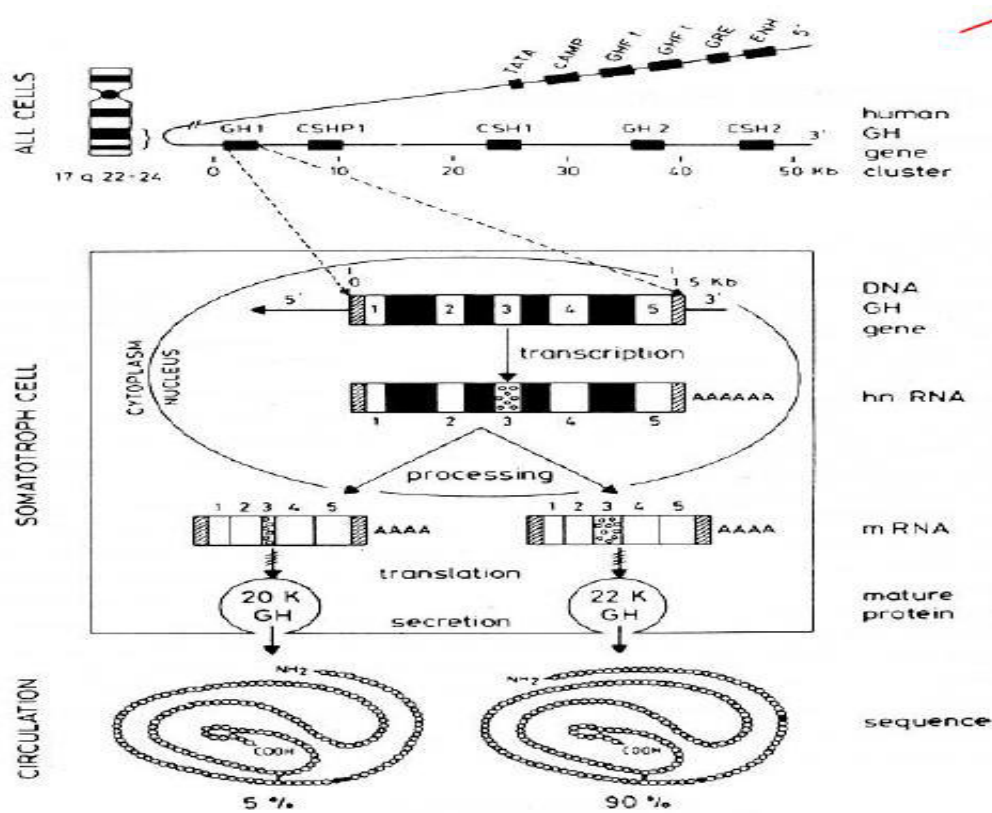


Figura 1. Representación esquemática de la expresión génica de la GH

✓ Regulación de la GH.

La regulación fundamental para mantener su nivel de concentración constante está dada por dos factores hipotalámicos que son: la hormona liberadora de GH (GHRH) y la somatostatina (SS), ambos están producidos por los núcleos neurosecretorios hipotalámicos y liberados en sangre venosa portal hipofisaria, son principales controladores de la secreción de la GH por las células somatotrópicas. Su patrón de secreción es pulsátil alcanzando su pico máximo durante la noche, especialmente durante la primera fase de sueño de onda lenta. Múltiples factores regulan la secreción de GH, como se esquematiza en la **figura 2** (1).

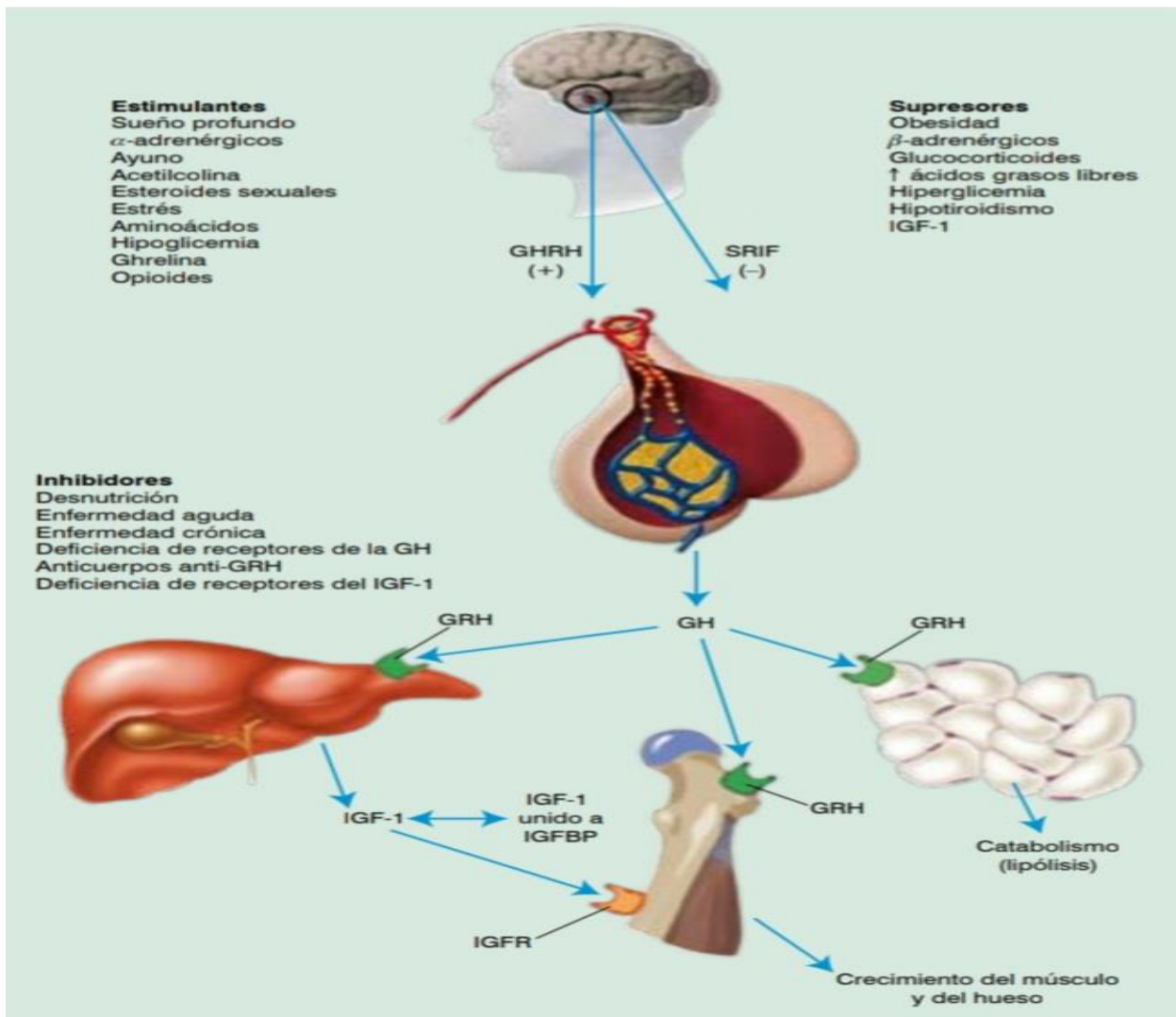


Figura 2: Eje de la hormona de crecimiento. Diagrama simplificado del eje GH-IGF que involucra las hormonas y factores hipotalámicos que controlan la liberación de GH hipofisaria, las proteínas de unión a la GH y su receptor, el IGF-I, y su unión a receptores específicos.

La GH se distribuye a través de la sangre hacia su tejido diana, entre los que se encuentra el hígado. Una vez allí, permite la secreción de IGF-I e IGF-2. Estas participan en el mecanismo de feedback negativo, donde IGF-I estimula la síntesis de somatostatina e inhibe la GHRH (5).

La GH es el principal regulador del crecimiento posnatal, posee importantes acciones metabólicas en diversos tejidos, sinérgicas o incluso antagónicas a las del factor de crecimiento, a semejanza de la insulina tipo I (IGF-I). La GH se vincula a su receptor (GHR) y vía de activación del sistema JAK-STAT, estimula especialmente en el hígado la producción de IGF-I, que se vincula a una de las seis proteínas transportadoras (IGFBPs), especialmente la IGFBP-3, y la subunidad ácido-lábil, formando el complejo ternario, que funciona como un reservorio circulante del IGF-I, impidiendo su rápido *clearance* (6).

✓ **Transporte de IGF-I en la circulación**

Después de ser sintetizado, el IGF-I es liberado a la circulación donde es transportado por sus IGFBPs. Solamente el 1% del IGF-I circula en forma libre ya que el 75% circula unida a la IGFBP-3, formando un complejo ternario al cual pertenecen el IGF-I/IGFBP-3/ALS que no puede atravesar el endotelio vascular. Las IGFBPs modulan la interacción de IGFs con sus receptores y por lo tanto controlan indirectamente su acción biológica. Es decir, cuando los IGFs se encuentran unidos a alguna de las IGFBPs no interaccionan con los receptores. Por otro lado, la unión de IGF-I con IGFBP-3 aumenta la vida media en circulación 10-30 minutos a 12 horas y reduce la biodisponibilidad a los sitios de unión del receptor presente en los tejidos. El otro 24% se encuentra unido al resto de la IGFBPs, fundamentalmente a la IGFBP-1 e IGFBP-2 que son de menor tamaño y sí son capaces de atravesar el endotelio vascular (7, 10).

Los IGFs actúan a través de un receptor tirosina quinasa (IGF-IR) que está ubicado en la superficie celular. Este receptor consiste en un heterotetramero compuesto de dos subunidades alfa extracelulares y dos subunidades beta de transmembrana, en cuya porción citoplasmática se encuentra su dominio quinásico. Si bien es cierto existe una alta homología entre la insulina y el IGF-I y, además, entre el receptor de insulina (IR) y el de

IGFs (IGF-IR), la afinidad IGF-I por su receptor es 100 a 1.000 veces mayor que la de insulina. Después de la autofosforilación IGF-IR, la proteína SHC (proteína que contiene SH2) es reclutada para el receptor y se fosforila en el residuo de tirosina. La proteína activada SHC se une al adaptador de GRB2 (receptor del factor de crecimiento proteína unidad-2), lo que permite el reclutamiento de SOS por el IRS. Este complejo permite la fosforilación de RAS. Una vez activado RAS, se inicia una serie de cascada de fosforilación secuencial que implica la serina/treonina quinasa Raf, MEK ½ (MAP quinasas quinasa), y ERK/1/2 (quinasa regulada por señales extracelulares). Esta vía de señalización IGF-IR (**figura 3**) actúa básicamente sobre el crecimiento, el desarrollo y la diferenciación celular, pero, en algunos casos, también puede regular el mecanismo de la apoptosis (8).

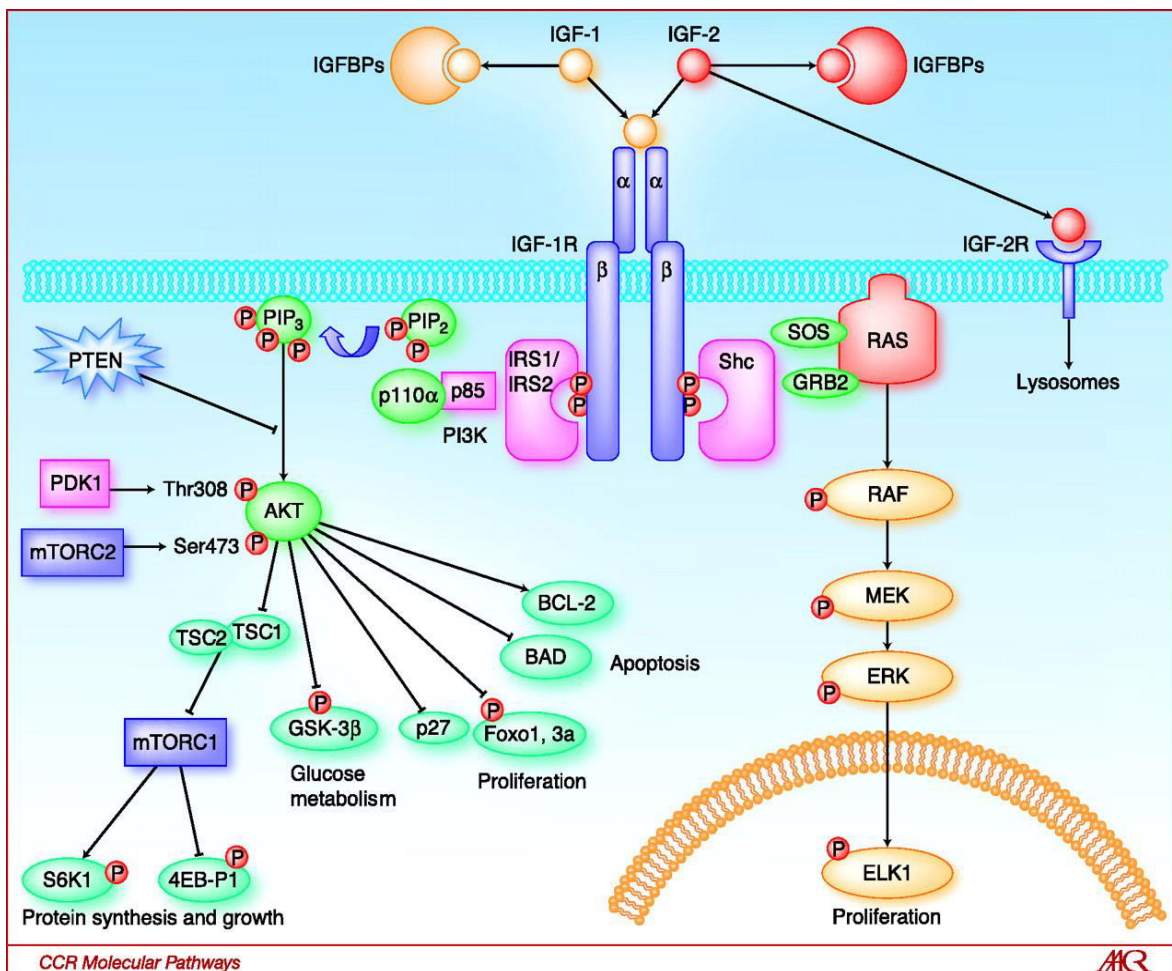


Figura 3: Receptor tirosina quinasa (IGF-IR)

✓ **Regulación de la producción del IGF-I.**

Más del 75% de la concentración sérica del IGF-I es producida por el hígado. El esqueleto es la segunda fuente de IGF-I, tanto por la síntesis *de novo* (por las células óseas) como por la liberación de IGF-I atrapado en la matriz proteica, que ocurre durante la fase de resorción. Los principales factores reguladores de la síntesis de IGF-I son la secreción GH y el estado nutricional. En esta línea, la concentración sérica del IGF-I ha sido utilizada clínicamente como un marcador subrogado del statu de GH en diversas enfermedades, como el déficit de GH (DGH) y la acromegalia, ya que refleja la secreción hipofisaria de GH. Además, diversos estados catabólicos (inmovilización prolongada, sepsis, desnutrición proteico-calórica, etc.) limitan la síntesis del IGF-I. Otra situación que se ha relacionado con una alteración de la síntesis y acción de IGF-I es el envejecimiento. Desde el nacimiento, el IGF-I aumenta de forma progresiva consiguiendo un pico máximo en la pubertad. Posteriormente, presenta una reducción progresiva relacionada con la edad que se debe a la disminución de los pulsos de GHRH y a descenso de la producción de esteroides sexuales. Además, las funciones de IGF-I en el tejido óseo pueden alterarse en otras situaciones patológicas como son las enfermedades tiroideas, las descompensaciones diabéticas, el tratamiento con glucocorticoides, etc., también por la disminución de la síntesis como por aumento de la producción de factores inhibidores, entre los que destacan las IGFBP-1 y 4 (9).

✓ **Acciones fisiológicas de IGF-1**

Los IGFs son factores de crecimiento que ejercen sus efectos biológicos en varios tipos de células, actúan por mecanismos autocrinos, paracrinos y endocrinos. Entre las actividades generales están (10):

- a. Ser agentes mitógenos (que promueve la mitosis o división celular), por tanto, favorecen la diferenciación y replicación celular.
- b. Activación de la incorporación de timidina a DNA lo cual favorece la síntesis del mismo.

- c. Incorporación de prolina en la colágena y sulfato en los proteoglicanos con lo cual se estimula el crecimiento del cartílago.
- d. Acción de tipo insulínica sobre el metabolismo glucídico, lipídico y proteínico de tejido conjuntivo, adiposo y fibroso. En el musculo estimulan el transporte de aminoácidos y la incorporación de glucosa en el glucógeno.
- e. Estimulación de la síntesis proteína y hormonal.

Actividad específica del IGF-I

El IGF-I tiene una gran variedad de actividades metabólicas en células y tejidos donde exista el receptor para el IGF-I. Las acciones biológicas que se presentan a continuación son específicas de IGF-I (10):

- I. Participa en la regulación del desarrollo perinatal. La síntesis de IGF-I se ha observado en varias especies en el estado embrionario.
- II. Tiene una función importante en el control de la secreción de la hormona del crecimiento al inhibir su liberación. Cuando baja la concentración de IGF-I se estimula la secreción de la GH.
- III. Protege a muchas células de la apoptosis. Como resultado es posible que células cancerosas productoras de IGF-I sean resistente a la apoptosis inducida por quimioterapia. Se ha demostrado que la formación de aductos DNA formados por los agentes anticancerígenos dexorubicina y paclitaxel disminuyen al administrar IGF-I. Este fenómeno puede deberse a la inhibición de la apoptosis o a una proliferación celular inducida por el IGF-I.
- IV. Tiene un papel específico en el funcionamiento cardiaco pues promueve el crecimiento del musculo cardiaco, aumenta la contractilidad y el volumen cardiaco.
- V. Aumenta el consumo de sodio y favorece el transporte de sodio en los túbulos renales.

Durante el embarazo, el IGF-I estimula la división celular y el crecimiento de los tejidos maternos, a la vez que estimulan los procesos anabólicos que dan como resultado el incremento del tejido graso, de las reservas de glucógeno hepático, así como el desarrollo de las glándulas mamarias entre otras modificaciones. En esencia el IGF-I tiene efectos

similares a los de la insulina sobre el musculo y la placenta al estimular el transporte de aminoácidos y glucosa, así como inhibir la lipólisis en el tejido adiposo. En posnatal el IGF-I es capaz de estimular el crecimiento del cartílago, la síntesis de ARN, de ADN y de proteínas; así como de estimular procesos anabólicos, el IGF-I juega un papel importante en el crecimiento como lo demuestra la estrecha correlación entre las concentraciones circulantes de este factor y la velocidad de crecimiento de los niños (7).

✓ **Concentraciones plasmáticas del IGF-I e IGFBP-3**

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. 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% por cada década de la vida, lo que se acompaña de una disminución paralela de las concentraciones plasmáticas de IGF-I. 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 edad (4).

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 este modo, durante la pubertad el IGF-I aumenta proporcionalmente más que la IGFBP-3, por lo que aumenta significativamente la relación molar IGF-I/IGFBP-3 coincidiendo con la máxima velocidad de crecimiento. Además, durante la pubertad no varían prácticamente ni IGF-II ni IGFBP-2, pero disminuyen progresivamente la concentración de IGFBP-1, por lo que hay un

aumento de la fracción libre de IGF-I. La determinación de IGF-I y su proteína transportadora en el laboratorio clínico se realiza mediante inmunoanálisis.

✓ **Factores a considerar en relación a la medición de la concentración de IGF-I en el suero**

La concentración de IGF-I en el suero se mide actualmente en un gran número de laboratorios clínicos. Sin embargo, para poder interpretar sus resultados de forma adecuada es necesario conocer una serie de factores inherentes a su propia fisiología, así como diferentes aspectos metodológicos que influyen en su medición.

1) Variabilidad biológica interindividual de la IGF-I

Las concentraciones de IGF-I presentan grandes variaciones en función de la edad, el sexo y el desarrollo puberal. Durante los primeros años de la vida las concentraciones son muy bajas, aumentando progresivamente durante la infancia hasta presentar un fuerte incremento al llegar a la pubertad, que se acompaña de un aumento paralelo de la secreción de GH y de esteroides gonadales. Sus concentraciones son máximas en el adulto joven y, a partir de entonces, durante la vida adulta se produce una disminución lenta y progresiva de las mismas. Las concentraciones de IGF-I son algo más elevadas en el sexo femenino, sobre todo en la pubertad, adelantándose en 1-2 años al pico máximo observado para los varones, debido fundamentalmente a las diferencias madurativas. Por el contrario, en adultos, el promedio e sus concentraciones en hombre es algo más elevado que en mujeres, aunque en muchos estudios estas diferencias no llegan a ser significativas (11,12).

2) Variabilidad biológica intraindividual de la IGF-I

Las concentraciones de IGF-I presenta una gran variabilidad intraindividual. En diversos estudios se ha observado que las concentraciones de IGF-I obtenidas en individuos sanos, en un periodo de tiempo comprendido entre 2 y 3 semanas, pueden variar entre el 10% y

36%. Teniendo presente esta gran variabilidad biológica, el diagnóstico debería llevarse a cabo tras realizar varias mediciones de esta magnitud a lo largo de un periodo de tiempo determinado y no a partir de un único resultado puntual, en especial, cuando las concentraciones de IGF-I se hallan cerca de los límites de decisión clínica. A diferencia de las concentraciones de GH en el suero, las concentraciones de IGF-I son relativamente estables a lo largo del día. No presentan ritmo circadiano ni fluctuaciones significativas relacionadas con la ingesta de alimentos (11).

3) Estado nutricional

El estado nutricional afecta considerablemente a las concentraciones de IGF-I y a algunas de sus proteínas transportadoras, en especial la proteína 1 enlazante del factor de crecimiento insulinoide (IGFBP-1). En situaciones de mal nutrición o ayuno prolongado, así como en estado catabólicos, diabetes mellitus descompensada, insuficiencia hepática o renal, se produce una resistencia a la acción de la GH que da lugar a que las concentraciones de IGF-I estén disminuidas (11).

4) Separación de las proteínas transportadoras

El IGF-I circula en su mayor parte unido a proteínas transportadoras de alta afinidad formando complejos de alto peso molecular, fundamentalmente con la IGFBP-3 y la ALS, de forma que para medir la concentración de IGF-I total es necesario realizar una separación previa. El método de referencia para separar el IGF-I de sus proteínas transportadoras es la cromatografía de exclusión molecular o de filtración en gel, que emplea una columna Sephadex® (columna rellena de una resina de dextrano) como fase estacionaria y una solución acuosa a pH ácido como fase móvil. Este método es muy laborioso y por consiguiente no es aplicable para la mayoría de los laboratorios clínicos, por lo que en la práctica clínica se ha utilizado diferentes métodos de extracción para separar los IGFs de sus proteínas transportadoras, con una eficiencia variable, como la extracción en fase sólida, la precipitación con ácido etanol o la ultracentrifugación, entre

otros. En la actualidad, el método más utilizado es la separación funcional con exceso de IGF-II, ya que se ha podido adaptar fácilmente a diferentes plataformas de inmunoanálisis automatizados. Este método consiste en acidificar el medio para romper el complejo ternario IGF/IGFBP/ALS, y añadir posteriormente un exceso de IGF-II para bloquear los lugares de unión de la IGFBP-3 (**figura 3**), quedando así el IGF-I libre de la muestra para que su concentración pueda ser medida. Si se utiliza este sistema, es muy importante que el anticuerpo del inmunoanálisis no presente reactividad cruzada con IGF-II (4, 11).

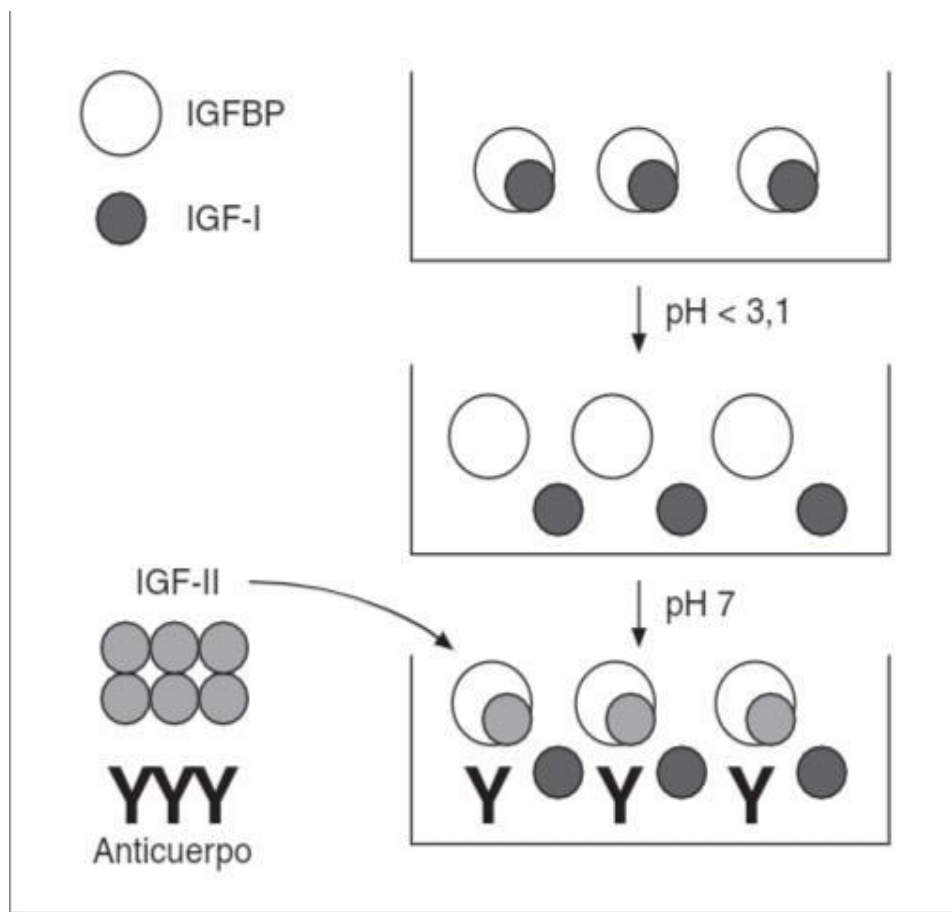


Figura 3: Extracción y bloqueo de las IGFBP con exceso de IGF-II

✓ Evaluación del eje IGF-I-IGFBP-3

Existen varias metodologías disponibles para evaluar el eje IGF-IGFBP:

- Métodos inmunológicos:
 - Dosaje de IGF-I (RIA, IRMA, DELFIA, ELISA, CLIA)
 - Dosaje de IGF-II (RIA, IRMA, CLIA)
 - Dosaje de IGFBP específicas (RIA, IRMA, CLIA, ELISA)
 - IGFBP cuali/cuantitativos (SDS-PAGE, *Binding capacity*)
 - Receptores de IGF

✚ El *dosaje inmunológico de IGF-I* resulta particularmente interesante debido a que el IGF-I es en gran medida dependiente de la GH. El dosaje de esta proteína sería útil en el diagnóstico y seguimiento de niños con deficiencia de GH. Para la interpretación de los resultados debe tenerse en cuenta que:

- A. La concentración sérica de IGF-1 es relativamente estable a lo largo del día, debido fundamentalmente a su asociación con IGFBP-3 y ALS (menos del 5% del IGF-1 circula en forma libre).
- B. La interpretación correcta de los valores séricos de IGF-1 requieren considerar la edad, el sexo y el estado nutricional del paciente.
- C. Los niveles séricos de IGF-1 se encuentran disminuidos en la mayoría de los pacientes (pero no en todos) con déficit de GH, malnutrición y síndrome de Laron.
- D. La concentración sérica de IGF-I está aumentada en los pacientes acromegálicos, debido al exceso de GH.
- E. Sin embargo, niños con déficit de crecimiento constitutivo (es decir, sin alteración en el eje GH/IGF) pueden tener valores de IGF-I bajos. Por consiguiente, este dato aislado no es diagnóstico, sino que debe analizarse juntamente con el resto de los datos del paciente (13).

✚ Dosaje *inmunológico de IGFBP-3* específicas:

La IGFBP-3 es la de mayor interés clínico por su dependencia de GH. En rigor, los niveles circulantes de IGFBP-3 se corresponden con los de IGF total (IGF-I + IGF-II), y éstos correlacionan a su vez con el sistema de la GH. La IGFBP-3 transporta aproximadamente el 90% de los IGF circulantes. Es la proteína transportadora de IGFs mayoritaria durante la vida post-natal. La concentración plasmática de la IGFBP-3 disminuye hasta un 80% en el hipopituitarismo y en la deficiencia de GH. De esta forma el dosaje de esta proteína sería útil en el diagnóstico y seguimiento de niños con deficiencia de GH. Por otro lado, aumenta 2-3 veces en pacientes acromegálicos, y post-inyección de GH. Los niveles de IGFBP-3 correlacionan con los de IGF-1, de tal manera que su concentración baja cuando el IGF-I disminuye. Así, el IGF-I parece ser el regulador más importante de los niveles de la IGFBP-3, siendo los efectos de la GH indirectos (es decir, mediados a través del IGF-1) (13).

❖ Objetivos

Objetivo general:

Comparar dos inmunoensayos comerciales (Immulite® y Maglumi®) de diagnóstico in vitro para IGF-1 y IGF-BP3 utilizando muestras de pacientes a partir de la introducción en el mercado de una nueva plataforma automatizada.

Objetivos específicos:

- Comparar las concentraciones de IGF-I e IGFBP-3 obtenidas mediante dos métodos automatizados por quimiluminiscencia comerciales “Immulite 2000 de Siemens” y “Maglumi 600 de Snibe”.
- Evaluar la correlación y concordancia entre ambos métodos.
- Determinar el sesgo entre los dos procedimientos.
- Establecer si brindan resultados equivalentes dentro del poder estadístico.

❖ Materiales y métodos

✓ **Tamaño de la muestra:**

Se analizaron 57 muestras de suero de pacientes de ambos sexos con edades comprendidas entre 6 meses y 14 años, que concurren durante el periodo establecido junio-octubre de 2020 a la consulta por retraso en el crecimiento o baja talla en el Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría Sor María Ludovica de la Plata, Argentina. Los niños fueron evaluados de acuerdo a criterios clínicos, auxológicos y bioquímicos indicados en las guías consenso para el diagnóstico tratamiento de DGH en la niñez y adolescencia (14). Se excluyeron otras causas de déficit de crecimiento, como hipotiroidismo, enfermedad sistémica crónica, síndrome de Turner y/o trastornos óseos.

✓ **Método de dosaje:**

Las determinaciones de IGF-I e IGFBP-3 séricos fueron realizadas utilizando dos inmunoensayos automatizados quimioluminiscentes (ICMA): Immulite Siemens y Maglumi 600 de Snibe.

Todos los ensayos se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

IMMULITE 2000 IGF-I: Se trata de un ensayo quimioluminiscente, en fase sólida totalmente automatizado y calibrado frente al estándar WHO 2nd IS 02/254. El ensayo requiere un pretratamiento para separar IGF-I del complejo ternario que forma con el componente ácido lábil y la proteína transportadora fundamentalmente IGFBP-3, esta separación se realiza automáticamente mediante una dilución 1:10 de las muestras con un diluyente ácido provisto en el kit. La IGF-I de la muestra prediluida y los anticuerpos anti-IGF-I policlonales de conejo unidos a una fosfatasa alcalina, forman un complejo tipo sándwich con otro anticuerpo monoclonal anti-IGF-I específico, murino unido a su vez a la bola de poliestireno.

Durante el periodo de incubación (60 minutos) a 37° C con agitación intermitente, la IGF-I se une para formar un complejo tipo sándwich. La fracción no unida se elimina por un lavado centrífugo.

El sustrato quimioluminiscente, un éter fosfato de dioxetano de adamantilo, se añade e incuba durante un periodo adicional de 10 minutos. La emisión de fotones es proporcional a la concentración del analito. El volumen de muestra que requiere el ensayo por determinación es de 75 ul.

MAGLUMI 600 IGF-I: Ensayo inmunoluminométrico tipo sándwich totalmente automatizado y calibrado frente al estándar WHO 2nd IS 02/254.

La muestra (calibradores o control), el agente de desplazamiento (buffer ácido), un buffer y las microperlas magnéticas recubiertas con un anticuerpo monoclonal anti-IGF-I se mezclan bien y se incuban a 37°C. La fracción unida se separa por precipitación a través de un campo magnético y la fracción libre se descarta mediante lavados. Se agrega otro anticuerpo monoclonal anti-IGF-I con etiqueta ABEI y se incuba a 37°C formando un sándwich; el cual vuelve a separarse por acción de un campo magnético y lavados. Posteriormente, se agrega el iniciador 1+2 para iniciar una reacción de quimioluminiscencia. La señal luminosa se mide mediante una foto multiplicadora como RLU en 3 segundos y es proporcional a la concentración de IGF-I presente en la muestra. El volumen de muestra requerido para la determinación de IGF-I es 15 uL.

IMMULITE 2000 IGFBP-3: Utiliza un anticuerpo murino monoclonal anti-IGFBP-3 unido a una bola de poliestireno que se incuba con la muestra prediluida automáticamente (1/100) y un anticuerpo monoclonal murino anti-IGFBP-3 conjugado con una fosfatasa alcalina. Durante el periodo de incubación (30 minutos) a 37°C y una agitación intermitente, la IGFBP-3 de la muestra forma un complejo tipo sándwich con los anticuerpos. La fracción no ligada se elimina tras un lavado. A continuación, se añade un sustrato quimioluminiscente, un éster fosfato de dioxetano de adamantilo y se incuba 10 minutos más. La emisión de fotones es proporcional a la concentración del analito. El ensayo está calibrado frente a un estándar de IGFBP-3 obtenido por tecnología

de DNA recombinante no glicosilado (MW28,75KD): NIBSC 93/560 (National Institute for Biological Standards and Control Insulin-like growth factor binding protein-3). El volumen de muestra que requiere el ensayo por determinar es de 60 ul.

MAGLUMI 600 IGFBP-3: el IGFBP-3 es un inmunoensayo de quimioluminiscencia tipo sándwich.

La muestra (o calibrador/control), un anticuerpo monoclonal anti-IGFBP-3 con etiqueta ABEI y microperlas magnéticas recubierta con otro anticuerpo monoclonal anti-IGFBP-3, se mezclan e incuban a 37°C. El complejo tipo sándwich formado se separa por acción de un campo magnético y posteriores lavados. Finalmente, se agrega iniciador 1+2 para iniciar una reacción de quimioluminiscencia. La señal luminosa se mide mediante una foto multiplicadora como RLU en 3 segundos y es proporcional a la concentración de IGFBP-3 presente en la muestra. El volumen de muestra requerido para la determinación de IGFBP3 es 10 uL.

✓ **Plan de análisis estadísticos:**

Para la recolección de datos y el armado de base de datos se utilizó el programa Excel (Office 2010) y para el análisis de distribución normal se utilizó el Stata 14. Para la evaluación de normalidad se usaron métodos gráficos como el qqplot, histograma, box plot, método analítico de Shapiro-Wilk y el test de Kolmogorov-Smirnov.

Para realizar la comparación de métodos se utilizó el programa Analyse-it® asociados a Excel. Este programa permite realizar el análisis de Bland-Altman, regresión lineal, regresión de Deming y regresión de Passing-Bablok. Se utilizó el análisis Bland-Altman o gráfico de diferencia en función del promedio y el método de regresión de Deming. A diferencia de la regresión lineal en la que se asume que uno de los métodos no tiene error, en la regresión de Deming se asume que los dos métodos tienen error. Se calculó la pendiente, la intersección en el origen y el coeficiente de correlación, todo con un intervalo de confianza del 95% (IC=95%).

❖ Resultados

El test de Shapiro-Wilk no se utilizó ya que es para una cantidad menor a 50 muestras y por lo tanto se aplicó el test de Kolmogorov-Sminov que es para una cantidad mayor a 50 muestras.

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Maglumi IGF-1	,097	57	,200*	,959	57	,038
Immulite IGF-1	,098	57	,200*	,939	57	,005
Maglumi IGFBP3	,063	57	,200*	,984	57	,603
Immulite IGFBP3	,090	57	,200*	,966	57	,086

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

Se encontró que las distribuciones de IGF-I e IGFBP-3, no se pueden diferenciar de la normal, por lo tanto, se expresaron como media \pm desvío estándar (SD) para cada uno de los inmunoensayos. Los datos se muestran en la **Tabla 1**.

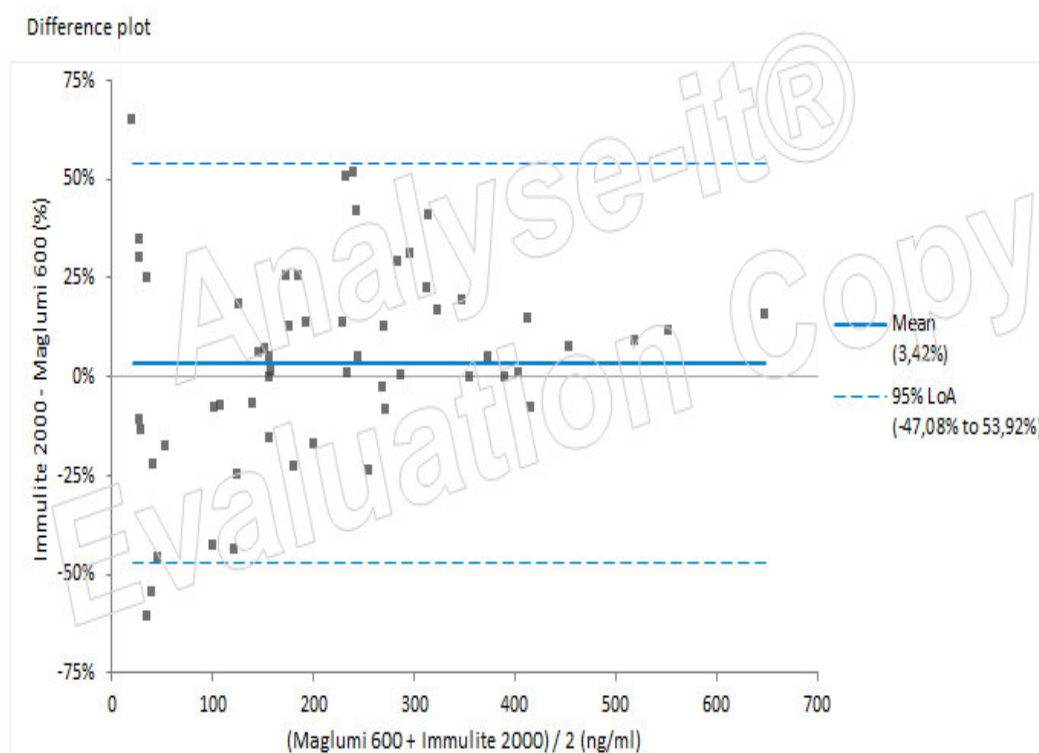
Variable	Immulite 2000	Maglumi 600
N	57	57
IGF-I (ng/ml)	230,81 \pm 155,7	214,56 \pm 136,4
IGFBP-3 (ng/ml)	4,22 \pm 1,68	3,70 \pm 1,52

Tabla 1: Valores de IGF-I e IGFBP-3 obtenidos por immulite 2000 y maglumi 600. Datos expresados como media y desvío estándar (SD).

Para determinar el grado de concordancia entre Immulite 2000 y Maglumi 600 se utilizó el grafico de Bland-Altman (**Figura I**). Se representó el promedio de las dos mediciones de IGF-I (ng/ml) y la diferencia obtenida porcentual entre ambas metodologías.

La diferencia promedio entre los puntos tiene un error de 3,42 % y el intervalo de 95% de confianza indica que la diferencia está entre -3,42 a 10,25%.

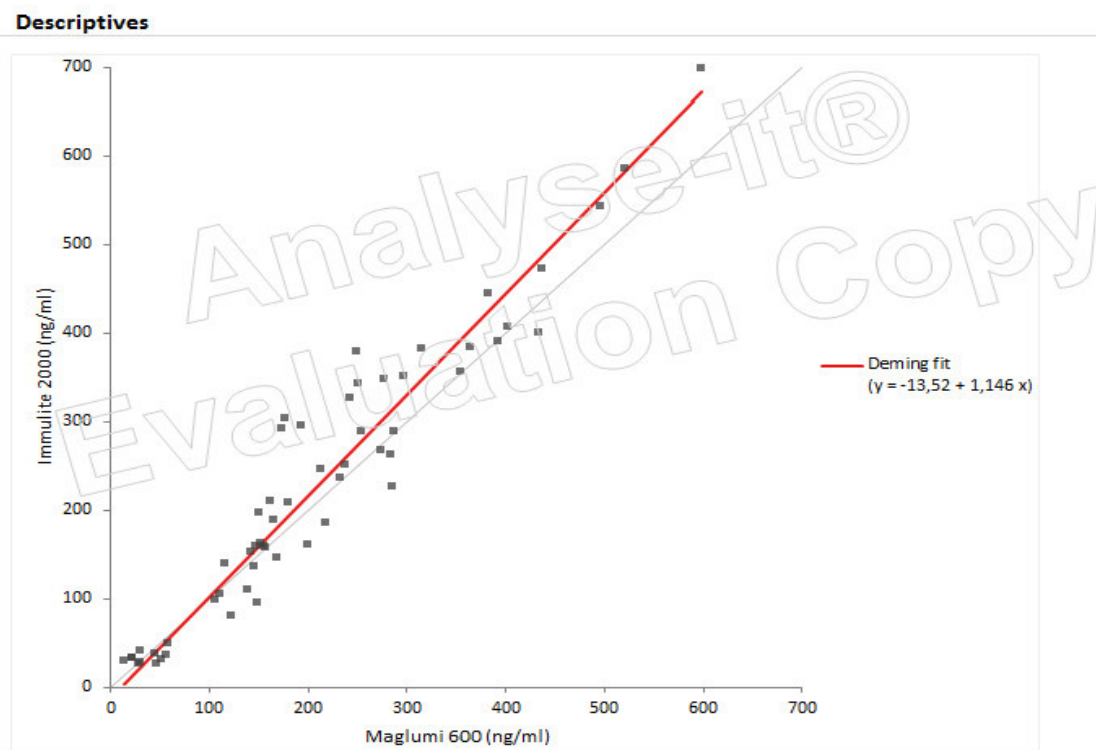
Figura I. Análisis de concordancia de Bland-Altman entre los niveles de IGF-I por Immulite 2000 y Maglumi 600.



Diferencia de las determinaciones de IGF-I por Immulite 2000 y Maglumi 600 expresada en porcentaje. La línea horizontal negra indica el cero “0” de la escala de diferencia, las dos líneas azules punteada representa los límites de concordancia a -47,08 - 53,92% DS por arriba y por debajo de la línea “0”. La línea azul representa el sesgo o bias obtenido en porcentaje entre las mediciones por ambos métodos. Bias: 3,42% (IC: -3,42 – 10,25%).

Al realizar la regresión lineal de Deming se obtuvo un punto de corte en el origen -13,52 (IC 95%: -34,97 a -7,92), una pendiente de la recta de 1,14 (IC 95%: 1,06 a 1,23) y una recta de regresión calculada de $y = -13,52 + 1,14x$, como se puede observar en la **Figura II**. El coeficiente de correlación entre los dos métodos analizados fue 0,96.

Figura II: *Análisis de regresión de Deming, el cual indica un apartamiento de la recta de la línea de identidad.*



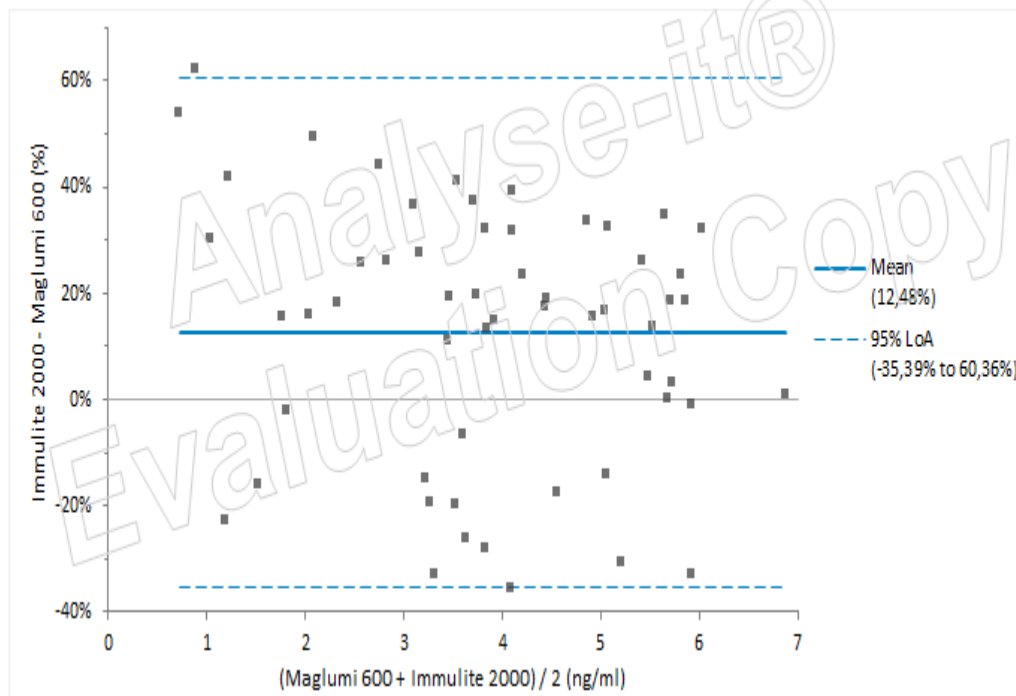
Análisis de regresión de Deming. La línea negra corresponde a la recta con ordenada 0 y pendiente 1. La línea roja representa la recta de regresión de los datos. Recta: $y = -13,52 + 1,14 x$. Pendiente: IC 95%: 1,06 a 1,23; ordenada de origen: IC 95%: -34,97 a 7,925.

La **Figura III** muestra el gráfico de Bland-Altman en el que se observa la relación entre la diferencia de las determinaciones de IGFBP-3 medidas por Immulite 2000 y Maglumi 600.

Los datos se distribuyeron homogéneamente alrededor de la línea media y fueron estables en todo el rango de medición. Más del 99 % de los datos estuvieron dentro de los límites deseables.

El promedio de la diferencia a nivel de datos es 12,4% en valor porcentual con un intervalo de confianza de 95% (IC 95%; 6,001 – 18,96) significativamente diferente de 0 porque el intervalo de confianza no incluye al 0.

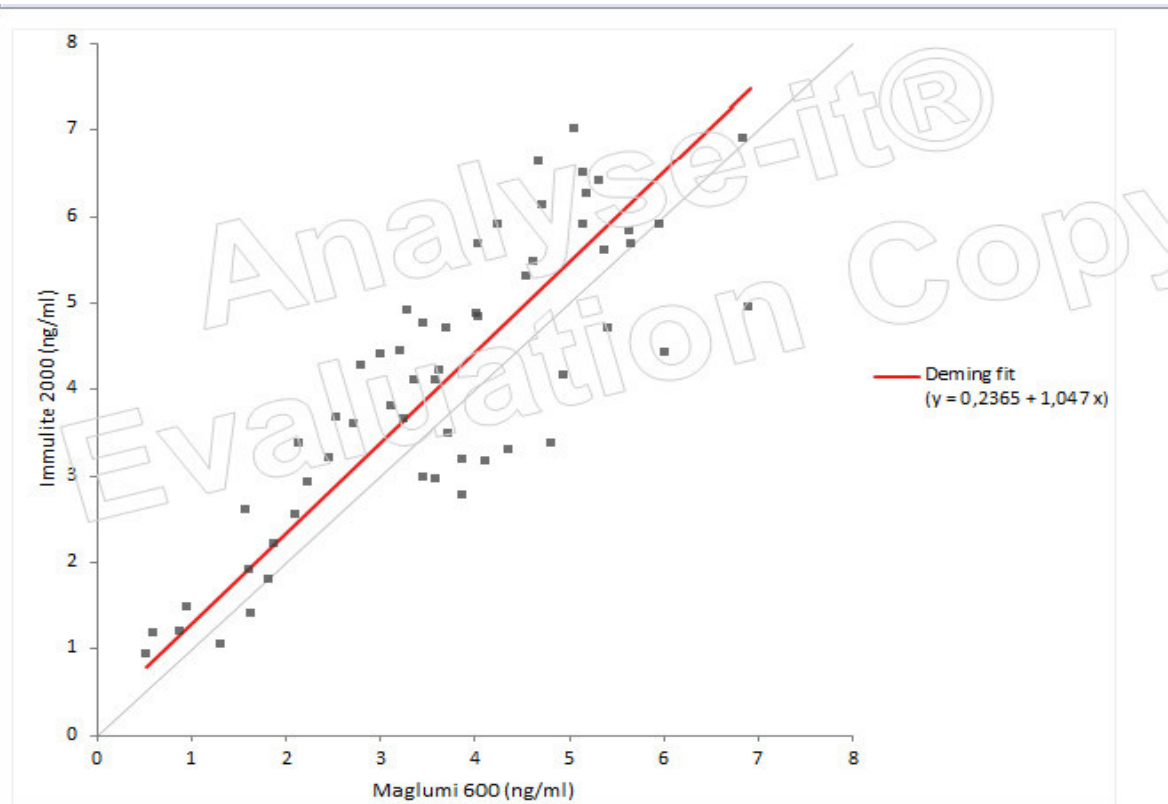
Figura III Diagrama de Bland-Altman. Diferencia de las determinaciones de IGFBP-3 con Immulite 2000 y Maglumi 600.



La línea horizontal negra indica el “0” de la escala de diferencia, las dos líneas azules punteadas representan los límites de concordancia, ubicados a -35,39 a 60,36% SD por arriba y por debajo de la línea “0”. La línea azul indica el sesgo o corrimiento obtenido entre las mediciones por ambos métodos.

Al efectuar el análisis de regresión de Deming (**Figura IV**) se obtiene la ecuación de la recta $y = 0,236 + 1,047 x$, Pendiente: IC 95%: 0,88 a 1,21; Ordenada al origen: IC 95%: -0,274 a 0,747; y el coeficiente de correlación 0,84.

Figura IV: *Análisis de regresión de Deming*



La línea negra corresponde a la recta con ordenada 0 y pendiente 1. La línea roja representa la recta de regresión de los datos. Recta: $y = 0,236 + 1,047 x$; Pendiente: IC 95%: 0,88 a 1,21; Ordenada al origen: IC 95%: -0,274 a 0,747.

❖ Discusión

En este trabajo se realizó una comparación metodológica entre Immulite 2000 y Maglumi 600 para la determinación de IGF-I e IGFBP-3. Las estrategias analíticas pueden diferir, pero estas deben proporcionar la máxima información con la mejor eficiencia clínica y analítica posible, con vista a un diagnóstico preciso y eficiente. En IGF-I, al obtener la ecuación de la recta, se observa que el intervalo de confianza de la intercepción incluye al 0, por lo que no se observa diferencia sistemática entre los dos métodos en la ordenada al origen. El intervalo de confianza de la pendiente es ligeramente mayor que 1 porque el IC: 95% no incluye al 1, lo que nos indica que hay un error sistemático proporcional. Debido a esto, se puede observar que a medida que aumentó la concentración de IGF-I, los valores de Immulite 2000 y Maglumi 600 se encontraron ligeramente por encima de la línea de identidad.

Teniendo en cuenta las especificaciones de calidad de variabilidad biológica deseable para IGF-I (que considera un error sistemático permitido del 12%), el bias obtenido del 3,42% fue considerado aceptable. Si bien hay diferencias que son estadísticamente significativas para ambos métodos, desde el punto de vista clínico son comparables.

En IGFBP-3, al efectuar el análisis de regresión de Deming se obtiene la ecuación de la recta donde la pendiente incluye al 1 y la ordenada al origen incluye al 0, por lo que se observa diferencia sistemática constante de 0,5 entre los dos métodos y un coeficiente de correlación de 0,84. Debido a esto, se pudo observar que a medida que aumentó la concentración de IGFBP-3, los valores de Immulite 2000 se encontraron ligeramente por encima de lo que cuantifico Maglumi 600. De acuerdo a los obtenidos en el gráfico de Bland-Altman y en el análisis de regresión de Deming podemos ver que también existe correlación entre ambos métodos. A pesar de que la pendiente y la ordenada al origen incluyen al 1 y 0, hay un error constante y, de acuerdo a la variabilidad biológica se puede considerar aceptable.

La medida tanto de IGF-I como IGFBP-3 tiene sus limitaciones debido a que las estandarizaciones de los resultados se ven influenciadas por varios factores que pueden afectar su interpretación dependiendo del inmunoensayo utilizado. IGF-I

fundamentalmente se ve afectado por el procedimiento que se utiliza para eliminar las proteínas ligadoras, la afinidad de los anticuerpos utilizados y el estándar de referencia frente al cual se calibran los dos métodos. Otras de las causas a tener en cuenta es el N (números de datos) con mayor N probablemente podríamos obtener mejores resultados.

❖ **Conclusión**

En base a los análisis estadísticos podemos concluir que existen diferencias estadísticamente significativas entre ambos métodos, sin embargo, en función de los errores obtenidos y aplicando criterios de calidad según variabilidad biológica creemos que los dos métodos son comparables y adecuados para su utilización en el diagnóstico clínico. Asimismo, sostenemos que es conveniente realizar el seguimiento de pacientes pediátricos con una misma metodología.

✓ Referencias bibliográficas:

1. Lopera, M. Campuzano, G. González, V. Alfaro Velásquez, J. M. Estudio del paciente con talla baja. La clínica y el laboratorio. Vol.15, números 11-12, 2009.
2. Álvarez, M.J. Páez N, A. Schvab, G. Muñoz, M. Miras, M. Determinación del factor de crecimiento insulino-símil en niños tratados con hormona de crecimiento. Centro Privado de Endocrinología Infanto-Juvenil Crecer.
3. Granada, M. L. Factores a tener en cuenta en la interpretación de los resultados de la concentración sérica del factor del crecimiento insulinoide tipo 1 (IGFI). Junio 2014:10:3266.
4. Granada Ybern, M. L. Factor de crecimiento similar a la insulina y sus proteínas de transporte. Pruebas de laboratorio en Endocrinología y Nutrición.2006;53(7):467-75.
5. Williams, I. Wilson, J. Foster, D. W. Textbook of endocrinology. 1985 (8ª y 9ª edición).
6. Oliveira, C.R.P. Meneguz M, R. A. Aguilar O, M. Barreto, J.A. Rol emergente del eje GH/IGF-I en el control cardiometabolico.2011;97(5)434-439.
7. Díaz D, E. Pichardo-Baena, R. Larrea G, F. Halhali B, A. Papel fisiológico del factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 y sus proteínas transportadoras durante el embarazo. Vol.11, núm.2, Abril-Junio 2004.
8. Iñiguez, G. Cassorla, F. Expresión y contenido placentario de los componentes del eje somatotrófico en niños con alteraciones del crecimiento fetal. 2012;3 suppl(1):33-37
9. Mezquita R, P. Muñoz T, M. Importancia del IGF-I en el metabolismo óseo. REEMO 2003;12(6):117-9.
10. Leal-Guadarrama, L. Ochoa R, M del C. Méndez, J. Importancia clínica de los factores de crecimiento parecidos a la insulina. Vol.139 N° 6, 2003.
11. Granada, M. Factores a tener en cuenta en la interpretación de los resultados de la concentración sérica del factor del crecimiento insulinoide tipo 1 (IGFI). Junio 2014:10:3266.

12. Parera A, L. Granada, M. L. Utilidad clínica de las determinaciones de IGF-I e IGFBP-3. Unidad Investigación Endocrinología y Nutrición Pediátricas. Servicio de Pediatría. 2004;60(supl 2):1-8.
13. Cortizo, A. M. McCarthy, A. D. Bioquímica Clínica. Factores de crecimiento insulino similares: estructura, bioactividad y métodos de ensayo. Vol. XXXII N2.4 .471 -516 1998.
14. Sociedad de investigación. Pautas de consenso para el diagnóstico y tratamiento de déficit de hormona de crecimiento (DGH) en la niñez y adolescencia: summary statement of the GH Research Society. J Clin Endocrinol Metab 2000;85:3990-3.
15. Chaler, E. A. Meazza, C. Guercio, G. Maceiras, M. Rivarola, M. A. Laarej, K. Pagani, S. Areny, G. Albertini, R. Llinares, V. Belgorosky, A. y Bozzola, M. Serum IGF-I reference values from a chemiluminescent assay in normal children and adolescents of hispanic and italian origin: Presence of sexual dimorphism in IGF-I values. Journal of pediatric Endocrinology & metabolism, 22, 1127-1135 (2009). Vol 22, N° 12, 2009.
16. <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>