



UNIVERSITAT POMPEU FABRA
Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud

**LA HORMONA DE CRECIMIENTO EN EL
ÁMBITO DEPORTIVO: MÉTODOS DE
DETECCIÓN, COMPARACIÓN Y
FUNCIONAMIENTO METODOLÓGICO**

Tesis PhD
Jaume Bosch Colom

Programa de Investigación en Neurociencia
IMIM - Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques



Institut Hospital del Mar
d'Investigacions Mèdiques

Barcelona, Septiembre 2012



UNIVERSITAT POMPEU FABRA

Departamento de Ciencias Experimentales y de la Salud
Programa de Doctorado: Ciencias de la Salud y de la Vida

LA HORMONA DE CRECIMIENTO EN EL ÁMBITO DEPORTIVO: MÉTODOS DE DETECCIÓN, COMPARACIÓN Y FUNCIONAMIENTO METODOLÓGICO

Memoria presentada por Jaume Bosch Colom para optar al título de Doctor por la Universidad Pompeu Fabra. Esta tesis se ha realizado bajo la dirección del Dr. Ricardo Gutiérrez Gallego, en el grupo de Investigación en Bioanálisis y Servicios Analíticos, programa de Neurociencias del IMIM (Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques). Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud y de la Vida de la Universidad Pompeu Fabra.

Dr Ricardo Gutiérrez Gallego
Director de la tesis

Jaume Bosch Colom
Doctorando

Barcelona, Septiembre 2012

Dedicat a Aina, la llum de la meva vida

*“Passa sona i ressona, el temps té un so especial
que quan passa desentona i t’emprenya i et fa mal”
(El gran Ovidi, el cant monjo)*

Agradecimientos / Agraïments

Ara que després de tants anys per fi a la flor de la vida, o més ben dit a la flor de la tercera edat, em dispo a presentar la tesi. Aquest treball seria impossible sense una llarga llista de gent que resumiré per no fer-ho pesat.

En primer lloc vull agrair al Dr. Jordi Segura que em donés l'oportunitat de començar aquesta tesi. És un plaer treballar amb algú del seu talent i experiència. Gracies Jordi.

Gracias sobre todo al Dr. Ricardo Gutiérrez por dirigir esta tesis. Para mi su ayuda ha sido de un inestimable valor, un director de tesis si pero también un amigo que en los momentos difíciles (que los ha habido) ha estado soportándome y ayudándome. Como ya te dije hace unos años, hartelijk bedankt.

Vull agrair també a Gerard Such el seu suport. Ets un mestre de mestres, capaç de demostrar la relació entre el bosó de Higs i la casa gran del catalanisme. Com va dir en Sergi Pamies: “la qualitat d'un país es mesura primer de tot en saber si fan orxata”.

Agrair especialment a aquells amb els que he estat més en contacte aquets anys, a Esther “la Binefareña”, a Carmen “la canaria del basquet”, a Laia “Laieta, Laia”, a Josep “el funcionari”, a Quim “el gironi content”, a Raúl “el marques de Aitana”, a Armand “sempre serà de Sant-Pedor” i a Toni “el sospechoso habitual”, a tots dir-vos, moltíssimes gracies. Vull també agrair a tota la resta de companys pel seu suport i molt especialment la paciència per aguantar-me, no voldria deixar-me a ningú i per això os dono les gracies a tots i a totes en conjunt.

Durant la meua vida hi ha presents dues persones molt importants, Carmé i Lucia, estic molt orgullós de dir-vos que soc i seré sempre el vostre amic i que sou simplement unes grandíssimes persones, a las dues ¡¡¡ moltes gracies!!!.

Vull agrair també als meus pares, encara que ja no estiguin aquí, i al meu germà Maties. També gracies a la iaia Carme, a na Lois, tieta Mar i a molts altres que farien la llista molt extensa, gracies a tots.

Per acabar vull donar les gracies a la persona a la que es impossible d'agrair-li tot el que ha fet per mi, a Aïna. No tinc paraules, i sobre tot m'agradaria dir-te que ets el més important de la meua vida i que sense tu res de mi tindria massa sentit.

Aquest treball també va dedicat a tots aquells que cauen i aconsegueixen aixecar-se cada vegada, com li va ensenyar Alfred a Bruce Wayne.

I would like to thank to the World Anti-Doping Agency (WADA) for financial support to this project. Also I would like to thank to Dr. Makoto Ueki, Dr. Moutian Wu, Dr. Mario Mellado and Dr. Martin Bidlingmaier, they have provided several material related with this work, recombinant forms and specific antibodies. Thanks to all.

Índice

Abstract	15
Resumen	16
Abreviaciones	17
Estructura de la tesis	21
1. INTRODUCCIÓN	23
1.1 Antecedentes históricos de abuso en el deporte	24
1.2 Abuso de hGH en el deporte	31
1.3 Características fisiológicas de la hGH	41
1.3.1 Síntesis de hGH: Cluster génico y estructura	42
1.3.2 Propiedades de las variantes y actividad biológica de la hGH	49
1.3.3 El Receptor de hGH y las proteínas de unión de hGH	54
1.3.4 Otras variantes moleculares e isoformas de hGH: hGH acilada, deamidada y glicosida	58
1.3.5 hGH-V placentaria	59
1.3.6 Oligómeros de la hGH	59
1.3.7 Proporciones de isoformas de hGH en la hipófisis	60
1.3.8 Regulación de la secreción de isoformas de hGH	61
1.3.9 Análisis de isoformas de hGH en circulación sanguínea	63
1.3.10 Metabolismo y aclaramiento de hGH	68
1.3.11 Isoformas de hGH en orina	70
1.3.12 Resumen	71
1.4 Marcadores biológicos de la acción de la hGH	72
1.4.1 IGF-I y proteínas de transporte de IGFs	72
1.4.2 P-III-NP	81
1.5 Desarrollo de métodos de detección de abuso en el deporte con hGH	85
1.5.1 Estrategia indirecta: Método con marcadores biológicos	86
1.5.2 Estrategia Directa: Métodos basados en la relación entre Variantes de hGH	90

1.6 Resonancia del Plasmon de Superficie (SPR)	96
2. OBJETIVOS	101
3. MATERIAL Y MÉTODOS	107
3.1 Anticuerpos contra la hGH	108
3.1.1 Anticuerpos comerciales	108
3.1.2 Anticuerpos no comerciales	108
3.2 Antígenos para el estudio de los anticuerpos anti-hGH por SPR	109
3.3 Reactivos utilizados en inmunoensayos	111
3.3.1 Reactivos para ELISA y Luminex®	111
3.3.2 Reactivos para FIA-TR	112
3.3.3 Reactivos para ILMA	113
3.4 Resonancia del Plasmon de Superficie (SPR)	114
3.4.1 Condiciones generales	114
3.4.2 Reactivos SPR	115
3.4.3 Inmovilización de bio-moléculas en SPR	115
3.4.4 Condiciones de regeneración de superficies	116
3.4.5 Interacciones, cinética y análisis de datos	117
3.5 Ensayos Clínicos	118
3.5.1 Primer Ensayo Clínico	118
3.5.1.1 Materiales	118
3.5.1.2 Sujetos a estudio	118
3.5.1.3 Diseño del estudio	118
3.5.2 Segundo Ensayo Clínico	120
3.5.2.1 Materiales	120
3.5.2.2 Sujetos del estudio	120
3.5.2.3 Diseño del estudio	121
3.5.3 Muestras poblacionales y de atletas	124
3.6 Desarrollo de métodos analíticos	125
3.6.1 Métodos utilizados en la estrategia directa	125

3.6.1.1 ELISA específico para isoformas de 22 kDa y 20 kDa hGH	125
3.6.1.2 Inmunoensayo simultaneo por citometría de flujo (Luminex®) específico para isoformas de 22 kDa y 20 kDa hGH	127
3.6.1.3 Inmunoensayo diferencial de isoformas FIA-TR (Diferencial Rec y diferencial Pit)	131
3.6.1.4 Inmunoensayo diferencial de isoformas ILMA (Diferencial Rec y diferencial Pit)	135
3.6.1.5 Inmunoensayo de GH por quimioluminiscencia	139
3.6.2 Métodos utilizados en la estrategia indirecta. Marcadores Biológicos.	140
3.6.2.1 IGF-I	140
3.6.2.2 IGFBP 3	142
3.6.2.3 P-III-NP	142
3.7 Análisis estadístico	143
3.7.1 Estrategia directa	143
3.7.2 Estrategia Indirecta	145
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	147
4.1 Caracterización de Abs implicados en los inmunoensayos utilizados	148
4.1.1 Generalidades	148
4.1.2 Resultados generales	154
4.1.3 Anticuerpos específicos	156
4.1.3.1 mAb AK569	162
4.1.3.2 mAb A36	164
4.1.3.3 mAb D05	166
4.1.4 Anticuerpos no específicos	170
4.1.4.1 mAb AK566	175
4.1.4.2 mAb AK568	177
4.1.4.3 mAb AK565	179
4.1.4.4 mAb AK567	180
4.1.4.5 Anticuerpos no específicos en conjunto	181
4.1.5 Efectos cooperativos/enmascarantes para los Abs específicos y no específicos	182
4.1.6 Discusión	189

4.2 Resultados del análisis de variantes de hGH	196
4.2.1 Análisis de variantes de hGH en muestras del primer ensayo clínico	198
4.2.1.1 Análisis de variantes 22 kDa hGH y 20 kDa hGH: ratio 22/20 kDa	201
4.2.1.2 Análisis del variantes rec y pit: ratio rec/pit	204
4.2.1.3 Discusión	208
4.2.2 Análisis de variantes de hGH en muestras del segundo ensayo clínico	213
4.2.2.1 Resultados	214
4.2.2.2 Inmunoensayos específicos de variantes: ratio 22 vs 20 kDa hGH	220
4.2.2.3 Inmunoensayos diferenciales de variantes: ratio rec/pit hGH	223
4.2.2.4 Discrepancias entre las dos distintas aproximaciones	228
4.2.2.5 Comparación de los diferentes métodos de inmunoensayo utilizados	229
4.2.2.6 Discusión	236
4.3 Marcadores biológicos	246
4.3.1 Primer ensayo clínico	249
4.3.1.1 Resultados	249
4.3.1.2 Aplicación de la formula discriminante del estudio GH-2000	254
4.3.1.3 Discusión	256
4.3.2 Segundo ensayo clínico	259
4.3.2.1 Resultados	259
4.3.2.3 Discusión	270
5. CONCLUSIONES	279
6. BIBLIOGRAFÍA	285
7. ANEXOS	317
Anexo A: resultados.	318
Anexo B: artículos publicados.	348

Abstract.

This doctoral thesis describes the evaluation of analytical methodologies to detect human growth hormone (hGH) abuse in sport. Two main strategies are studied and compared.

The first (direct method) measures changes in the proportions of hGH variants, expressed as ratios, which are altered after hGH administration. Two versions of the direct method are compared; one using ratios between recombinant and pituitary variants and a second using ratios between only 22 and 20 kDa hGH variants. To fully understand the immunoassays readings, all relevant antibodies were characterised by surface plasmon resonance (SPR).

A second strategy (indirect method) measures changes in proteins, other than hGH, provoked by the use of hGH. These bio-markers should have a longer retrospective analytical power.

To evaluate the performance of both strategies, two clinical trials with recombinant hGH (rhGH) were carried out with healthy male subjects. The resulting data have been compared and statistically assessed.

It is the first time that all available strategies have been applied on a single data set and this allows better understanding of the analytical readings which provides an additional tool in the evaluation of anti-doping analyses.

Resumen

Esta tesis doctoral describe la evaluación de métodos analíticos para detectar el abuso de hormona de crecimiento humana (hGH) en el deporte. Se han estudiado y comparado dos estrategias. La primera o método directo mide cambios en la proporción de variantes de hGH expresados como ratios, que están alterados después de administrar hGH. Dos versiones del método directo son comparadas; una con ratios entre variantes recombinante e hipofisaria y otra con ratios entre variantes de 22 y de 20 kDa. Para una mejor comprensión, los anticuerpos relevantes utilizados en los inmunoensayos, se caracterizaron por medio de resonancia del plasmon de superficie (SPR).

Una segunda estrategia o método indirecto mide cambios en biomarcadores (proteínas) causados por uso de hGH recombinante (rhGH). Estos bio-marcadores presentan un poder analítico más fuerte y de mejor retrospectiva en el tiempo.

Para evaluar el rendimiento de ambas estrategias se han realizado dos ensayos clínicos con rhGH en varones sanos. Los datos resultantes se han comparado y evaluado estadísticamente. Es la primera vez que ambas estrategias se han aplicado sobre una misma serie de datos y ello permite una mayor comprensión de lecturas analíticas lo que proporciona herramientas adicionales en la evaluación de los análisis anti-dopaje.

Abreviaciones

4PL:	Ajuste logístico de curvas 4 parámetros.
AA:	Aminoácido/s.
Ab/Abs:	Anticuerpo/Anticuerpos.
ApN:	Adiponectina, proteína específica del tejido adiposo.
Ag/Ags:	Antígeno/Antígenos.
ALS:	Subunidad ácido lábil.
AUC:	Área bajo la curva, del acrónimo inglés “Area Under Curve”.
B.A.:	Test de Bland-Altman.
BALCO:	Bay Area Laboratory Co-Operative (San Francisco, USA)
BLAST:	Basic Local Alignment Search Tool.
BMI:	Índice de masa corporal (Body Mass Index).
BSA:	Albúmina sérica bovina.
CEIC:	Comité de Ético de Investigaciones Clínicas.
CHO:	Ovario de ratón chino.
CM5:	Chip-sensor de SPR, con una capa fina de oro y sobre ella una capa de 100 nm de dextrano carboximetilado de alta densidad.
CS:	Somatomamotropina coriónica.
CNB:	Centro Nacional de Biotecnología (Madrid).
DEAE:	Cromatografía de intercambio iónico.
DELFLIA:	Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent Immunoassay.
E. coli:	Bacteria Escherichia coli.
EDC:	N-etil-N(dimetilaminopropil) carbodiimida.
ELISA:	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay. Acrónimo del inglés para designar el inmunoensayo.
EPO:	Eritropoyetina.
FC:	Canal de flujo o flow channel del instrumento SPR Biacore-3000.
FCMIA:	Inmunoensayo con microesferas de fluorescencia covalente.
Feed-back:	Retroalimentación (conjunto de respuestas reguladoras contrapuestas que se manifiestan con la interacción de dos componentes bioquímicos y su receptor diana para cambiar o modificar la regulación).

ABREVIACIONES

FIA-TR:	Fluor-Immuno-Assay Time Resolve. Acrónimo del inglés para designar el fluorinmunoensayo con resolución de tiempo.
FIFA:	Federación Internacional de Fútbol Asociación.
Gal:	Galactosa.
GalNac:	N-acetil Galactosamina.
GH:	Hormona de crecimiento.
GH-N:	Hormona de crecimiento expresada por el gen de GH en la glándula hipófisis y células del sistema inmune.
GH-V:	Hormona de crecimiento expresada por el gen GH-V exclusivamente en la placenta.
GHBP:	Proteína transportadora de la hormona de crecimiento.
GHR:	Receptor de la hormona de crecimiento.
GHRH:	Hormona liberadora de la hormona de crecimiento.
GHRP:	Péptidos liberadores de la hormona de crecimiento humana.
GHS:	Secretagogos de la hormona de crecimiento humana.
GPC-R:	Receptores hipofisarios acoplados a la proteína G.
HBR:	Reactivo bloqueante heterofílico.
HBS-EP:	Tampón de HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, y surfactante P- 20 al 0.005% (v/v).
hCG:	Gonadotropina coriónica humana.
hGH:	Hormona de crecimiento humana.
HRP:	Peroxidasa de rábano.
hPL:	Lactógeno placentario humano.
hPRL:	Prolactina humana.
IAAF:	Federación Internacional de Atletas Aficionados.
IFMA:	Immuno Fluori-Metric Assay. Acrónimo que designa el inmunoensayo fluorimétrico.
ICTP:	Telopeptido entre-cruzado (cross-linked) carboxi-terminal del colágeno tipo I.
IGF/IGFs:	Factor/factores de crecimiento similares a la insulina.
IGF-I:	Factor de crecimiento similar a la insulina I.
IGF-II:	Factor de crecimiento similar a la insulina II.
IGFBPs:	Proteínas de transporte de IGFs.
IGF BP-3:	Proteína transportadora 3 de los factores de crecimiento similares a la insulina.
ILMA:	Immuno Lumino Metric Assay, acrónimo del inglés para designar el inmunoensayo luminométrico.
IOC:	Comité Olímpico Internacional.

IRMA:	Immuno Radio Metric Assay. Acrónimo que designa el inmunoensayo radio-métrico.
JAK2:	Janus quinasa 2, proteína quinasa con actividad tirosina.
kDa:	Kilodalton.
LIA:	Luminiscent Immuno Assay. Acrónimo que designa el inmunoensayo de luminiscencia.
LOD:	Límite de detección.
LOQ:	Límite de cuantificación.
Luminex®:	Inmunoensayo con detección simultanea de múltiples analitos por citometría de flujo.
mAb/mAbs:	Anticuerpo monoclonal/Anticuerpos monoclonales.
M-6-P:	Manosa-6-fosfato.
MAP:	Proteínas activadas por mitógenos.
MBL:	Mannan-binding lectin.
MCM:	Mitsubishi Chemical Medience Corporation.
MES:	Ácido etano-sulfónico 2-N-morfolino.
MGF:	Mechano Growth Factor.
mRNA:	Ácido ribonucleico mensajero.
MS:	Espectrometría de masas.
NeuAc:	N-Acetil ácido neuramínico.
NFL:	Liga Nacional de Fútbol Americano.
NHS:	N-hidroxisuccinimida.
NIBSC:	National Institute for Biological Standards and Controls.
NS:	Estadísticamente no significativo.
NSB:	Uniones no específicas (Non Specific Binding) uniones que no son debidas a reacción antígeno-anticuerpo.
PBS:	Tampón fosfato-salino.
PE:	Ficoeritrina.
phGH:	Extracto hipofisario de hGH procedente del NIBSC.
PI3:	Fosfatidil inositol 3' quinasa.
P-III-NP:	Propéptido N-terminal del procolágeno tipo III.
PL:	Lactógeno placentario.
PM:	Peso molecular.
P.r.:	Test de correlación de Pearson.
RDA:	República Democrática de Alemania.
rhGH:	Hormona de crecimiento recombinante humana
rhPRL:	Prolactina humana recombinante.
Rmax:	Respuesta teórica máxima.

ABREVIACIONES

RU:	Unidades de resonancia.
SD:	Desviación estándar.
SPR:	Resonancia del plasmón de superficie.
SRIH:	Somatostatina.
STAT:	Transductores de señales y activadores de transcripción.
TA:	Temperatura ambiente.
TACE:	Enzima convertidora del factor de necrosis tumoral alfa.
TFA:	Ácido trifluoracético.
THG:	Tetrahydrogestrinona.
TSH:	Tirotropina.
UCI:	Unión Ciclista Internacional.
UEFA:	Unión Europea de Fútbol Asociación.
USADA:	Agencia anti-dopaje de Estados Unidos (United States Anti-Doping Agency).
URSS:	Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas.
WADA:	Agencia Mundial Anti-Dopaje.
WOO:	Acrónimo de la expresión inglesa de “Window Of Opportunity” que corresponde al margen de detección en unidad de tiempo para una substancia, en este caso para la rhGH.
χ^2 :	valor de chi-cuadrado.

Estructura de la Tesis

Este trabajo se estructura en cinco capítulos. En el primer capítulo se incluye una descripción acerca de la hormona de crecimiento humana (hGH), su relación con su abuso en el deporte, su fisiología y los esfuerzos desarrollados en conseguir métodos de detección fiables. También se realiza una breve introducción a la metodología de la resonancia del plasmón de superficie (SPR).

En el segundo capítulo se describen los objetivos que se persiguen.

En un tercer capítulo se detallan los materiales que se han necesitado y las distintas metodologías utilizadas para llevar a cabo este trabajo.

En el cuarto capítulo se describen los resultados obtenidos y una discusión acompañada acerca de ellos. Este capítulo se divide en tres subcapítulos. El primero trata acerca de la caracterización por la metodología de SPR de los anticuerpos utilizados en la detección. El segundo trata acerca de la estrategia de detección mediante métodos directos. En el tercer bloque se trata acerca de la estrategia de detección por el método indirecto utilizando bio-marcadores de la actividad de la hGH.

En el último capítulo se resumen las conclusiones obtenidas en esta tesis. Posteriormente aparece la lista de citas bibliográficas y por último los anexos relacionados con este trabajo en los cuales se incluyen las publicaciones derivadas de esta tesis

Capitulo 1: INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 Antecedentes históricos de abuso en el deporte.

El origen de la palabra “doping” es controvertido, y difiere en la atribución de su origen. Según algunos la palabra “doping” se origina derivada del pueblo africano de los Kafir los cuales utilizaban un licor denominado “dop” como estimulante(1-3). Por otra parte hay quien considera su origen en relación a la expresión americana “dope” una palabra en argot para referirse al opio desde los días, a inicios del siglo XX, en que se dopaba a los caballos utilizando como droga más común esta sustancia(4). No obstante la Enciclopedia Británica atribuye la palabra “dope” a la voz flamenca "doop" que se usa para determinar una mezcla.

La practica de potenciar el rendimiento por medios artificiales, es tan antigua como el deporte de competición en si mismo. Se sabe que atletas que participaban en los Juegos Olímpicos en la antigua Grecia ya utilizaban dietas especiales y pociones estimulantes para fortalecerse. Estos atletas tenían unos beneficios económicos tan importantes que algunos de ellos buscaban medios ilegales para ganar a cualquier precio. Los gladiadores romanos también usaban estimulantes inespecíficos para superar la fatiga y las lesiones(5), siendo muchos de estos estimulantes utilizados derivados de plantas.

Ya en la última parte del siglo XIX, el número y tipos de drogas y sustancias utilizadas para mejorar el rendimiento fueron en aumento, en línea con el desarrollo de la farmacología y medicina

moderna. Los estimulantes como mezclas de cafeína, cocaína, estricnina, belladona, anfetaminas y otros derivados como bebidas alcohólicas entre otras, que fueron utilizadas como ayuda para mejorar la resistencia y la fuerza física.

Hacia 1928 la Federación Internacional de Federaciones Atleticas (IAAF) fue la primera federación internacional deportiva que prohibió el uso de sustancias estimulantes. Otras federaciones la siguieron aunque en aquellas épocas la falta de pruebas de detección efectivas hacían que estas medidas iniciales no frenaran el uso de sustancias dopantes. El tiempo fue transcurriendo y el problema del dopaje también fue empeorando a lo largo de los años ya que se iban incorporando nuevas sustancias dopantes.

El uso de estimulantes prevaleció particularmente en ciclismo durante las décadas de los 60 y 70. La muerte de un ciclista danés durante los Juegos Olímpicos de Roma incremento la presión para las autoridades deportivas para introducir pruebas de detección de agentes dopantes. En 1966 la Unión Ciclista Internacional (UCI) y la Federación Internacional de Fútbol Asociación (FIFA) fueron de las primeras en introducir pruebas anti-dopaje en sus respectivos Campeonatos del Mundo. Durante el Tour de Francia de 1967, la muerte en plena carrera de un ciclista ingles cuando iba escalando a duras penas el Mont Ventoux fue de hecho la primera muerte a causa del dopaje retransmitida en directo por televisión. El ciclista falleció a causa de una parada cardiaca ocasionada por una mezcla de anfetaminas y alcohol. A partir del año siguiente la organización de la carrera ciclista incorporo por primera vez controles anti-dopaje muy limitados ya que prácticamente solo se podían detectar algunas

substancias estimulantes. En este mismo año el Comité Olímpico Internacional (IOC) instituyó su propia comisión médica y puso en marcha su primera lista de sustancias prohibidas. Algunas de las pruebas de detección disponibles fueron introducidas en los Juegos Olímpicos de Invierno en Grenoble y posteriormente en los Juegos Olímpicos de México en 1968. Estos primeros test alcanzaban a detectar tan solo algunas sustancias estimulantes. Muchas Federaciones Deportivas Internacionales introdujeron los controles de dopaje en la década de 1970, aunque el IOC, y más en concreto su brazo efectivo, la Comisión Médica, cogieron la batuta para dirigir los progresos necesarios que permitieron ir introduciendo nuevos test de detección. Ya hacia 1974 se introdujeron mejoras en los métodos de detección de esteroides anabolizantes de los que resultaron a finales de la década de 1970 un elevadísimo número de descalificaciones por el uso de anabolizantes. En años posteriores se fueron desarrollando otros métodos de detección para nuevas sustancias y la lista de drogas prohibidas se fue ampliando(6). El dopaje mientras, se iba acercando incluso a planificaciones cada vez más sofisticadas y urdidas por los propios gobiernos en determinados países. Así durante la década de 1970 y 1980 ya se sospechaba que algunos países perseguían sacar provecho político de sus masivos éxitos deportivos. Estas dudas ya han sido confirmadas como en el caso de la ya desaparecida República Democrática de Alemania (RDA) donde se establecieron programas de dopaje a gran escala impulsados por el gobierno comunista (7). En otros casos existen serias dudas, dudas no confirmadas oficialmente, como en el caso de la ya desaparecida Unión de

Republicas Socialistas Soviéticas (URSS) o bien ya más recientemente la Republica Popular de China.

En la década de 1980 la lista de sustancias prohibidas se amplió notablemente incluyendo nuevas categorías, como grupos de hormonas, diuréticos utilizados como agentes enmascarantes, otros nuevos estimulantes, así como también no ya sustancias en sí sino métodos prohibidos, como se daba en el caso de las transfusiones sanguíneas, primero homólogas (de sujeto a sujeto) y más adelante las autólogas, del mismo sujeto. Ya en la década anterior en los Juegos Olímpicos de Munich de 1972 y luego en los de Montreal de 1976 la actuación del corredor de fondo finlandés Lasse Viren despertó sospechas acerca de un posible tratamiento con transfusiones de sangre, caso que quedó solamente en rumor y nunca fue confirmado.

El caso de dopaje más conocido de la década de los 80 que centró la atención mundial hacia este problema a un nivel sin precedentes fue el concerniente al velocista canadiense Ben Johnson, medalla de oro y record mundial en la carrera de atletismo de los 100 metros lisos en los Juegos Olímpicos de 1988 en Seúl, en la que días después de su triunfo daba positivo al esteroide anabólico estanozolol. En la década de 1990, se empezó a notar una evidente correlación entre métodos de detección cada vez más efectivos y un descenso en el nivel de las mejores marcas o resultados en algunos deportes. Curiosamente en las pruebas de natación dominadas en años anteriores por las nadadoras de la RDA y con la mayoría de récords mundiales en su poder, se fueron mejorando posteriormente sus marcas aunque en algunos casos con récords sorprendentes de

nadadoras de países emergentes como el de la Republica Popular de China.

En el caso contrario al ya mencionado hay corredoras de estas épocas, finales de la década de los 70 e inicio de los 80 que aun ostentan en algunas pruebas de atletismo récords mundiales que ni siquiera actualmente han sido batidos y según opinión de expertos difícilmente lo serán. Destacan, como ejemplo de otros muchos, los récords de la alemana Marita Koch en los 200 (record si batido que se menciona a continuación) y el de 400 metros lisos (vigente después de 27 años)), o bien el de la corredora de la entonces Republica de Checoslovaquia, Jarmina Kratochvilova en los 800 metros lisos que aun perdura después de 29 años. El caso más sonado se daría en atletismo con la velocista estadounidense Florence Griffith, que eclosiono como atleta en los Juegos Olímpicos de Seúl de 1988 con dos récords mundiales estratosféricos en 100 y 200 metros lisos que difícilmente según los técnicos en atletismo serán superados. Curiosamente el record mundial de 200 metros lo batió a la ya mencionada atleta de la RDA Desgraciadamente esta atleta americana murió años después en 1998 y la causa oficial de la muerte fue por asfixia durante un fuerte ataque epiléptico mientras dormía. Aun hoy las sospechas nunca confirmadas de haber conseguido sus marcas mediante ayuda de sustancias dopantes siguen abiertas. Existen otros ejemplos de récords de la década de los años 80 e inicios de la década de los 90 que aun hoy continúan sin ser batidos.

Antes del año 1998 todavía tenía lugar el debate de la regulación y legislación sobre el dopaje en distintos foros como el IOC, varias

Federaciones Deportivas y gobiernos de distintos países, por lo cual derivaban distintas definiciones, políticas y sanciones. Uno de los resultados de esta confusión fue que las sanciones eran frecuentemente cuestionadas y algunas veces desautorizadas en tribunales civiles.

En 1998 un amplio número de sustancias médicas prohibidas fueron encontradas por la policía en una redada durante el Tour de Francia. Un fisioterapeuta relacionado con el equipo ciclista Festina Lotus fue interceptado en la frontera franco-belga con un elevado número de productos dopantes, entre ellos eritropoyetina (EPO) y rhGH (8). Todos los miembros del equipo fueron arrestados y en los interrogatorios en dependencias policiales siete de ellos admitieron haber estado tomando EPO. El médico del equipo también fue arrestado y numerosos miembros del Festina Lotus fueron expulsados de la carrera y algunos de ellos sancionados deportivamente. El corredor estrella del equipo no confeso inicialmente, siendo en aquellos momentos uno de los favoritos al triunfo final. No obstante dos años después, en octubre del año 2000 finalmente confesaría y sería sancionado.

Este escándalo condujo a una mayor reevaluación del papel de las autoridades públicas en los casos anti-dopaje y destacó la necesidad de crear una agencia internacional independiente, que estableciese una serie de normas o reglas unificadas en relación a la lucha contra el dopaje y a promover, coordinar y supervisar los esfuerzos de las organizaciones deportivas y autoridades públicas.

El IOC tomo la iniciativa y convocó la primera Conferencia Mundial del Dopaje en el Deporte en Lausanne en febrero de 1999.

Siguiendo la propuesta de la Conferencia, se creó el 10 de noviembre de 1999 la Agencia Mundial Anti-Dopaje (A.M.A. o en el acrónimo en inglés, WADA). Las actividades de la WADA incluyen investigación científica, educación, desarrollo de capacidades anti-dopaje, y supervisión del código anti-dopaje (World Anti Doping Code) documento que armoniza las políticas anti-dopaje en todos los deportes y en todos los países.

Desde finales de la década de 1960, en que se incorporaron paulatinamente los controles anti-dopaje, hasta nuestros días, los avances realizados han sido muy significativos, tanto mediante una mejora tecnológica evidente como fruto de años de investigación, se han ido desarrollando nuevos métodos cada vez más sensibles que permiten detectar actualmente una gran cantidad de sustancias prohibidas. No obstante cada vez hay nuevos retos para establecer nuevas metodologías que permitan la detección de sustancias prohibidas. Una de ellas, la hormona de crecimiento humana (hGH), fue incluida por el IOC en la lista de sustancias prohibidas en el año 1989, pero no fue hasta unos años después cuando este organismo reconoció la necesidad de disponer de un test de detección para la hGH. Cuando se creó la WADA, la detección de hGH seguía siendo uno de los retos más importantes para la agencia de nueva creación. La hGH era una molécula muy difícil de detectar a priori debido a la complejidad de discernir entre la hormona propiamente sintetizada y secretada a nivel fisiológico principalmente por la glándula hipofisaria humana y la hormona recombinante, estructuralmente idéntica a la variante molecular fisiológica mayoritaria de hGH. Desde el inicio en que se

empezaron a incluir hormonas-proteínas en las listas de prohibiciones hasta la actualidad la lista no ha parado de ampliarse. En la actualidad esta lista ocupa el apartado S.2(9) denominado como “hormonas peptídicas, factores de crecimiento y sustancias relacionadas”. La GH es la hormona peptídica que figura en el punto 5 de este apartado S.2, junto a otros componentes relacionados.

1.2 Abuso de hGH en el deporte.

La hGH debido sobre todo a su actividad anabólica y lipolítica entre otras, representa una atracción para deportistas profesionales debido principalmente a su efecto ergogénico. Aunque no existieran evidencias claras que reforzaran el papel de la rhGH como ayuda ergogénica (10), más recientemente si se ha sugerido que la rhGH puede incrementar la fuerza muscular y la capacidad de sprint en corredores (11;12). Cuando el deportista realiza una actividad física la obtención de la energía cinética necesaria es a partir de lo que podríamos denominar combustibles metabólicos como serian los casos de glucosa para ejercicios de elevada intensidad a corto plazo y ácidos grasos libres para actividades físicas a más largo plazo. Para ello el músculo necesita aporte de nutrientes y oxígeno para las fibras musculares. La hGH debido a sus múltiples acciones tanto anabólicas (síntesis de proteínas) como catabólicas (lipólisis, con generación de ácidos grasos libres) tiene influencia durante el ejercicio por medio de efectos combinados con incrementos del aporte de oxígeno a las fibras musculares, el incremento de la

disponibilidad de ácidos grasos libres, incrementando también la fuerza y masa muscular, reduciendo la grasa corporal y mejorando la termorregulación (13). Por estas circunstancias la hGH podría mejorar ostensiblemente el rendimiento físico durante el ejercicio, evitar que el atleta se pueda beneficiar de ello se convertirá en el obstáculo a batir.

La hGH fue inicialmente extraída y purificada de glándulas hipofisarias humanas de cadáveres en 1956 (ver figura 1)(14). Se había demostrado que podía estimular el crecimiento en animales con déficit de hGH hipofisaria y rápidamente se empezó a utilizar también para tratar niños con este mismo déficit de hGH(15). Los efectos beneficiosos en adultos también se observaron, cuando la hGH incrementaba el vigor, energía y sentido del bienestar en una mujer con déficit hipofisario del adulto(15).

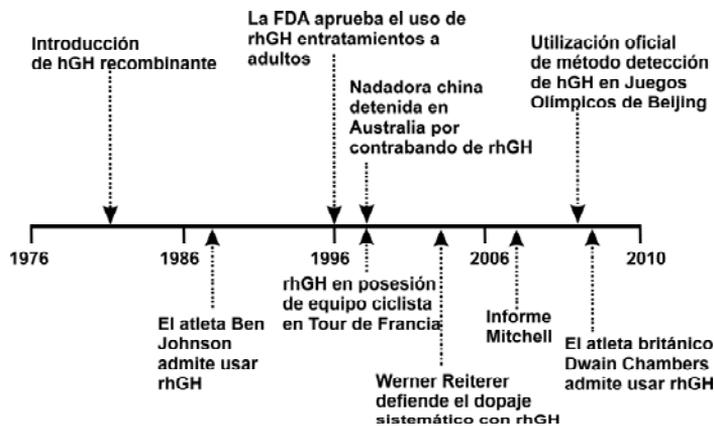


Figura 1.- Time-line de la hGH en el abuso por deportistas profesionales.

Cuando se puso de manifiesto la evidencia científica de que la hGH derivada de hipófisis humanas era un posible origen para el

contagio de la enfermedad inducida por priones denominada también enfermedad de Creutzfeldt–Jacob, se inició ya el principio de su prohibición y consiguiente retirada del mercado en 1985, aunque suministros de hGH derivada de hipófisis humana parece ser que aun hoy continúan disponibles en el mercado negro(6). No obstante basta poner en un buscador el nombre de “hormona de crecimiento venta” y aparecen más de 550000 entradas relacionadas o bien con productos recombinantes, productos de origen animal o bien con productos relacionados con secretagogos de hGH como ghrelina y otros secretagogos de origen sintético. Evidentemente que en innumerables casos se dan fraudes y en muchos de estos productos una vez analizados, existen apenas en algunos casos trazas del producto anunciado.

No obstante desde hacia varios años anteriores a la prohibición de la hGH humana se estaba desarrollando mediante tecnología DNA recombinante la síntesis de hormonas polipeptídicas (16), la primera de ellas la insulina (17) que ya se comercializó entre 1981 y 1982. Posteriormente coincidiendo en los mismos años de la prohibición la hGH procedente de cadáveres, se dispuso ya comercialmente en 1987 (molécula desarrollada desde 1981 hasta 1985) de las primeras versiones de rhGH (metionil-rhGH y rhGH) procedentes ambas del fabricante Genentech Inc. (**GEN**etic **En**gineering **TECH**nology) (18) siendo considerada esta compañía la que fundó la industria de la biotecnología. De hecho uno de sus fundadores, el bioquímico H. W. Boyer fue uno de los científicos pioneros de la tecnología de DNA recombinante. Posteriormente también se obtuvo rhGH sin el aminoácido (AA) metionina añadida a la secuencia y ambas formas

experimentadas en animales presentaban perfiles farmacocinéticos equivalentes (19). Esta comercialización si bien facilitaba de nuevo un tratamiento terapéutico adecuado con hGH con las debidas garantías médicas, también abría una nueva perspectiva en el apartado del dopaje en el deporte.

Existen actualmente bastantes productos disponibles en el mercado farmacéutico derivados todos de tecnología DNA recombinante, la mayoría proceden de dicha tecnología aplicada a la bacteria “*Escherichia coli*” (*E. coli*) como elemento productor. También existe la excepción de los laboratorios Serono que producen la hormona hGH recombinante denominada con el nombre comercial de Saizen®, obtenida con células de ovario de ratón chino (CHO). A modo de resumen se exponen en la tabla 1 las distintas formas comerciales de hGH recombinante.

Tabla 1.- Distintas preparaciones farmacéuticas DNA recombinante de hGH.

PREPARACIONES FARMACÉUTICAS DE rhGH	
PRODUCTO	LABORATORIO FARMACÉUTICO
Genotropin (en España Genotonorm)	Laboratorios Pfizer
Humatrope	Lilly
Norditropin	Novo Nordisk
Nutropin	Gentech
Saizen	Serono
Serotostim	Serono
Tev-tropin	Savient Pharmaceuticals
Zomacton	Ferring Pharmaceuticals
Zorbtive	Serono

La utilización de estos productos en el ámbito médico varía según la legislación de cada respectivo país. Actualmente en España, después de numerosos escándalos en el que se vieron implicadas

farmacias y profesionales sanitarios (médicos, farmacéuticos) como parte de un mercado de obtención de los distintos preparados de rhGH, se prohibió su utilización a nivel de farmacias y del uso de recetas. Actualmente el uso de rhGH esta restringido exclusivamente a los departamentos de farmacia de hospitales. Los pacientes candidatos a ser tratados con rhGH, en Cataluña en concreto, deben someterse a un determinado número de pruebas, estando todo ello protocolizado. Posteriormente estas pruebas realizadas por un determinado Servicio de Endocrinología de un Hospital se envían al organismo oficial del departamento de salud de la Generalitat de Cataluña el “Consell Assessor sobre la Utilització Terapèutica de l'Hormona del Creixement i Substàncies Relacionades”. Según el resultado de estas pruebas este consejo asesor constituido por expertos dará, o no, autorización para que el paciente reciba tratamiento que será adecuadamente financiado por el Sistema Público de Salud.

Como y cuando se utilizo por primera vez la hGH como agente dopante se desconoce pero la primera publicación que llamó la atención hacia el tema fue el libro escrito por el culturista Dan Duchaine el cual salio a la luz publica en California en 1982(20). Aunque este libro contiene algunos errores fundamentales, como la recomendación y publicidad sobre el uso de GH de origen animal en humanos, la descripción de sus acciones era muy precisa. Según Duchaine las personas que la utilizaban podían ganar entre 14 y 18 kg de músculo en 10 semanas.

Aunque se ha debatido mucho acerca de las propiedades potenciadoras de la hGH(10), según otros trabajos ejerce una actuación beneficiosa tanto en usuarios en abstinencia de esteroides anabólicos como en personas sanas mayores(11;21).

Después del libro de Duchaine el caso más conocido del uso y abuso de hGH en atletas profesionales de elite se presenta en 1988 en el caso ya comentado del velocista canadiense Ben Johnson cuando se detecto en su orina estanzolol. Con posterioridad a su descalificación, tanto él como su entrenador admitieron bajo juramento en una investigación posterior, que habían utilizado hGH además de esteroides anabólicos (22;23).

Después de este escándalo, se realizó una investigación exhaustiva en el transcurso de la cual, otros atletas también admitieron el uso de hGH junto con otros fármacos (24). Entre las conclusiones se admitió que las regulaciones sobre el uso de hGH no habían evitado su inapropiada disponibilidad para los atletas.

Es imposible determinar la prevalencia precisa del abuso de hGH entre deportistas, aunque inicialmente su uso era recomendado para disciplinas de fuerza, atletas de disciplinas de resistencia fueron también atraídos por sus acciones lipolíticas y reducción del tejido graso. Después del caso del velocista Ben Johnson, el IOC incluyó esta hormona en su lista de sustancias prohibidas en 1989 como parte de una nueva clase de dopaje abriendo un nuevo apartado de “hormonas peptídicas y análogos” a pesar de la ausencia de una prueba legitimada para su detección. Posteriormente, ya declarada oficialmente como sustancia prohibida, se dieron nuevas evidencias de su consumo, como la ya comentada del caso del

equipo ciclista Festina Lotus en el Tour de Francia en 1998. También en este mismo año y antes de iniciarse los Campeonatos Mundiales de Natación de 1998 en Perth (Australia) una nadadora china fue interceptada por la policía en el aeropuerto intentando entrar en su equipaje numerosos viales de hormona de crecimiento recombinante humana (rhGH).

Unos pocos atletas han admitido tomar rhGH. Un jugador de fútbol americano admitió antes de morir que un 80 % de jugadores de este deporte habían tomado rhGH. En el año 2000, el campeón australiano de lanzamiento de disco Werner Reiterer reivindicó el uso institucional y supervisado de rhGH. También es interesante destacar que 6 meses antes del inicio de los Juegos Olímpicos de Sydney en el año 2000, 1575 viales de rhGH fueron robados del almacén de importación en Sydney.

Algunos años más tarde se haría público un nuevo escándalo estando implicada la empresa "Bay Area Laboratory Co-Operative" (BALCO) en San Francisco después del registro hecho a la sede central de BALCO el 3 de septiembre del 2003, cuando fueron halladas evidencias de dopaje sistemático. La empresa BALCO fundada en 1984 por Victor Conte, venía suministrando desde hacía unos años distintas sustancias prohibidas, entre ellas EPO, hGH, Modafinil, y también la Tetrahidrogestrinona (THG), siendo este último el hallazgo más importante de todo el caso. La THG era un esteroide anabólico de diseño de nueva creación y por lo tanto al ser desconocido por los laboratorios anti-dopaje no era detectado. Este esteroide junto a los otros productos formaba parte de un entramado formado principalmente por el propio Conte además del químico

Patrick Arnold y distribuido por el entrenador Greg Anderson. Si bien el origen del caso BALCO no estaba relacionado con el uso de hGH, su investigación si condujo a nuevas evidencias del abuso de hGH. En los interrogatorios llevados a cabo por las autoridades, los conocidos velocistas Marion Jones y Tim Montgomery, reconocieron haber tomado este producto. Victor Conte, el propietario de BALCO, declaro que había suministrado rhGH a muchos atletas americanos de elite incluyendo Tim Montgomery y Marion Jones. Muchos nombres de atletas de elite en atletismo, béisbol y futbol americano estaban implicados en el escándalo. Aunque muchos de ellos negaron haber tomado rhGH, Tim Montgomery admitió supuestamente haber tomado rhGH antes de que un gran jurado federal de Estados Unidos le sancionara a 2 años por un delito de infracciones de dopaje. Marion Jones, 5 veces ganadora de medalla olímpica, admitió en el 2007 el uso de fármacos potenciadores, incluyendo rhGH. Ella fue posteriormente sentenciada a 6 meses de prisión por perjurio al haber negado en su momento haber tomado dichas sustancias. Victor Conte fue encarcelado por 4 meses por su implicación en el escándalo(25).

Aparte de los velocistas de atletismo como Marion Jones y Tim Montgomery, otros jugadores de la Liga Nacional de Futbol Americano (NFL) y bateadores de béisbol que incluyen a Barry Bonds, Gary Sheffield y Jason Giambi, están entre los atletas que han afirmado haber tomado rhGH en el controvertido libro titulado “Game of Shadows”, el cual fue escrito siguiendo investigaciones clandestinas por dos periodistas de San Francisco(25). En una investigación sobre el dopaje en el deporte del béisbol durante el

año 2007 llevada a cabo por una comisión del Senado de Estados Unidos y dirigida por el Senador Mitchell se concluía que el abuso de hGH era generalizado y que la causa era que los jugadores habían empezado a utilizarla porque se conocía que era indetectable(26). El informe planteaba que los jugadores que utilizaban hGH lo hacían porque creían que ello les ayudaba en su capacidad de recuperarse de las lesiones y de la fatiga causada durante la larga temporada.

Más recientemente el atleta británico Dwain Chambers, quien también fue implicado en el escándalo BALCO y sancionado por 2 años por dar positivo para la sustancia THG, cooperó con las autoridades de Gran Bretaña proporcionándoles información acerca de su régimen de dopaje en el cual se incluía rhGH.

La hGH se puede comprar fácilmente por medio de empresas que se anuncian en internet y en una investigación realizada por un ex-remero olímpico, trabajando actualmente para la cadena británica BBC, se pudo demostrar que la tanda de hGH que había comprado era pura. Es un hecho el que la hGH está disponible fácilmente tanto como factor anti-edad como en determinados círculos deportivos aunque ello no es óbice para que también existan innumerables casos de fraude de productos adulterados en la que no existen más que trazas del producto anunciado. La hGH destinada para uso terapéutico ha terminado en muchos casos en posesión de atletas, ya que existen informes sobre padres que han vendido la hGH prescrita para tratar el déficit de GH de sus hijos en el mercado negro (6).

El hecho de que aunque a partir de 1989 ya fuera oficialmente prohibida por el IOC, no pareció detener el uso de hGH y para muchos atletas, empezó a ser un fármaco de elección (27). Las acciones posteriores de cara a implementar la prohibición de hGH fueron asumidas a partir de 1991, cuando la Sub-Comisión de Dopaje y Bioquímica en el Deporte (IOC) invitó a determinadas personalidades del mundo científico a unirse a esta Sub-Comisión como asesores.

En este momento, el IOC tenía únicamente una experiencia científica muy limitada en tratar con el complejo mundo de las proteínas y hormonas glicoprotéicas, solamente existía experiencia con inmunoensayos ya comercializados para la gonadotropina coriónica humana (hCG) en orina.

El primer obstáculo que se planteó con la hGH fue la necesidad de llevar a cabo pruebas de análisis en sangre y no en orina como se venía haciendo previamente en la mayoría de pruebas. Esto era debido a que en orina las cantidades presentes podían representar mayores problemas de detección debido a que solamente una pequeña cantidad de la hGH filtrada por las nefronas renales (~ 0.01 %) es excretada en la orina(28-32) con lo cual el test debería disponer en el caso de orinas con límites de detección que aun hoy parecen inalcanzables. De hecho las pruebas en sangre se introdujeron un año antes en los Juegos Olímpicos de Lillehammer en 1994 para detectar transfusiones de sangre heteróloga. Aun actualmente muchas federaciones internacionales, como en el caso de la UEFA (Unión Europea de Fútbol Asociación) no utilizan sangre ya que la obtención de muestras como orina representa un

método menos cruento que la sangre y de menor riesgo para el deportista.

El segundo obstáculo fue el concepto de crear la necesidad de investigar científicamente el desarrollo de un nuevo método para detectar la hGH con garantías científicas de éxito, es decir con la suficiente capacidad de detección de casos de abuso con hGH.

El sentimiento generalizado en el ámbito científico y en el propio IOC era de estar ante un reto de una complejidad extrema debido a la exacta similitud química en la secuencia de AA entre la variante molecular mayoritaria de 22 kDa hGH de la hormona sintetizada y secretada en el propio cuerpo humano, y el preparado farmacológico en forma de hormona recombinante (rhGH) de la misma variante molecular que la fisiológica. Para intentar comprender mejor esta complejidad se describen a continuación características fisiológicas de la hGH.

1.3 Características fisiológicas de la hGH.

La hGH, o también denominada en algunos ámbitos farmacológico-médico-puristas como somatropina, presenta diferentes formas moleculares asociadas a la misma proteína. La heterogeneidad viene dada a diferentes niveles, en la síntesis cuando en la transcripción del propio gen de hGH se produce un splicing alternativo aparte del splicing original. Además, también se produce la heterogeneidad debido a modificaciones post-traduccionales de la proteína, y también en su metabolismo periférico después de ser secretada por la glándula hipofisaria. La existencia de múltiples formas como serían monómeros, dímeros (covalentes, no covalentes, etc.), formas

oligoméricas (trímeros, pentámeros) en todas estos casos variantes de distinto peso molecular (PM), 22 y 20 kilodaltons (kDa), presenta retos para una completa comprensión de su bioactividad, para la precisión de sus mediciones en fluidos corporales, y para la estandarización de los ensayos que se utilizan en su medición.

1.3.1 Síntesis de hGH: Cluster génico y estructura.

El locus génico que codifica la hGH se halla localizado en el brazo largo del cromosoma 17, locus 17q24.2, ocupa 46.83 kb y contiene 5 genes relacionados(33). De los 5 genes, el gen GH-N o GH1 se expresa en las células somatotropas de la hipófisis y en menor grado también en células del sistema inmune (linfocitos)(34;35). Los otros cuatro genes, el GH-V o GH2, y los tres genes de la familia CS (chorionic somatomammotropin) también conocida como lactógeno placentario (PL), se expresan únicamente en las vellosidades del sincitiotrofoblasto de la placenta. El gen GH-V expresa en grandes cantidades una isoforma de hGH de 22 kDa de PM, parecida a la hipofisaria y cuyas diferencias se explican más adelante. Los genes CS relacionados con la somatomamotrofina coriónica, denominados como hCS-A) y hCS-B expresan proteínas maduras idénticas (36), mientras que el quinto gen del cluster, denominado hCS-L, codifica una proteína similar (CS-like-protein) que se expresa en niveles bajos y no se traduce de manera eficiente (37). Cada uno de estos cinco genes del cluster (ver figura 2, splicing y splicing alternativo) esta compuesto de 5 exones (marcados en la figura 2 como I, II, III, IV y V) y 4 intrones (marcados en la figura 2 como A, B, C y D).

El principal producto del gen GH-N es una proteína de cadena simple que consta de 191 AA con un PM de 22.129 Da, con dos puentes di-sulfuro (figura 3, secuencia de AA de hGH). Este caso sería el ejemplo-tipo de hGH hipofisaria y se la conoce como isoforma de 22 kDa hGH-N, siendo la isoforma presente mayoritariamente en circulación sanguínea periférica. La otra isoforma de hGH denominada como 20 kDa hGH-N, también proviene del gen GH-N, pero su origen se debe a un “splicing alternativo” del ácido ribonucleico mensajero (mRNA) y tiene en términos de secuencia una analogía con la ya descrita para 22 kDa hGH-N, excepto en que ha sufrido la delección interna de los residuos de posición 32–46 AA (figuras 2 y 3). Esta isoforma consta pues de 176 AA y un PM de 20.274 kDa. El “splicing alternativo” que la origina está situado en el exon 3(38) y expresa entre el 5–10 % del nivel expresado para la isoforma 22 kDa hGH-N (figura 2). Se ha propuesto también como variante adicional una tercera isoforma de hGH de 17.483 Da de PM, obtenida del salto en el exon 3, perdiendo los residuos 32–71 AA(39). Mientras que esta isoforma se daría en condiciones patológicas en las cuales el gen GH-N presenta una mutación (déficit de GH genético tipo II) no está demostrado que se exprese en cantidades significativas bajo condiciones solamente fisiológicas.

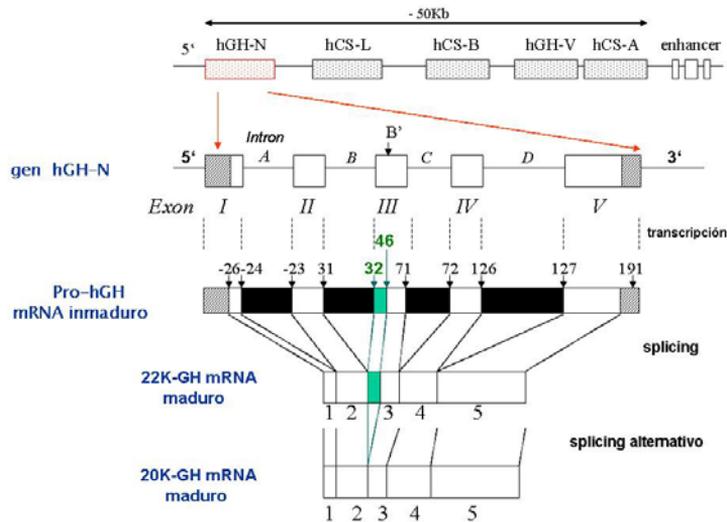


Figura 2.- Splicing y splicing alternativo de la expresión del gen GH-N para dar como resultado las dos isoformas de distinto peso molecular de 22 kDa y 20 kDa hGH.

Otras modificaciones post-traduccionales se presentan en el proceso de síntesis de hGH. Se han encontrado fosforilaciones en los AA serina de las posiciones 51, 106 y 150(40;41), una forma N_{α} -acilada en el AA 1 amino-terminal fenilalanina, así como deamidaciones en los aminoácidos 137 de glutamina a glutamato y 152 de asparagina a aspartato(29;31;32;42). En estos últimos años también se ha descrito una glicosilación en la treonina en posición 60(43-45) cuyo PM de la hormona en principio se establecía en ~ 24 kDa, aunque existe alguna divergencia al respecto ya que recientemente se ha descrito la glicosilación en el mismo AA treonina 60 tanto con PM de 24 kDa(46) como con PM de ~ 23 kDa aproximadamente(47). Esta glicosilación consiste en una O-glicosilación con un tetrasacarido tipo-mucina unido a través de *N*-acetil galactosamina

(GalNAc) al AA treonina en posición 60. La GalNAc tiene dos uniones glicosídicas que forman este oligosacárido de rama biantenaria, la primera rama comprende exclusivamente un *N*-acetil ácido neuramínico (NeuAc) y la segunda un disacárido unido a GalNAc a través de un enlace glucosídico a la galactosa (Gal).

La ubicación de los dos puentes disulfuro está entre las cisteínas de las posiciones 53 y 165, y entre las cisteínas de las posiciones 182 y 189 (ver figura 3).

Se han descrito también otras posibles variantes moleculares, como por ejemplo la isoforma de 5 kDa (secuencia AA: hGH₁₋₄₃)(48-50). Ya en 1983 Singh et al. (48) informo de haberla aislado en la propia glándula (12 µg/g de hipófisis). Después de esta información nadie ha descrito datos experimentales o hipótesis acerca de su potencial síntesis a nivel hipofisario (51) y aun hoy no queda clarificado si este fragmento es un producto natural (48) o bien es producto artefactual (30) o de degradación proteolítica (52). De hecho por medio de endopeptidasas, como serin-endopeptidasas, romperían como en este caso concreto entre los residuos 43 serina – 44 fenilalanina, pudiendo generar fragmentos similares de forma natural “*in vivo*”. Otros fragmentos que potencialmente se pueden generar por ataques proteolíticos a la secuencia de hGH serían entre los residuos 25 de fenilalanina–26 ácido aspártico, 48 prolina–49 glutamina y 54 fenilalanina–55 serina aunque su existencia solamente es teórica y se tendría que demostrar(51).

El mayor fragmento de hGH que se ha postulado ha sido el de 17 kDa de PM que comprendería la secuencia AA: hGH₄₄₋₁₉₁). Este

fragmento ha sido descrito tanto en circulación sanguínea como en la hipófisis(53-55). Sin embargo los ensayos utilizados para probar la existencia de este fragmento no demuestran claramente que la molécula medida sea este fragmento con exactitud o con diferencias entre 1 – 3 AA del fragmento descrito (51). Otros fragmentos proteolizados posibles se han descrito en la literatura científica(51) o se han sintetizado artificialmente(56;57) pero en ningún caso existen pruebas científicas que expliquen de forma clara los mecanismos de síntesis y secreción en la hipófisis o formación periférica.

Estas formas moleculares o variantes están aun hoy en duda de que existan como tales producidas por la hipófisis y algunos autores postulan o bien que son artefactos producidos en procesos de extracción y purificación(30) o bien que puedan existir como producto de proteólisis producidas a partir de la isoforma de 22 kDa(52). Su existencia como especies nativas (originadas en la hipófisis) no se ha demostrado de forma clara.

No obstante, aunque “*in vivo*” no haya datos concluyentes, ni se haya podido identificar el o los enzimas responsables, la reacción, “*in vitro*” si se ha podido reproducir con la formación de estos fragmentos, hGH₁₋₄₃ 1-44 y hGH₄₄₋₁₉₁ 45-191 bien utilizando pepsina (58) o termolisina (52).

Aparte de las isoformas primarias monoméricas ya descritas y también dímeros a partir de estos monómeros mencionados, también existen oligómeros de hGH formados al menos hasta en la forma pentamérica, asociados tanto en forma covalente (mediante puentes disulfuro) como no-covalente. Se han descrito tanto homó-

oligómeros como hetero-oligómeros, compuestos de los monómeros ya descritos. Los oligómeros pueden estar presentes tanto en la glándula hipofisaria secretados como tal o bien en la circulación sanguínea (59-62). Una pequeña fracción de homodímeros ha sido descrita como que podrían ser mercapto-etanol resistentes en los enlaces disulfuro originales de la secuencia(63).

El principal producto generado del otro gen, GH-V expresado en la placenta, es una proteína de cadena simple de 191 AA, de 22.321 kDa de peso molecular, con dos puentes di-sulfuro, similar en estructura a la de 22 kDa hGH-N descrita anteriormente (figura 3). Su secuencia difiere de la anterior en 13 posiciones de AA, siendo una proteína más básica.

Los cambios en la secuencia son los descritos en la figura 3, en el AA18 cambia la histidina por arginina, en el AA 21 histidina por tirosina, en el AA 25 fenilalanina por tirosina, en el AA 37 prolina por leucina, en el AA 65 ácido glutámico por valina, en el AA 66 ácido glutámico por lisina, en el AA 92 fenilalanina por leucina, en el AA 112 ácido aspártico por arginina, en el AA 113 leucina por histidina, en el AA 126 glicina por triptófano, en el AA 140 lisina por asparagina, en el AA 142 treonina por serina y por ultimo en el AA 149 asparagina por lisina.

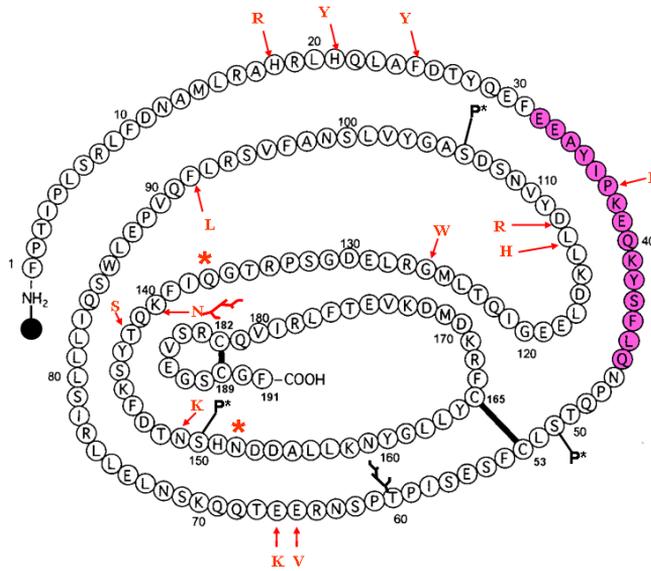


Figura 3.- Estructura primaria de hGH basada en la variante de 22 kDa expresada por el gen hGH-N que representa la secuencia principal del gráfico. La secuencia marcada en la figura con relleno de color morado desde el AA32 al AA46 se elimina en el “splicing alternativo” dando lugar a la variante de 20 kDa hGH. El círculo marcado con relleno color negro en el AA1-NH₂ representa el grupo acil (probablemente acetil) en la forma de hGH acilada. Los dos asteriscos representan los residuos deamidados posibles en la hGH. Las líneas gruesas trazadas entre los AA 53 y 165 y entre los AA 182 y 189 representan los dos puentes disulfuro. La estructura en árbol señalizada en el AA60 representa el lugar de glicosilación en la hGH-N glicosilada de 23-24 kDa. Marcados con P* se muestran los tres residuos fosforilados (AA51, AA106 y AA150) que corresponden a AA serina. Para la GH-V placentaria, los AA designados en la cadena principal en paralelo (en color rojo) y con una flecha que marca a los señalizados en el círculo muestran los residuos cambiados en la secuencia de esta hGH-V. La estructura en árbol señalizada (color rojo) en el AA140 representa el lugar de glicosilación en la hGH-V glicosilada.

Puede presentar una N-glicosilación en la posición del AA 140, aunque también puede presentarse en forma no glicosilada. La

transcripción del gen GH-V parece menos propensa al “splicing alternativo” en el exon 3 que en el caso de la transcripción del gen GH-N, y por ello la isoforma de 20 kDa de hGH-V se produce en cantidades muy pequeñas o poco significativas(64;65). La GH-V es pues producida exclusivamente en la placenta y en el transcurso del embarazo progresivamente va suplantando a la GH-N en la circulación sanguínea materna. Tiene una actividad somatogénica similar a la GH-N pero tiene una actividad lactogénica muy reducida. Por contra las proteínas CS, o también conocidas como PL, también producidas en la placenta en cantidades considerables tienen apenas actividad somatogénica, a pesar de su homología estructural cercana al 85 % con la hGH. Tanto las CS como la GH-V tienen una relevancia muy limitada desde el punto de vista del dopaje o abuso en el deporte por lo que a partir de ahora al referirnos a temas de hGH o isoformas/variantes sera solo exclusivamente a la hGH expresada por el gen GH-N, en caso contrario se referirá en el texto a la hGH placentaria como hGH-V.

1.3.2 Propiedades de las variantes y actividad biológica de la hGH.

La isoforma de 22 kDa hGH, inicialmente fue aislada y posteriormente caracterizada(14;66). Esta isoforma de 22 kDa es la más abundante de las secretadas por la hipófisis y a su vez también es la isoforma producida comercialmente por tecnología DNA-recombinante (rhGH) para uso con fines médico-terapeúticos y que en consecuencia es habitualmente utilizada en el ámbito del dopaje. La isoforma de 20 kDa hGH, fue descrita años más tarde por Lewis

et al.(67) siendo la segunda isoforma más abundante, representando alrededor de entre el 5-10 % de la hGH total(29;67) y fue inicialmente aislada de una fracción dímero de hGH. Esta isoforma presenta una elevada propensión a dimerizar.

En extractos hipofisarios se presentan otras isoformas adicionales, algunas nativas y otras que podrían ser artefactos ocasionadas en el propio proceso de extracción. Esta isoforma de 20 kDa aunque ha sido producida también comercialmente por la industria farmacéutica (68), nunca se ha utilizado con fines médico-terapéuticos. Las modificaciones post-traduccionales de la isoforma de 22 kDa hGH ya han sido descritas en el apartado anterior e incluyen una forma N-acilada y dos formas deamidadas (ver figura 3). La forma N-acilada representaría aproximadamente el 4 % del total de isoformas en la glándula hipofisaria. Las deamidaciones representan un 2 % la primera (AA-137, glutamina) y un 6 % la segunda (AA-152, asparagina) del total de isoformas estimado en la glándula hipofisaria(31;42).

Formas fraccionadas de hGH se han encontrado en el proceso de producción de hGH DNA- recombinante (69;70) pero se pueden eliminar durante el proceso de purificación.

La estructura terciaria de la isoforma monomérica de 22 kDa hGH y también de la isoforma monoméricas de 20 kDa hGH (figura 4) está formada por 4 hélices alfa, anti-paralelas, enroscadas, característica afín al grupo de proteínas de la familia de las citoquinas(71). Este tipo de estructura cristalográfica no está aun disponible para otras isoformas de hGH. El extremo C-terminal de la helix 1, así como

parte del bucle entre las helix 1 y 2, incluyendo la mini-helix 1, no se ha encontrado en la variante de 20 kDa hGH.

ESTRUCTURA TERCIARIA DE LA hGH

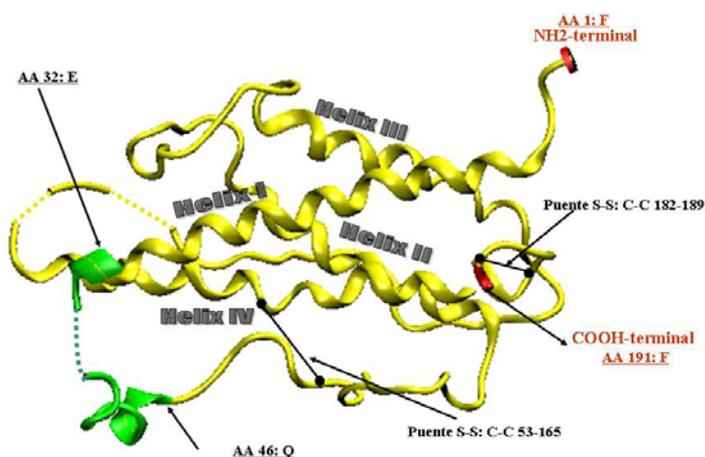


Figura 4.- Estructura terciaria de la isoforma 22 kDa hGH obtenida de PDB (Protein Data Bank: 1HGU). En la figura están representadas las cuatro helix (I, II, III y IV) y los AA del extremo NH₂ de la secuencia (AA 1: fenilalanina) y del extremo carboxi-terminal (AA 191: fenilalanina). La secuencia entre los AA 32 ácido glutámico y AA 46 glutamina, representa la zona eliminada en el “splicing alternativo” en la síntesis de la variante de 20 kDa. Los puentes disulfuro (S-S) están marcados en la figura entre las cisteínas de los AA 53-165 y AA 182-189.

La información sobre otras isoformas es limitada debido a que gran parte de la información proviene de bioensayos realizados “*in vitro*”, lo que hace que en algunos casos las actividades obtenidas en ensayos clásicos en rata o en sistemas celulares no son necesariamente extrapolables a condiciones “*in vivo*” en la especie humana.

Las actividades expuestas (ver tabla 2) son un resumen de las actividades biológicas más importantes y consensuadas de forma universal.

Las principales actividades biológicas de la variante de 22 kDa hGH esta detalladas en la tabla 2.

Tabla 2.- Principales actividades biológicas de la hGH.

Retención de nitrógeno y transporte de aminoácidos al músculo

Promoción del crecimiento somático.

Promoción del crecimiento de placas por elongación

Generación de IGF-I, IGF BP-3 y ALS.

Estímulo de la Lipólisis.

Estimula la actividad del tejido óseo

Retención de sodio y fósforo.

Antagonismo con la Insulina

Hiperplasia de células-beta

Efecto temprano Insulina-like

Lactogénesis

Lactogénesis

La información sobre otras isoformas es limitada debido a que gran parte de la información proviene de bioensayos realizados “*in vitro*”, lo que hace que en algunos casos las actividades obtenidas en ensayos clásicos en rata o en sistemas celulares no son

necesariamente extrapolables a condiciones “*in vivo*” en la especie humana. Las actividades expuestas en la tabla 2 son un resumen de las actividades biológicas más importantes y consensuadas de forma universal. Es de mencionar que si el abuso de hGH en el deporte también se basara no solo en mejorar el rendimiento deportivo en algunas especialidades sino también en lograr unas recuperaciones más rápidas de lesiones, las actividades anabólicas y lipolíticas de la hGH deberían ser las más importantes (32).

Las distintas isoformas de hGH tienen cualitativamente bioactividades similares en humanos. Inicialmente se informó acerca de que la variante de 20 kDa hGH, en comparación con la de 22 kDa hGH, podía presentar una actividad diabetógena disminuida aunque muchos de estos datos eran confusos debido a que estaban basados en estudios realizados en otras especies (72-74). Posteriormente este dato no pudo ser confirmado en humanos (75). En ratas, se encontraron similitudes entre la actividad promotora del crecimiento de la variante 20 kDa hGH “*in vivo*” y la encontrada en 22 kDa hGH(68;76). En diferentes sistemas celulares transfectados con el receptor de hGH (GHR), 20 kDa hGH y 22 kDa hGH provocaron en general respuestas biológicas equivalentes (77-80). En un ensayo clínico con humanos, la isoforma de 20 kDa hGH exhibía actividades metabólicas cualitativamente y cuantitativamente comparables a las de 22 kDa hGH-N, incluyendo la generación del factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-I) y su proteína de transporte la proteína transportadora 3 de los factores de crecimiento similares a la insulina (IGF BP-3), actividad

lipolítica, cambios en la composición corporal, e inducción de la resistencia a la insulina (75).

La administración exógena de 20 kDa hGH suprime la secreción endógena de 22 kDa hGH por medio del denominado bucle de retroalimentación (feedback) corto (short loop) y del bucle de retroalimentación largo (long loop) que se puede dar en hormonas hipofisarias anteriores (81). En una breve explicación estos dos bucles se dan solamente sobre las hormonas del sistema hipotálamo-hipofisario, es decir cuando el mecanismo de control de la cadena hormonal se ejerce sobre la hipófisis (bucle largo) o si se ejerce sobre el hipotálamo directamente (bucle corto). También ocurre lo mismo en el caso contrario de administración exógena de 22 kDa hGH y la supresión de la secreción endógena de la isoforma de 20 kDa hGH (82-85).

En resumen parece que las formas monoméricas de hGH tienen similares bioactividades “*in vivo*”, tanto en términos cuantitativos como cualitativos. Las formas de hGH oligoméricas parecen tener en cambio bioactividades más reducidas, comprobado solo mediante bioensayos “*in vitro*”, ya que hay poca información de sus bioactividades “*in vivo*” (32).

1.3.3 El Receptor de hGH y las proteínas de unión de hGH.

Las acciones de la hGH son mediadas con su unión al GHR en los tejidos diana, bien directamente por la activación de la tirosina-quinasa e indirectamente mediante la inducción de IGF-I. El GHR es un receptor de membrana perteneciente a la superfamilia clase I de

las citoquinas(86;87) que esta presente en tejidos diana de la hGH aunque concretamente es más abundante en el hígado. El GHR, en su longitud total es una proteína de membrana de 620 aminoácidos, con una región de 246 residuos como dominio extracelular implicados en el ligando de unión y la dimerización del GHR, solamente 24 residuos en la hélice de la porción transmembrana y 350 residuos del dominio intra-citoplasmático implicados en la señal de transducción (88). La proteína de unión de la hGH (GHBP) presente en la circulación sanguínea es una forma soluble más corta en longitud y que correspondería al dominio extracelular ya comentado del receptor (89). Mientras que en algunos animales, la GHBP se codifica por un mRNA específico, en la especie humana la GHBP se deriva del GHR por fragmentación proteolítica en un sitio cercano a la membrana por medio de la metaloproteinasa TACE (enzima conversor del factor alfa-tumor necrosis factor)(90). La hGH tiene dos epitopos de unión para el receptor en su superficie, sitios de unión denominados como “site 1” (en forma cóncava y formado por residuos de AA en la superficie del helix IV y en menor extensión del helix I) y el “site 2” (en relación al 1 es relativamente plano, estando implicados residuos de AA de la superficie de los helix I y III). La hGH interacciona por medio del sitio 1, de más alta afinidad, con la primera molécula del GHR y con ello promueve la dimerización del receptor por interacción con el site 2 de mas baja afinidad (51). Así pues la hGH forma con estos dos lugares de unión un complejo 2:1 con el GHR. Este complejo ternario se estabiliza y causa cambios conformacionales que inician que el GHR transmita señales intracelulares por medio de distintas

cascadas de fosforilación como la janus quinasa (JAK)-transductores de señales y activadores de transcripción (STAT), fosfatidil inositol 3' (PI3) quinasa, proteínas activadas por mitógenos (MAP) quinasa, así como también otras vías. Un primer paso crítico es el reclutamiento de la JAK 2 hacia el recién formado dímero de GHR(91;92). La dimerización inducida por la hGH en la superficie celular de GHR parece que es un requisito para la actividad biológica de la hormona.

La hGH también interactúa con el receptor de prolactina(93), aunque ello no implica que pueda suplantar completamente el papel que desempeña la prolactina en la lactación. La GH animal no se une al receptor de prolactina aunque en el caso concreto de algunas especies, como en el caso de la vaca, la GH promueve la producción de leche a través del GHR. Esta propiedad es la base del uso comercial de GH bovina diariamente en la industria.

La fracción soluble del dominio extracelular del GHR es la GHBP como ya se ha comentado. En la circulación sanguínea se encuentran dos formas de GHBP, una de alta afinidad y otra de baja afinidad (94). La GHBP de alta afinidad es el dominio extracelular del GHR. La GHBP de baja afinidad no proviene del GHR sino que es una versión modificada del inhibidor de proteínasa purificado (α_2 -macroglobulina) que forma complejos con la hGH(95). El término genérico GHBP se aplica sobre la GHBP de alta afinidad. La de baja afinidad tiene una importancia biológica limitada como proteína de unión a hGH.

La GHBP se une aproximadamente a la mitad de hGH circulante bajo condiciones basales pero se satura fácilmente a niveles elevados de hGH (como sería en el caso de la situación de abuso de hGH en el deporte). Se puede formar exactamente el mismo complejo ternario entre dos moléculas de GHBP y una molécula de hGH aunque más bien predomina en suero el complejo 1:1 debido a que en situaciones fisiológicas predomina una concentración baja de GHBP(96). La GHBP se encuentra supeditada a funciones como actuar de depósito o reservorio para la hGH, prolongar en sangre su vida-media, competir con los GHR, y probablemente la formación del hetero-dímero improductivo con el GHR. Los niveles en suero de GHBP van aproximadamente en paralelo con la expresión de GHR, particularmente en el hígado. En general, niveles bajos de GHBP se dan en condiciones asociadas a resistencia a la hGH (e.g., malnutrición, diabetes no controlada, estados catabólicos, insuficiencia renal, hipotiroidismo). En cambio, la obesidad siendo una condición que aumenta la capacidad de respuesta de la hGH, esta asociada con niveles elevados de GHBP.

Seguida a su secreción, la hGH en circulación se asocia de forma rápida a la GHBP de alta afinidad (constante de disociación en el rango nanomolar, afinidad $\sim 10^8 \text{ M}^{-1}$)(29;51). Por debajo niveles fisiológicos ($\sim 10 \mu\text{g/L}$) entre el 45–55 % de 22 kDa hGH y $\sim 25 \%$ de 20 kDa hGH se unen a esta GHBP. Solo entre el 5-8 % de 22 kDa hGH se unen a la segunda GHBP (α_2 -macroglobulina) de baja afinidad (constante de disociación en el rango micromolar $\sim 10^5 \text{ M}^{-1}$)(29;32;51). La variante de 20 kDa hGH en cambio se une preferencialmente a esta α_2 -macroglobulina debido a que tiene una

avidez baja para la GHBP de alta afinidad. Por encima de estos valores fisiológicos ya citados de $\sim 10 \mu\text{g/L}$ la fracción unida empieza a declinar debido a la saturación parcial de la GHBP(97). Los elevados PM de los complejos circulantes de hGH-GHBP protegen a la hGH del aclaramiento renal y la degradación, estos complejos circulan pues como un “pool” de hGH prolongando su biodisponibilidad. Solamente la GHBP de alta afinidad puede interferir en las mediciones de hGH, aunque como ya se ha comentado, a concentraciones más elevadas de hGH (por encima de $10 \mu\text{g/L}$), como sería el caso de una situación de dopaje, la GHBP se satura fácilmente. En muestras de suero cargadas con GHBP (rango entre $220 - 3520 \text{ pmol/L}$) se midieron concentraciones de hGH y estas se fueron reduciendo progresivamente conforme se iba incrementando la concentración de GHBP, no obstante las ratios entre las concentraciones de los distintos inmunoensayos permanecían inalterados con variaciones $< 10 \%$ (98).

La hGH-V se une a la GHBP de idéntica manera que 22 kDa hGH. La unión de las otras isoformas de hGH, incluyendo las formas oligoméricas, a las diferentes GHBP se desconoce. La unión a las GHBP puede ser fácilmente reversible y cambiar dinámicamente según la fluctuación de los niveles de hGH como resultado de la secreción y aclaramiento (99).

1.3.4 Otras variantes moleculares e isoformas de hGH: hGH acilada, deamidada y glicosilada.

Las formas deamidadas y aciladas, ya explicadas anteriormente en el apartado de “síntesis de hGH: Cluster génico y estructura”,

presentan actividades promotoras del crecimiento y diabetogénicas equivalentes en roedores(100-102) así como también se ha observado en ensayos de proliferación celular “*in vitro*”(102), pero la información sobre la bioactividad de estas variantes de hGH en otros aspectos es limitada. Una razón para estos datos limitados es la no disponibilidad de estas isoformas en estado puro. Lo mismo es cierto para hGH glicosilada cuya bioactividad en la actualidad se desconoce.

1.3.5 GH-V placentaria.

La GH-V es similar a la isoforma de 22 kDa hGH-N en su actividad somatogénica, pero tiene propiedades lactogénicas débiles (103;104). Sus actividades metabólicas son también similares (105). La afinidad de la hGH-V hacia el receptor GHR y la GHBP es comparable a la de 22 kDa hGH-N, mientras que para el receptor de la prolactina su afinidad es baja (106;107). Se conoce poco acerca de las diferencias potenciales en actividades biológicas entre GH-V no-glicosiladas y glicosiladas.

1.3.6 Oligómeros de la hGH.

Las formas oligoméricas extraídas de la hipófisis que consisten en una mezcla de oligómeros nativos y parcialmente agregados/desnaturalizados de hGH tienen una actividad promotora del crecimiento reducida(108). Fracciones diméricas de hGH hipofisaria (“big GH”) tienen entre un 20 % y un 65 % de potencia de unión en un ensayo GHR radio-receptor(109;110). Se plantean dificultades adicionales en la evaluación de la actividad biológica

de los oligómeros de la GH debido a que se han producido pocos en forma pura, y hay evidencias de agregación/desagregación bajo condiciones de almacenaje y quizás durante la incubación con preparaciones de receptor (111). No obstante, tomado en conjunto, los datos disponibles sugieren que la bioactividad de los oligómeros de GH producidos de forma natural comparados a 22 kDa hGH monomérica oscilan desde algo reducida a una bioactividad completa. Parece no haber diferencias cualitativas en la gama de bioactividades. No obstante como ya se ha explicado la hGH-V tiene poco interés desde el punto de vista de abuso de hGH en el deporte y no existe hasta la fecha ningún preparado farmacéutico relacionado.

1.3.7 Proporciones de isoformas de hGH en la hipófisis.

La estimación de la distribución promedio entre las isoformas de hGH en hipófisis humanas se describe en la tabla 3, y esta basado en una composición entre datos de extractos hipofisários(59;67;100;110;112) e isoformas de hGH liberadas por cultivos hipofisários “*in vitro*”(113-116).

La proporción de artefactos de extracción (e.g. agregados, fragmentados, u oxidados de hGH) varía dependiendo del método de extracción, tiempo y temperatura de almacenaje, ciclos de congelación-descongelación, etc.

Tabla 3.- Estimación representativa de las isoformas de la GH en la glándula hipofisaria.

GH monomérica	
22 kDa hGH	55 %
20 kDa hGH	6 %
GH deamidada	
22 kDa hGH-Asp ¹⁵²	6 %
22 kDa hGH-Glu ¹³⁷	2 %
22 kDa hGH N-acilada	4 %
hGH glicosilada	
	% desconocido
GH dimérica	
dímeros no-covalentes (homo- y heterodímeros)	10 %
dímeros disulfuro	7 %
otros dímeros no-disociables	1 %
GH oligomérica	
oligómeros no-covalentes	5 %
oligómeros unidos (linked) a disulfuros	2 %
otros oligómeros no-disociables	<1 %

1.3.8 Regulación de la secreción de isoformas de hGH.

La secreción hipofisaria de hGH es pulsátil bajo control hipotalámico por medio de estimulación con hormonas liberadoras de la GH (GHRH) y la inhibición de la somatostatina (SRIH). La ghrelina, derivada en su síntesis principalmente de células del fundus del estomago y también del hipotálamo, desempeña un papel menos importante en la secreción de hGH, aunque en contraste con esta afirmación la ghrelina y la familia de congeneres sintéticos relacionados, todos ellos denominados secretagogos de la hGH (GHS) o también péptidos liberadores de GH (GHRP) son potentes estimuladores de la secreción de la hGH cuando son administrados “*in vivo*” (32). El modelo de secreción/inhibición llevado a cabo por GHRH y SRIH afecta a todas las isoformas de hGH derivadas de la

hipófisis, con co-secreción de los contenidos de gránulos secretorios (84;117-119). No se han presentado evidencias convincentes de regulaciones específicas en la secreción de isoformas en forma individual.

Las proporciones de isoformas de hGH en sangre cambian en función del tiempo transcurrido después del pulso secretorio, debido a las diferentes velocidades de aclaramiento que tienen en la sangre las diferentes isoformas individualmente. Por lo tanto, que las proporciones prevalezcan en una muestra aleatoria de sangre puede que no sea necesariamente representativo de las proporciones secretadas. En pacientes con acromegalia o anorexia nerviosa se han encontrado proporciones ligeramente más elevadas de 20 kDa hGH en circulación sanguínea que en otros sujetos (118), aunque en otros trabajos no se han encontrado alguna de estas diferencias (84).

En contraste a las isoformas de hGH hipofisárias, la GH placentaria hGH-V no está bajo control hipotalámico. Su modelo de secreción es más crónico/tónico que pulsátil (120). Su producción empieza en las primeras semanas de gestación (121-123) y se pueden medir en circulación materna entre las semanas 7-13 niveles de hGH-V de $0.9 \pm 0.5 \mu\text{g/L}$ (rango de $0.02 - 1.7 \mu\text{g/L}$). Luego posteriormente se va incrementando progresivamente hasta que los niveles maternos en sangre alcanzan una meseta alrededor de 4 semanas antes de que el embarazo llegue a término. Se han encontrado niveles de hGH-V entre las semanas 18-22 de $2.8 \pm 0.9 \mu\text{g/L}$ (rango de $1.4 - 5.5 \mu\text{g/L}$), entre las semanas 28-32 niveles de $7.3 \pm 2.6 \mu\text{g/L}$ (rango de $2.0 - 14.9 \mu\text{g/L}$) y por último entre las semanas 37-41 niveles de $13.0 \pm 9.6 \mu\text{g/L}$ (rango de $2.1 - 69.8 \mu\text{g/L}$)(124). En general en el tercer

trimestre del embarazo, las concentraciones de hGH-V llegan a un rangos máximos y dependiendo del inmunoensayo utilizado con un amplio rango desde valores por debajo de 10 $\mu\text{g/L}$ hasta valores por encima de 60 $\mu\text{g/L}$ (123;124).

Los factores que controlan la secreción de hGH-V, distintos de la propia progresión gestacional en si misma, son en gran parte desconocidos. La hGH-V no atraviesa hacia el compartimento fetal y es indetectable en sangre de cordón(121) aun que es conocido que la hGH-V placentaria sustituye progresivamente la hGH-N hipofisária durante el embarazo por medio de un feed-back o retroalimentación negativa de circuito corto con la IGF-I(120;125).

1.3.9 Análisis de isoformas de hGH en circulación sanguínea.

La distribución de isoformas hGH hipofisárias en suero humano entre 15 y 30 minutos después de la secreción se resume en la tabla 4.

Los promedios mostrados en la tabla 4 están basados sobre una estimación de lo que se ha publicado previamente, dada la considerable complejidad que refleja la heterogeneidad de la hGH en si misma, así como también de la formación de complejos con las distintas GHBP. Esta complejidad se refleja en una discrepancia de valores de hGH en suero obtenidos en distintos inmunoensayos.

Tabla 4.- Distribución media aproximada de isoformas de la hGH hipofisaria en la circulación sanguínea, entre 15–30 minutos después de un pulso secretorio.

hGH monomérica	
22 kDa	
Libre	22 %
Unida a GHBP de alta afinidad	21 %
Unida a GHBP de baja afinidad (α_2 -macroglobulina)	2 %
Total	45 %
20 kDa	
Libre	2 %
Unida a la GHBP de alta afinidad	0.5 %
Unida a GHBP de baja afinidad (α_2 -macroglobulina)	2 %
Total	5 %
hGH acídica (hGH desamido, acilada y glicosilada)	
Formas acídicas totales (unión fracciones desconocidas)	5 %
hGH dimérica	
dímeros de 22 kDa	
dímeros no-covalentes	14 %
dímeros disulfuro	6 %
dímeros de 22 kDa totales (unión fracciones desconocidas)	20 %
dímeros de 20 kDa	
dímeros no-covalentes	3 %
dímeros disulfuro	2 %
dímeros de 20 kDa totales (unión fracciones desconocidas)	5 %
dímeros hGH acídicos (hGH desamido, acilada y glicosilada)	
dímeros no-covalentes	1.5 %
dímeros disulfuro	0.5 %
dímeros hGH acídica totales (unidos a fracciones desconocidas)	2 %
hGH oligomérica (trímeros-pentámeros)	
oligómeros de 22 kDa	
oligómeros no-covalentes	7 %
oligómeros disulfuros	3 %
oligómeros de 22 kDa totales (unión fracciones desconocidas)	10 %
oligómeros de 20 kDa	
oligómeros no-covalentes	1 %
oligómeros disulfuros	0.5 %
oligómeros de 20 kDa totales (unión fracciones desconocidas)	2 %
Oligómeros acídicos de hGH (hGH desamido, acilada y glicosilada)	
oligómeros no-covalentes	1 %
oligómeros disulfuros	0.5 %
Oligómeros de hGH acídica (unidos a fracciones desconocidas)	2 %
Fragmentos (12, 16 y 30 kDa especies inmunoreactivas)	variable

Los resultados dispares obtenidos entre distintos inmunoensayos y laboratorios son en parte debidos a la falta de armonización o estandarización de estos inmunoensayos. Los inmunoensayos con anticuerpos (Abs) policlonales utilizados en el pasado minimizaban estas diferencias, mientras que en la época actual, inmunoensayos con anticuerpos monoclonales (mAbs) las magnifican. Esta problemática está continuamente siendo revisada (30;126).

La mezcla de isoformas de hGH en circulación sanguínea ha sido investigada utilizando métodos de separación físico-química seguido por inmunoensayos (61;110;127-131) y más recientemente al disponer de mAbs por inmunoensayos más específicos para seleccionar las isoformas (ensayos de 22 kDa hGH, 20 kDa hGH, hGH-V entre otros) (124;132;133). A pesar de los últimos inmunoensayos más específicos, la identificación y cuantificación de isoformas de hGH en suero todavía es un reto pendiente.

La gama de isoformas de hGH en la circulación sanguínea periférica generalmente debería reflejar su abundancia relativa en la hipófisis tal como son co-secretadas, sin embargo hay tres nuevos factores que se añaden cuando los productos secretados se encuentran en circulación sanguínea:

- la presencia en circulación periférica de proteína de transporte de la GH (GHBP).
- La relación entre la velocidad de aclaramiento o “clearance” y la respectiva vida media de cada isoforma
- la presencia de fragmentos circulantes derivados del metabolismo periférico de la hGH que son inmunoreactivos.

La velocidad de desaparición de las isoformas afecta a sus proporciones relativas en función del intervalo de tiempo transcurrido desde su secreción. Por ello, las proporciones de 20 kDa hGH y especialmente las formas oligoméricas tienden a incrementarse según transcurre el tiempo (29).

De la naturaleza exacta de fragmentos generados durante el catabolismo de la hGH en tejidos periféricos se conoce muy poco y aunque su exacta naturaleza ha sido caracterizada en algunos casos mediante espectrometría de masas (MS), su concentración no es bien conocida. Solo en algunos casos contados se ha detallado acerca de algún inmunoensayo específico reconociendo fragmentos concretos, como sería el caso del fragmento de hGH₁₋₄₃(49). También para el caso del fragmento hGH₄₄₋₁₉₁ se informó acerca de un inmunoensayo específico para su medición, aunque en este caso se dieron concentraciones en sangre superiores a la propia hGH total, dato que era opuesto claramente al de que este fragmento era < a 1 % en la glándula hipofisaria)(54). Con ello se acrecentaba la cuestión de que solamente se trataba de un posible componente inmunoreactivo no-específico presente en suero.

No se conoce el grado en el cual estos inmunoensayos específicos diferencian entre formas monoméricas y oligoméricas; juzgando a partir de los valores y porcentajes informados, probablemente reconocen ambos. También se conoce poco acerca del reconocimiento de formas de hGH deamidadas o aciladas por los inmunoensayos de 22 kDa hGH disponibles. Utilizando un ensayo específico para la isoforma de 20 kDa hGH, el porcentaje de esta como parte de la hGH total en sangre ha sido investigado

ampliamente y los valores encontrados se encuentran en un rango que va del 3 % al 15 % (81;84;116;118;119;134-136), sin diferencias sistemáticas o consistentes entre adultos, niños, generos, edad, estado fisiológico, salud y enfermedad, aunque en algunas situaciones patológicas las diferencias son contradictorias como ya se ha comentado (84;118). Cuando se han utilizado inmunoensayos específicos para 22 kDa hGH, se han informado porcentajes de esta isoforma en el rango de 58 % a 82 %, con un promedio aproximado de 72 % (83;119). A modo de resumen se exponen en la tabla 5 los inmunoensayos más destacados de estos últimos años y su especificidad.

Tabla 5.- Resumen de inmunoensayos desarrollados en estos últimos años. Los mAb de captura figuran con los acrónimos utilizados por los autores del método.

Especificidad	Autores	Método	Ab. Captura
22 kDa hGH	Mellado M.(137)	ELISA	mAb hGH26
22 kDa hGH ¹	Boguszewski C.L.(138)	IRMA ²	Ab. Policlonal ²
22 kDa hGH ³	Tsushima T.(118)	ELISA	mAb A36 (A36020047P)
22 kDa hGH ³	Irie M.(132)	FCMIA ³	mAb A36 (A36020047P)
22 kDa hGH (rec assays)	Bidlingmaier M.(98)	LIA ⁴	mAb AK566 (kit 1) mAb AK568 (kit 2)
22 kDa hGH (pit assays)	Bidlingmaier M.(98)	LIA ⁴	mAb AK565 (kit 1) mAb AK567 (kit 2)
22 kDa hGH	Wu Z.(133)	LIA ⁴	mAb 5E1
20 kDa hGH	Mellado M.(137)	ELISA	mAb hGH33
20 kDa hGH ⁵	Hashimoto Y.(134)	ELISA	mAb D05
20 kDa hGH ⁵	Irie M.(132)	FCMIA ⁵	mAb D05
20 kDa hGH	Wu Z.(133)	LIA ⁴	mAb 1G12
17 kDa ⁶	Sinha Y.N.(54)	RIA	Ab policlonal ⁷
5 kDa ⁸	Lopez-Guajardo C.C.(49)	ELISA	mAb CCL-3
hGH-V ⁹	Wu Z.(124)	IFMA ¹⁰	mAb 3F12

1: exclusión previa de 22 kDa hGH por separación magnética 2: IRMA de Pharmacia & Upjohn.. 3: método de Tsushima T. (22 kDa ELISA) con el método añadido de inmunoensayo con microesferas de fluorescencia covalente (FCMIA). 4: inmunoensayo de luminiscencia. 5: método de Hashimoto Y. (20 kDa ELISA) con el método añadido de inmunoensayo con microesferas de fluorescencia covalente (FCMIA). 6: segmento de hGH (secuencia de AA 44-191). 7: Ab policlonal 20-11/25/92. 8: segmento de hGH (secuencia de AA 1-43). 9: hGH placentaria. 10: Ensayo Inmuno-Fluorimétrico (fluorinmunoensayo con tiempo de resolución FIA-TR).

En el ensayo parcialmente específico en que primero se excluye por inmuno separación magnética la isoforma de 22 kDa para posteriormente aplicar el ensayo con Ab policlonal que reconoce otras isoformas de hGH, conocido como “ensayo de exclusión de 22 kDa hGH” (138) se daban resultados relativamente consistentes en comparación con los que procedían de inmunoensayos más específicos (83;119;139;140).

Las mediciones de hGH-V placentaria solamente se aplican durante el embarazo ya que los niveles séricos son indetectables en cualquier otro momento. La distribución entre la hGH-V no-glicosilada y la glicosilada se desconoce.

1.3.10 Metabolismo y aclaramiento de hGH.

La mayor parte del aclaramiento metabólico de la hGH tiene lugar en los riñones por medio de una extensa filtración glomerular seguida de una amplia degradación en el túbulo proximal(141;142). Aproximadamente el 0.01 % de la cantidad inicialmente filtrada se excreta en la orina final de forma inalterada (143;144). La hGH también se metaboliza en el hígado (donde hay mayor cantidad de GHR) y también en otros tejidos mediado por la vía de GHR-captación intracelular y posterior degradación. En el hombre la vida media en sangre de la hGH en forma libre y la unida a GHBP se ha estimado en aproximadamente 11 minutos para la forma libre y 27 minutos para la unida (99). No obstante también hay datos publicados acerca de vida-media para la isoforma de 20 kDa hGH endógena unos minutos más larga (18.7 ± 0.8 minutos) que la de 22 kDa hGH (14.7 ± 0.8 minutos)(84). Se desconoce si ello es debido a

la tendencia de la isoforma de 20 kDa a formar dímeros y con ello el ralentizar su filtración glomerular o a su baja afinidad por el GHR o a ambas causas. De forma similar el aclaramiento de los oligómeros de hGH es algo más lento que el de los monómeros de hGH. Se han informado acerca de vidas-medias en sangre de 19 minutos (monómeros), 27 minutos (dímeros) y 45 minutos (oligómeros) (145).

Según resultados publicados en estudios farmacocinéticos tras la administración de rhGH (equivalente a 22 kDa hGH) en sujetos sanos, los picos máximos en sangre se alcanzaban entre las 4 y 6 horas post-administración subcutánea y los niveles de hGH (rhGH) se encontraban elevados hasta al menos las 12 horas post-administración(84;85;146). La farmacocinética estudiada tras la administración exógena de 20 kDa hGH en sujetos sanos ha sido evaluada con la administración subcutánea alcanzando picos máximos en sangre de 3.7 horas (81). En ambos casos la administración de una o de otra suprimen la forma contraria hasta al menos las 12 horas de ser administradas en un caso o en el otro(81;84). No obstante en el caso de administración de rhGH, también se han informado resultados de que la isoforma de 20 kDa hGH es suprimida o frenada solo en mujeres, permaneciendo así entre 14-18 horas (si es con dosis de 0.033 mg/kg/día) y de 30 horas (si es con dosis de 0.083 mg/kg/día). En cambio, en hombres la isoforma de 20 kDa hGH era indetectable tanto en los valores basales previos a la administración como durante el estudio de administración exógena con rhGH (85).

El aclaramiento metabólico de la hGH-V endógena, estimado después de la expulsión de la placenta parece ser un tanto más rápida que la de 22 kDa GH (122;147-149).

1.3.11 Isoformas de hGH en orina.

La hGH debido a su baja excreción en orina (< 0.01 % de la hGH filtrada en los glomérulos) está presente en muy pequeñas cantidades en la orina final excretada. Su concentración pues solamente se podría medir si se utilizaran métodos con la debida sensibilidad (cosa que hasta la fecha no se da) o bien que se puedan dar tratamientos previos a la orina en forma de purificación por nano-partículas de la hGH. El resultado final seria una concentración de la muestra, para posteriormente realizar el análisis (150;151). Este hecho de la baja concentración y baja sensibilidad de los métodos utilizados ha sido determinante para que en el manejo de pruebas diagnósticas en hospitales los análisis de hGH en orina se hayan ido abandonando para pasar a utilizar actualmente análisis en sangre para el diagnostico de patologías relacionadas con la hGH. Además se debe añadir que la variabilidad observada, tanto inter-individual como intra-individual, de la excreción de hGH en orina hace totalmente inadecuada la determinación de hGH urinaria como una herramienta fiable para cuantificar la producción de hGH (152;153).

Existe información escasa y limitada acerca de isoformas de hGH en orina. La composición de hGH en orina humana podría ser similar a la monomérica hGH en sangre, con predominio de 22 kDa hGH y componentes minoritarios de 20 kDa hGH y también con

formas presentes de hGH acídica (144). Los oligómeros de hGH no fueron detectados en orina en su momento como hubiera sido de esperar (143;144) basándose en los límites del tamaño molecular para la filtración glomerular.

1.3.12 Resumen.

La hGH humana existe como tal en una compleja variedad de formas o variantes moleculares todas ellas relacionadas y también derivadas de distintos mecanismos tanto genéticos como post-traduccionales o de otra índole biológica o química. El significado biológico de la heterogeneidad de la hGH permanece aun hoy desconocido en gran parte. Las isoformas de hGH presentan un reto tanto para su precisa medición en sangre, como también para presentar la oportunidad de distinguir analíticamente entre hGH endógena y la forma exógena recombinante rhGH.

1.4 Marcadores biológicos de la acción de la GH.

1.4.1 IGF-I y proteínas de transporte de IGFs.

La IGF-I es uno de los miembros de la familia de factores de crecimiento y proteínas relacionadas denominada como familia IGF(154). Esta está compuesta por:

- grupo de ligandos IGF-I, factor de crecimiento similar a la insulina II (IGF-II) y la insulina.
- seis proteínas de transporte de IGFs (IGF BPs) bien caracterizadas, desde la IGF BP-1 a la IGF BP-6.
- receptores celulares mediadores de las acciones de los ligandos, el receptor de IGF-I, el receptor de insulina y el receptor de IGF-II manosa-6-fosfato o M-6-P.

La IGF-I es un péptido formado por 70 aminoácidos con un PM aproximado de 7.6 kDa y cuya secuencia de AA es similar a la de la de IGF-II y la proinsulina. Se sintetiza principalmente en el hígado y también en otros tejidos como por ejemplo el muscular, óseo(155) y el tejido adiposo(156) entre otros, ejerciendo acciones autocrinas y paracrinas. La síntesis de IGF-I es activada principalmente por la hGH y la insulina, aunque también intervienen la tirotrópina (TSH) y las gonadotropinas(157). La activación en relación a la hGH se produce por medio de la unión de esta con su receptor GHR, unión en la que se produce la dimerización del GHR y estos cambios conformacionales tal como ya se ha explicado inician que el GHR transmita señales intracelulares por medio de distintas cascadas de fosforilación. Una

vez sintetizada la IGF-I es secretada a circulación sanguínea para ejercer sus acciones ya descritas anteriormente en este trabajo en relación a la hGH (158).

El gen que codifica la IGF-I está ubicado en el cromosoma 12 (12q22-q24.1) y al igual que otros genes, presenta además de “splicing” también “splicing alternativo”, por lo que da lugar a distintos pro-péptidos, uno de los cuales se expresa en respuesta a señales mecánicas, es decir relacionadas con el movimiento(159;160). En el músculo esquelético humano se ha hallado la expresión de al menos 3 isoformas distintas (161), la isoforma IGF-IEa equivalente al tipo hepático o bien forma sistémica, la IGF-IEb de la cual se desconoce su función y por último la IGF-IEc. Esta última isoforma equivale al tipo muscular y es conocida como Mechano Growth Factor” (MGF) y se expresa en respuesta a estímulos mecánicos y daño celular. Se ha demostrado en animales el potencial de este factor sobre el aumento de la fuerza muscular (162;163). Actualmente tanto la IGF-I como el MGF están incluidos en la lista de sustancias prohibidas por la WADA (9).

El transporte de la IGF-I en sangre se lleva a cabo mediante el grupo de proteínas de transporte de la familia de las IGF BPs(164;165). Pertenecientes a esta familia mencionada, existen 6 tipos de IGF BP, de ellas la IGF BP-3 es la más abundante, y junto a la subunidad ácido-lábil (ALS) forman con la IGF-I el denominado complejo ternario (IGF-I – IGF BP-3 - ALS) de aproximadamente 150 kDa de PM (166;167). La IGF-I circula en sangre periférica de forma libre solo en un pequeño porcentaje (< 1 %), pero la parte más relevante, cerca del 80 %, circula unida a este

complejo ternario (168;169). Aunque en este complejo ternario la IGF-I circule unida a la IGF BP-3, también en su defecto puede formar parte de este complejo la IGF BP-5 en lugar de la IGF BP-3 (170;171). También otros complejos pero solo binarios (IGF-I – IGF BPs) se pueden formar con otras proteínas de unión de la IGF-I. Estos complejos prolongan la vida media de la IGF-I y cuando se administra junto a la IGF BP-3 se consigue también una mayor vida-media farmacológica (172).

La IGF-I también interviene en la acción anabólica de la hGH incluyendo entre otras la estimulación y el recambio del tejido óseo y tejido conectivo (173). En los tejidos diana actúa produciendo un incremento de la síntesis de proteínas(174;175), y también juega un papel crítico tanto en el control del ciclo celular como en la apoptosis, dos funciones implicadas en la regulación de la tumorogénesis(154). En general la IGF-I actúa como reguladora negativa de la secreción de hGH y de la de gonadotrofinas, por el contrario intervienen en su regulación el estado nutricional. Las concentraciones de IGF-I en sangre descienden de forma clara cuando existe una restricción fuerte en la dieta. Distintos mecanismos parecen estar implicados. El número de los receptores hepáticos depende del grado de restricción nutricional, lo que refuerza la influencia que tiene en la IGF-I circulante. También la privación nutricional hace disminuir la producción hepática de IGF-I por el descenso de la expresión génica de IGF-I. La restricción en la dieta también incrementa el aclaramiento y la degradación de IGF-I en sangre por medio de cambios en los niveles de IGF BPs circulante en sangre (176;177). La disponibilidad de aminoácidos

esenciales en la dieta es básica para el mantenimiento de la concentración de IGF-I(176;178).

La actividad física incrementa los niveles de IGF-I total y libre en sangre (179). No obstante la hGH también juega un papel importante en este aumento ya que el ejercicio físico aumenta la liberación de hGH(180) e induce la producción de IGF-I, aunque este efecto hGH-dependiente se ha observado con un retraso de 12 horas desde el estímulo(181). En otros trabajos se han observado solamente incrementos transitorios durante el ejercicio de hasta 3 horas de duración o de hasta 24 horas tras finalizar el ejercicio (169;182-187). Aunque en algún caso después de solo 10 minutos de ejercicio moderado ya se han encontrado elevaciones moderadas de la concentración de IGF-I en sangre (188-190), también se han descrito elevaciones superiores después de ejercicio físico más intenso. La concentración pues de IGF-I está influenciada por el tipo, intensidad y duración del ejercicio físico (191). No obstante parece que estos hechos pueden ser independientes del mecanismo de producción hepática inducido por la hGH (188;189), con lo cual podría darse la intervención de otros tejidos con un origen distinto al hepático, como sería el caso de la IGF-I del tejido muscular. El grado de influencia del ejercicio físico es difícil de establecer, ya que se observa un efecto estimulador tanto si se trata de un ejercicio físico en un solo periodo o como efecto de un periodo más largo de entrenamiento, pero en ambos casos se puede dar la posibilidad de que la expresión de IGF-I sea solo local en el tejido muscular como respuesta (192).

Se han comparado valores de IGF-I en deportistas de élite con los de una población sedentaria y deportistas recreacionales. Mientras que en algún caso no se han observado diferencias entre deportistas de élite y población sedentaria sana (193), en otros casos sí se han observado diferencias, con concentraciones significativamente superiores en atletas de élite comparadas con población sedentaria(194;195).

La IGF-I comparte muchas acciones de la insulina y puede afectar a la captación de glucosa y la síntesis de glucógeno (157;196). El estado físico inicial, la intensidad, la duración y la frecuencia del ejercicio de entrenamiento son determinantes en las respuestas del eje GH/IGF-I dependiente o independientemente.

El catabolismo de IGF-I se atribuye principalmente a su eliminación mediada por el receptor IGF-I ubicado en distintos tejidos como el muscular, adiposo o hepático entre otros (164). Su proporción eliminada por la vía de excreción urinaria es muy baja con concentraciones hasta 1.000 veces inferiores a las concentraciones séricas (197).

A diferencia de la secreción pulsátil de la hGH, las variaciones en la concentración en sangre de IGF-I a lo largo del día son más estables(198). En este caso el principal factor de dependencia es la edad, siendo la concentración más baja en la infancia y sin apenas diferencias entre sexos (199-201). En la pubertad es cuando la concentración de IGF-I aumenta por efecto de las hormonas sexuales y se observa el máximo pico de concentración antes en el sexo femenino que en el masculino (200;201). A partir de la pubertad la concentración disminuye de forma lenta y sin

diferencias de género (200;202-204). La concentración de IGF-I medida depende del tipo de inmunoensayo que se use. Estos inmunoensayos difieren ya que presentan distintos tipos de pre-tratamiento de la muestra, con diferentes Abs y también diferentes materiales de calibración. Todo ello complica una estimación adecuada de la concentración real y también la posible comparación de la concentración poblacional de IGF-I(205;206).

Se han detectado concentraciones muy bajas de IGF-I en patologías de resistencia a la hGH, patología conocida como síndrome de Laron y en otras situaciones de déficit de hGH, en pacientes diabéticos tipo I con insuficiencia hepática y con enfermedades sistémicas en estado crítico(155;207;208). En cambio, lógicamente se detectan concentraciones elevadas en pacientes con acromegalia (203;209;210), así como en estados muy iniciales de infarto de miocardio, en los que si se dan estos incrementos pueden estar asociados a una mejor restauración tanto miocárdica como de la función ventricular(211;212). El papel como moduladores de la estructura miocárdica tanto de la hGH como de la IGF-1 es conocido y los receptores de ambos también pueden expresarse en células miocíticas cardiacas. Es por este motivo que la hGH podría actuar directamente sobre el músculo cardiaco por inducción local o sistémica de la IGF-1, mientras que la propia IGF-1 podría actuar mediante distintos mecanismos, endocrinos, paracrinos o autocrinos (213).

Los aumentos de IGF-I dependientes de la administración de rhGH se han empezado a observar en algunos casos a partir de las 6 horas posteriores a la administración (214) dependiendo de la dosis de

rhGH utilizada. No obstante se ha observado que la IGF-I es sin duda el marcador más sensible y que se encuentra incrementado antes que otros marcadores como el propéptido N-terminal del procolágeno tipo III (P-III-NP) o la propia IGF BP-3(215).

Las IGF BPs tienen como función prolongar la vida-media de las IGF's, actuar como reservorio intra-vascular, actuar como transportadores de IGF's en la circulación sanguínea y también como reguladores autocrinos y/o paracrinos de sus acciones biológicas (216). En este grupo constan 6 tipos de IGF BPs numeradas de 1 a 6, siendo IGF BP-3 la proteína de unión más abundante cuantitativamente en la circulación periférica y que junto a la otra IGF BP-5 presenta la afinidad más alta para IGF-I. Las propiedades de las distintas IGF BPs se exponen en la tabla 6. Dadas las características de afinidad no es extraño que en la formación del complejo ternario (con IGF-I y ALS) mayoritariamente intervenga la IGF BP-3 y en su defecto la IGF BP-5 tal como ya se ha comentado.

La IGF BP-3 se puede sintetizar en muchos tejidos, aunque la mayor fuente tal vez sea el hígado y se la considera el mayor medio de transporte y el mayor reservorio de IGF-I, con una vida-media aproximada de ~ 30 minutos (205). Se conoce que los niveles circulantes de IGF-I e IGF BP-3 son regulados por la nutrición, edad, embarazo, enfermedades crónicas, insulina y hGH (176;217). Los niveles de concentración tienden a decrecer con la edad (218) y cuando la función hepática se encuentra dañada (219;220).

Distintos estudios han mostrado que el entrenamiento intensivo estimula los niveles circulantes tanto de IGF-I como IGF BP-3 (221-223).

Sin embargo acerca de la variación de la IGF-I e IGF BP-3 después del ejercicio, existen puntos conflictivos dependiendo del tipo de ejercicio y del grado de entrenamiento (169;186;190;191;224;225).

Las concentraciones séricas de IGF BP-3 también aumentan en el transcurso de la administración de rhGH (226;227).

Tabla 6.- Algunas propiedades estructurales y funcionales de las proteínas de unión de las IGFs.

	IGF BP-1	IGF BP-2	IGF BP-3	IGF BP-4	IGF BP-5	IGF BP-6
Gen	7p14-p12	2q33-q34	7p14-p12	17q12-q21	2q33-q36	12b
PM (kDa)	25	31	29	24	29	34
Secuencia	234	289	264	237	252	216
AA						
Glicosilación	---	---	N-linked	N-linked	O-linked	O-linked
			No glicosilada			
Síntesis	Hígado Placenta	Hepatocitos Epitelio	Hígado Mesenquima	Mesenquima Epitelio	Mesenquima T. Conectivo	Según el desarrollo
Expresión	Líquido Amniótico	Suero	Suero	Todos los fluidos biológicos	Suero	Fluidos biológicos
Afinidad	IGF-I fosforilada	IGF-I baja IGF-II alta	IGF-I muy alta	IGF-I IGF-II	IGF-I muy alta	IGF-II muy alta

Además de la IGF-I e IGF BP-3 otros péptidos-marcadores han sido también relacionados en estos últimos años con la secreción y actividad de la hGH, péptidos como ghrelina, adiponectina y leptina.

Hasta la fecha han sido estudiados en tratamientos con rhGH en pacientes a largo plazo (ejemplo 1 año). En cambio su respuesta a corto plazo no es tan bien conocida.

Los secretagogos de hGH representan una nueva vía en la regulación de la hGH actuando a través de receptores acoplados a proteína G (GPC-R) (228;229). Previamente a ser descubierto su ligando natural, el receptor se clonó cuando solamente se conocían sus ligandos sintéticos (230). Este hecho condujo posteriormente a descubrir el ligando fisiológico natural de estos receptores, la ghrelina, sintetizada en diversos tejidos, principalmente en la zona fúndica del estómago (231). Los niveles de ghrelina en pacientes con déficit de hGH pueden estar afectados por la administración de rhGH descendiendo significativamente sus niveles durante el tratamiento con rhGH a largo plazo (232). La adiponectina (ApN) es una proteína específica del tejido adiposo. Los niveles de ApN en pacientes con déficit de hGH se hallan incrementados después de tratamiento con rhGH (233). Por último la leptina, secretada predominantemente en el tejido adiposo, actúa sobre el hipotálamo incrementando la secreción de hGH. La secreción de leptina podría también estar bajo control de la hGH por medio de un mecanismo de retroalimentación (feedback).

Los péptidos ghrelina, adiponectina y leptina, debido a su interrelación con la secreción de hGH, podrían ser relevantes como posibles marcadores indirectos de la administración con rhGH.

1.4.2 P-III-NP.

El colágeno no es una única proteína sino que forma una familia de moléculas estrechamente relacionadas pero genéticamente distintas. Se han descrito diferentes elementos pertenecientes a esta familia, descritos como tipo I, II, III, IV, V etc., así sucesivamente hasta el tipo XIII. Las fibras de colágeno de tipo III, junto con las de tipo I, son uno de los principales constituyentes de la matriz extracelular y también responsables de la integridad de la estructura de los tejidos. El colágeno tipo I es el más abundante en el cuerpo humano, comprendiendo alrededor del 70 % del colágeno total. Está ampliamente distribuido en hueso, tendones, piel y órganos internos. Cerca del 90 % de la matriz orgánica de los huesos consiste en colágeno tipo I. El colágeno tipo III es el segundo más abundante en el organismo y se presenta particularmente en tejidos mostrando propiedades elásticas como puede ser en la piel, vasos sanguíneos, órganos internos y placenta, a menudo en asociación con el colágeno tipo I (234-237). Los colágenos tipo I y III se sintetizan en el retículo endoplasmático de los fibroblastos como grandes moléculas precursoras denominadas procolágenos (ver figura 5). Su estructura es en forma de triple hélice y consiste en tres cadenas polipeptídicas (cadenas α) cada una de las cuales está enrollada en espiral sobre las otras dos formando una molécula similar en forma a una red entrecruzada. Cada cadena polipeptídica tiene secuencias repetitivas de Gly-X-Y-, con residuos de prolina e hidroxiprolina en las posiciones X e Y, respectivamente. Después de su secreción al espacio extracelular, los propéptidos son fraccionados y separados del procolágeno en bloque mediante

proteasas específicas, en concreto el P-III-NP por una N-proteinasa específica (238), iniciando con este fraccionamiento la formación del colágeno maduro con regiones de telopéptido cortas no helicoidales a ambos extremos de la molécula (ver figura 5). Los aldehídos lisil e hidroxilisil del telopéptido son capaces de reaccionar con los residuos de otras moléculas de colágeno hacia formas inmaduras de entrecruzado divalente. Este entrecruzado madura espontáneamente para convertirse posteriormente en entrecruzado de deoxipiridinolina (lisil piridinolina) formada por la reacción de dos hidroxilisinas y una lisina y piridinolina (hidroxilisilpiridinolina) formada por la reacción de tres hidroxilisinas (239;240).

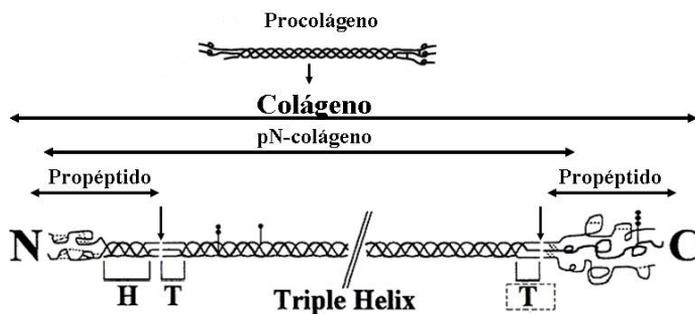


Figura 5.- Estructura molecular de colágeno tipo I y tipo III. Las flechas indican los lugares de rotura en la cadena de AA para formar en la zona NH₂-terminal (N en la figura) los propéptidos (PINP, PIIINP) y en la COOH-terminal (C en la figura) los telopéptidos. La letra H indica el dominio helicoidal en el telopéptido NH₂-terminal, la letra T indica el dominio telopéptido en cada final de la molécula de colágeno..

La degradación del colágeno se da tanto a nivel intracelular como extracelular. En la vía intracelular se incluye la fagocitosis y la degradación lisosomal de los colágenos, mientras que la vía

extracelular es activa durante el recambio o “turnover” óseo rápido del colágeno en el tejido óseo (241).

El P-III-NP es una extensión del fragmento de procolágeno III, precursor de síntesis del colágeno III. Tiene un PM aproximado de 42 kDa y contiene tres dominios distintos: un triple-dominio helicoidal (dominio-Col 3) en la mitad de la molécula, el dominio-Col 1 (no helicoidal) en la zona amino-terminal y el dominio-Col 2 en la zona carboxi-terminal (no helicoidal) (242). El P-III-NP es el marcador de tejidos conectivos que más predomina en el colágeno tipo III y es de los marcadores biológicos más utilizados tanto como indicador de la síntesis como de la degradación del colágeno tipo III. La concentración sérica de P-III-NP da información sobre la actividad del tejido conectivo durante el crecimiento. Por otra parte la hGH en el tejido óseo es capaz de estimular el recambio óseo e incrementar la masa ósea así como también en tejidos conectivos estimular el metabolismo de los colágenos tipo I y tipo III(243). La tasa de biosíntesis de colágeno III aumenta y como consecuencia de ello se incrementan en la circulación sanguínea fragmentos proteolíticos de procolágeno (244). El P-III-NP y sus productos de su degradación (fragmentos con los distintos dominios) se encuentran en circulación periférica hasta que son eliminados por los receptores “scavenger”de las células endoteliales hepáticas (receptores de basura o limpiadores, que remueven materiales inservibles y sustancias extrañas gracias a su extensa especificidad). Las concentraciones séricas de P-III-NP son estables a lo largo del día (245;246) y el principal factor que tiene influencia sobre dichas concentraciones a largo plazo es la edad. En la pubertad las

concentraciones de P-III-NP se incrementan entre un 50 y un 100 %, siendo estas subidas algo más tardías en varones. Después de la pubertad, las concentraciones disminuyen hasta los valores que ya se observan en adultos, en los cuales ya no se dan diferencias relacionadas con el sexo (247;248).

Cambios en la concentración sérica de P-III-NP reflejan más bien cambios relacionados con la implicación y el metabolismo alterado del colágeno de tipo III (244;249;250). Se han descrito concentraciones elevadas tanto en niños como en adultos con déficit de hGH endógena y en tratamiento con rhGH (248;251;252). También se han descrito concentraciones elevadas en adultos con acromegalia, es decir una secreción de hGH muy aumentada debido a la existencia de un adenoma hipofisario (253). Se han descrito también procesos de reparación y cicatrización con implicación de concentraciones séricas aumentadas de P-III-NP, como es el caso de infarto de miocardio (254;255), cicatrización de heridas(256) y reparaciones óseas(257;258). No obstante también está elevada después de distintas lesiones y en distintas condiciones patológicas (259;260).

Mientras que las concentraciones en sangre de IGF-I se incrementan rápidamente después de la administración de rhGH, los niveles sanguíneos de P-III-NP se incrementan más tardíamente pero son más estables y permanecen incrementados durante un periodo más largo de tiempo una vez se ha finalizado la administración exógena. Tanto en deportistas de élite como en población sedentaria el factor que más influencia tiene sobre la concentración de P-III-NP es la edad, tanto en condiciones basales (187;193) como en condiciones

de post-ejercicio (195). Según el tipo y grado de ejercicio físico o bien el tipo ya más ampliamente el tipo de deporte practicado, el comportamiento de este marcador respecto a sus concentraciones en sangre presenta algunas diferencias, pero no obstante la tendencia ante el ejercicio es incrementarse.

1.5 Desarrollo de métodos de detección de abuso en el deporte con hGH.

A pesar de disponerse en la actualidad de numerosos ensayos para la medición de la concentración de hGH para la práctica clínica y la investigación, todas ellas se han demostrado insuficientes para evaluar el abuso de hGH en el deporte. En el transcurso de estos últimos años se han desarrollado dos vías o estrategias distintas para detectar el abuso de hGH en el deporte. En los 2 casos los equipos de investigación se han nutrido de médicos y endocrinólogos con experiencia previa a nivel clínico en este campo. A continuación se detallan estas dos estrategias por orden cronológico desde el inicio de la investigación y apoyo de organismos como el IOC entre otros. Antes de iniciarse estos estudios, otros bio-marcadores distintos a los finalmente propuestos como más efectivos, fueron postulados en otros trabajos previos(261) aunque estos datos no fueron refrendados posteriormente por los estudios del grupo GH-2000 (262) ni por otros grupos (263).

1.5.1 Estrategia indirecta: Método con marcadores biológicos.

Esta estrategia, denominada como “método indirecto o método de marcadores biológicos”, se inicio como un primer intento por parte del IOC para desarrollar un test de detección del dopaje con rhGH. Este proyecto se inicio en 1996 con el objetivo de poder disponer de un test adecuado para poderlo utilizar en los Juegos Olímpicos de Sidney del año 2000. El proyecto estaba coordinado por el profesor Peter Sönksen del centro United Medical and Dental School at Guy’s and St Thomas Hospital, en Londres, y se denomino proyecto GH-2000. Esta estrategia se basó en la elección de las proteínas específicas más óptimas que se expresarían en tejidos corporales como el tejido muscular y/o tejido conectivo entre otros, y que responderían a la respuesta de estimulación ejercida por la presencia masiva de rhGH circulante. En esta estrategia se perseguía además del objetivo de la detección de hGH en si misma, el de obtener una amplia ventana de tiempo para detectar el abuso(264), ya que al no ser una detección directa, las proteínas especificas resultado de la estimulación de la rhGH permanecían más tiempo elevadas en su concentración sanguínea. Los estudios acerca de este método indirecto se han visto reflejados en un amplio grupo de trabajos publicados (3;83;119;169;187;195;262;265-275). El proyecto se inicio en el año 1996 bajo la financiación conjunta de la UE y del IOC. Estas investigaciones se plasmaron a inicios del año 1999, con la entrega del informe final (262) al IOC y al UE en el que se proponía esta metodología para la detección del abuso de hGH. Este informe, que fue revisado por la Comisión Médica del IOC,

mostraba que la administración de rhGH causaba un aumento significativo de marcadores biológicos, dependiendo la magnitud del aumento, del marcador estudiado, del sexo del receptor de rhGH y también de la dosis de rhGH administrada (265;267;276). El proyecto GH-2000 concluía en centrarse solamente en 2 marcadores específicos (IGF-I y P-III-NP), de entre los 8 mejores marcadores biológicos que reflejan la actividad de la hGH. Basándose en estos 2 marcadores se desarrollo una formula genero-específica con la cual se conseguía una discriminación entre individuos a los que se les había administrado rhGH o placebo. Se realizaron ajustes adicionales como tener en cuenta además el sexo y la edad, los dos mayores determinantes de la variabilidad(195) además también de tener en cuenta la distribución alterada de estos marcadores observada en atletas de élite(262) dando como resultado final para cada atleta el denominado “D-score”. Pese a considerar los resultados como positivos, se necesitaba un considerable trabajo adicional para obtener información complementaria para poder considerar la prueba legal y científicamente aceptable. En concreto que influencia podrían tener tanto el origen étnico del atleta y/o la como lesiones deportivas sobre los niveles sanguíneos de la IGF-I y P-III-NP eran aspectos que preocupaban. No obstante ya en 1999 tanto el IOC como la recién creada WADA reconocían la necesidad de desarrollar kits propios para el análisis de estos marcadores(6). Con el soporte de la United States Anti-Doping Agency (USADA) en primer lugar y posteriormente también con la implicación de la recién creada WADA, se inicio el proyecto en fase 2 del proyecto GH-2000, denominado como GH-2004 centrado en investigar los

posibles efectos étnicos, variabilidad, sensibilidad y por último investigar los efectos de lesiones ósea, musculares y tendinosas sobre la sensibilidad de los marcadores seleccionados en relación a la administración de rhGH (<http://www.gh2004.soton.ac.uk>). Otro de los objetivos importantes era realizar la validación del test basado en estos marcadores (IGF-I y P-III-NP) a tiempo para los Juegos Olímpicos de Atenas 2004. Los resultados del proyecto GH-2004 han demostrado que aunque había escasas diferencias entre etnias y efectos de lesiones, estas no afectaban a la interpretación del test (275).

Al mismo tiempo que el estudio GH-2004 se ponía en marcha, el Dr. Ken Ho y un grupo de colaboradores establecieron el denominado grupo de trabajo “Consortio Australiano-Japones” para también intentar desarrollar un test para la detección de abuso de hGH en el deporte. Este grupo proporcionó más solidez a la estrategia de los bio-marcadores y además demostró que la administración concomitante de esteroides anabolizantes no reducía la sensibilidad de este test basado en bio-marcadores (277;278). En relación a los estudios del grupo GH-2004, este “Consortio Australiano-Japonés” evaluó también la posibilidad de establecer factores demográficos que podían influenciar la detección de hGH en el deporte (279).

Alternativamente se desarrolló en Alemania en el laboratorio antidopaje de Kreischa realizado en el “Institute für Dopinganalytik und Sportbiochemie” (Kreischa, Alemania), por estos mismos años aproximadamente, otro estudio con bio-marcadores en relación a esta estrategia para detectar el consumo de hGH por deportistas. En

este nuevo enfoque basado en los bio-marcadores IGF-I, P-III-NP e IGF BP-3 (263). Utilizando nuevas muestras y otras metodologías de inmunoensayo, se genero un nuevo análisis discriminante y con ello se propuso una nueva formula discriminante como alternativa y con ello por lo tanto un nuevo valor “D-score”. Estos datos años después fueron validados conjuntamente por el grupo GH-2004 y el laboratorio de Kreisha (273).

Tal como ya se ha comentado, tanto el IOC como la recién creada WADA en 1999 ya reconocían la necesidad de desarrollar kits propios para el análisis de IGF-I y P-III-NP, pero además un nuevo acontecimiento en años posteriores a este reconocimiento les iba a dar la razón ya que el inmunoensayo comercial utilizado para IGF-I fue retirado del mercado por el fabricante (Nichols Institute) dejando la metodología propuesta inicialmente con un problema muy serio, dado que parte de los resultados de la base de datos se habían realizado con este kit para la IGF-I. La empresa de Estados Unidos Institute for Bioanalytics (IBA) consiguió fondos de la USADA ya en el año 2000 para desarrollar dos inmunoensayos propios, tanto para la IGF-I como para P-III-NP, pero esta empresa subestimo la dificultad del proyecto encomendado y este no llego a completarse con éxito (6). Desde entonces se han ido utilizando otros kits comerciales y para poder aplicar la formula discriminante se han ido aplicando previamente distintas conversiones de datos mediante la aplicación de correlaciones. La implementación de este método con la utilización de nuevos kits (280) se ha puesto en escena por parte de la WADA, a modo de prueba, recientemente en los Juegos Olímpicos de Londres (comunicación personal del Dr.

David Cowan, director del laboratorio anti-dopaje de Londres). Ello puede ser el primer paso a su implementación oficial próximamente, aunque no queda del todo claro que papel desempeñara, si como método “screening”, método de confirmación o bien se combinará.

1.5.2 Estrategia Directa: Métodos basados en la relación entre variantes de hGH.

En el año 1999, después de que el informe final del grupo GH-2000 sobre marcadores biológicos fuera entregado al IOC, el Executive Board del IOC decidió apoyar económicamente otras líneas de investigación en la detección del abuso de hGH. Meses más tarde (septiembre) la Comisión Médica del IOC solicita propuestas sobre líneas de investigación distintas, y a consecuencia de ello, los esfuerzos de investigación para un nuevo método dan un giro importante hacia el desarrollo de un método directo propuesto por los Dr. C.J. Strasburger, Martin Bidlingmaier, y Zida Wu, el denominado “inmunoensayo diferencial de isoformas”.

Esta se convierte en una nueva estrategia denominada método directo, distinta a la explicada anteriormente del método indirecto, y explota la idea acerca de que las proporciones entre distintas isoformas o variantes de hGH que permanecen constantes bajo condiciones fisiológicas, se alteran en condiciones de administración exógena de hGH (98;281-283).

El método se basa en el principio esencial de que estas proporciones relativas entre isoformas de hGH en la sangre permanecen constantes en cada individuo. Una administración exógena de rhGH

(22 kDa) incrementa la concentración de esta isoforma y con ello se frena la secreción en la hipófisis de todas las variantes moleculares de hGH y con ello la concentración de isoformas “no-22 kDa” por el clásico mecanismo de feed-back. Esto altera considerablemente los ratios fisiológicos o naturales (83;119;281;282).

Para poder aplicar esta metodología en primer lugar se generaron más de 200 clones para posteriormente seleccionar los mAb deseados dependiendo del grado de reacción cruzada hacia las variantes deseadas (284). Los mAb elegidos se utilizan en 4 inmunoensayos distintos desarrollados con mAb específico diferente como mAb de captura (AK565, AK566, AK567, AK568), utilizándose un quinto mAb (AK569) en los cuatro casos mencionados como Ab secundario. De estos cuatro inmunoensayos, dos son denominados “diferencial rec” que en teoría reconocen preferencialmente la variante monomérica de 22 kDa, son los dos inmunoensayos denominados como “recombinant assay” (rec assay) en su nomenclatura original. Los otros dos inmunoensayos reconocen preferencialmente una combinación de variantes de hGH de origen hipofisario y denominados como “diferencial pit” también en su nomenclatura original. Los cuatro inmunoensayos están agrupados en parejas (rec y pit) formando el denominado kit 1 y el kit 2. En estos cuatro inmunoensayos, dos rec assay y dos pit assay, se miden las concentraciones y se establece un ratio denominado “rec/pit” para cada par de ensayos, o sea un ratio para el kit 1 y otro ratio para el kit2. .

Inicialmente se desarrollaron con la nomenclatura A (inmunoensayos rec y pit) y B (inmunoensayos rec y pit), pero

actualmente desde hace dos años aproximadamente han pasado a denominarse el kit A como kit 2 y el kit B como kit 1. Estos kits se desarrollaron siguiendo las normas establecidas por la guía de la WADA, “International Standard Laboratories” (285) en la cual se requiere la utilización de diferentes Abs para el test de cribaje o “screening” y para el test de confirmación del resultado y además se debe también destacar que estos kits se desarrollaron exclusivamente para su uso en laboratorios anti-dopaje acreditados por la WADA por medio de una empresa específica creada para este fin (CMZ) y así evitar que se repitiera el problema generado con la IGF.I y el Instituto Nichols (problema explicado ya anteriormente). Así de este modo los 2 ratios distintos obtenidos a partir de diferentes mAbs y diferentes kits pueden llegar a establecer un resultado final, en el caso de utilizar un solo ratio, indistintamente, nos da el resultado del cribaje y si este está aumentado y es positivo, se utilizan los dos kits al mismo tiempo para que así constituya el resultado final de confirmación del resultado.

El desarrollo de esta línea de investigación llevada a cabo por Strasburger, Bidlingmaier y Wu se inició con la construcción en primer lugar de un fluor-inmunoensayo con resolución de tiempo (FIA-TR), construido en una “placa microtiter” con los mAbs de captura inmovilizados en el fondo de cada pocillo de la placa (fase sólida). Se usó como mAb de lectura o secundario, un Ab biotinilado y que posteriormente con la utilización de un conjugado de estreptavidina-europio generaba la señal de fluorescencia que podía ser leída utilizando un fluorímetro con resolución de tiempo.

Con este desarrollo se llegó a la introducción a modo de prueba del método tanto en los Juegos Olímpicos de Atenas (2004), como en los Juegos Olímpicos de Invierno de Turín (2006) sin que los resultados obtenidos fueran considerados como oficiales.

Los resultados eran muy reproducibles aunque existían también problemas de sensibilidad, sobre todo observada en el “pit assay”.

Por este motivo los inmunoensayos se modificaron y mejoraron pasando de formato placa a formato tubo (Abs igualmente coatados al fondo del tubo de poliestireno) y cambiando las lecturas de fluorescencia por las de luminiscencia, conseguido por medio del marcaje del Ab de lectura o secundario con acridinio, pasando a denominarse como inmunoensayo de luminiscencia o en su acrónimo más utilizado como inmunoensayo luminométrico (ILMA) o inmunoensayo de luminiscencia (LIA)(98).

Estos inmunoensayos se implementaron hace cuatro años en los Juegos Olímpicos de Beijing (2008) y actualmente ya constituyen el método oficial de la WADA para la detección del abuso de hGH. El margen de tiempo para la detección era relativamente corto de menos de 18 horas a 36 horas en dependencia del género y de la dosis de rhGH recibida (98).

Todo el mecanismo de funcionamiento está descrito de este modo en la literatura científica (98;146;281-283) por lo que se trataría de un principio de funcionamiento en realidad teórico, los mecanismos de feed-back ya han sido ampliamente descritos en el campo de la endocrinología, pero la realidad es que se desconoce de una forma nítida y clara el funcionamiento real de este método

Antes de explicar la segunda aproximación del método directo, buscando la alteración de la proporción de isoformas, en este caso las variantes de 22 kDa y 20 kDa, cabe mencionar los trabajos previos realizados por el grupo del Dr. Mario Mellado del CNB, que en 1996 con anterioridad al desarrollo de la aproximación puesta en marcha por el Consorcio Australiano-Japones, publicó su trabajo acerca de la generación y posterior caracterización de mAbs específicos(137) tanto para la variante de 22 kDa hGH (mAb hGH-25 y hGH-26), como para la variante de 20 kDa hGH (mAb hGH-33), desarrollando también otro mAb de más amplia especificidad tanto para la variante de 22 hGH como para la variante de 20 kDa hGH (mAb hGH-12). Con estos mAbs desarrollo dos distintos inmunoensayos tipo “sándwich”, en uno utilizó como mAb de captura el hGH26 (para la variante de 22 kDa) en el otro inmunoensayo utilizó como mAb de captura el hGH-33 (para la variante de 20 kDa) y en ambos casos utilizó como Ab secundario el mAb hGH-12 biotinilado. Era un buen punto de partida aunque en esta primera experiencia la sensibilidad alcanzada aún era demasiado elevada (4.4 µg/L para la variante de 22 kDa y 4.0 µg/L para la variante de 20 kDa). Esta línea de investigación se interrumpió, el grupo del Dr. Mellado en el CNB trabajaba inicialmente en ello como parte de investigación aplicada a la mejora en el diagnóstico de patologías de la hGH. Sin duda de haber continuado se hubiera podido mejorar mucho esta primera aproximación.

Siguiendo en esta línea se inició posteriormente la alternativa primero japonesa y posteriormente Australiano-Japonesa de la

segunda aproximación estudiada en esta tesis. Esta aproximación se basaba en la medición de las variantes moleculares de hGH de 22 kDa y 20 kDa (82;118;134;286;287). Este método se basa en la medición directa por medio de dos inmunoensayos específicos, uno para la variante de 22 kDa hGH y el segundo para la medición de la variante de 20 kDa hGH. La detección se basa en los mismos principios ya expuestos de la alteración de proporciones. Mediante estos dos inmunoensayos se obtiene una ratio de proporciones entre 22/20 kDa hGH. En condiciones fisiológicas la proporción de 9:1 entre 22 y 20 kDa se mantiene estable. Con la presencia masiva de rhGH exógena el ratio entre 22/20 kDa aumenta considerablemente. Para esta aproximación los inmunoensayos se desarrollaron inicialmente en formato ELISA, contruidos en “placa microtiter” con los mAbs de captura inmovilizados para cada caso en el fondo de cada pocillo de la placa (fase sólida). Se uso como mAb de lectura o secundario, un Ab biotinilado, que posteriormente con la utilización de estreptavidina y sustrato desarrollaba luz para su lectura. Actualmente los dos ELISA (22 y 20 kDa hGH) están en fase de validación, proceso en el que participan distintos laboratorios anti-dopaje entre ellos el laboratorio de Barcelona.

Posteriormente pasados unos años esta metodología con los mismos anticuerpos que los utilizados con ELISA se desarrollo con otro tipo de inmunoensayo mediante el cual es posible analizar simultáneamente diferentes analitos y que se basa en la lectura por citometría de flujo. Este tipo de inmunoensayo es del tipo inmunoensayo con microesferas de fluorescencia covalente

(FCMIA) o también metodología conocida como Luminex® por el nombre comercial del instrumento que se utiliza.

Para poder discernir el funcionamiento de cada metodología y ver como funciona realmente y saber cual es el grado de especificidad de cada anticuerpo utilizado así como también otras características de estos anticuerpos se puede utilizar la metodología conocida como Resonancia del Plasmon de Superficie (SPR).

Una forma de estudio de interacciones bio-moleculares y también diseccionar las características de las mismas es la utilización de la metodología SPR. Con la utilización del método SPR es posible estudiar interacciones antígeno-anticuerpo (Ag)-Ab en tiempo real y conocer a su vez las características específicas de dichas interacciones. A continuación se detallan algunos de los principios de funcionamiento de la metodología SPR.

1.6 Resonancia del Plasmon de Superficie (SPR).

Esta metodología se puede utilizar para monitorizar interacciones bio-moleculares en tiempo real y bajo condiciones dinámicas. El método SPR es una técnica basada en un fenómeno óptico que utiliza luz monocromática plano-polarizada y que puede realizar medidas en tiempo real. La luz monocromática incide en el borde de una capa superior con mayor índice de refracción (un prisma) que el otro borde inferior que presenta un menor índice de refracción (un metal) (ver figura 6). Esta luz será parcialmente refractada y reflejada (ver figura 6, ángulo SPR θ). La detección en SPR se basa en los cambios detectados en esta luz reflejada. Cuando los fotones

de la luz incidente interactúan con los electrones de la capa de metal, de ello resulta una disminución de la intensidad de la luz reflejada. A un ángulo de incidencia concreto la intensidad de la luz reflejada va variando según que los fotones vayan interactuando con los electrones de la capa de oro inferior y se generen los denominados plasmones. Esta onda evanescente (plasmones) generada (ver figura 6) penetra en dirección opuesta del haz de luz incidente y la variación del ángulo del haz de luz incidente (SPR θ) dependerá del material que esté inmovilizado en la superficie de la capa de oro del chip (288) y del nuevo material que interacciona con el previo inmovilizado. En esta interacción se genera un cambio de material en la superficie y este cambio genera a su vez una variación del ángulo-SPR. Estos cambios del ángulo-SPR son leídos por el detector del instrumento que a su vez nos los da como unidades de resonancia (RU). La lectura que realiza en RU, representa una equivalencia en la que un cambio en el ángulo de 0.1° equivale a 1000 RU y a 1 ng/mm^2 de bio-molécula.

Explicado como ejemplo práctico sería parecido a como si una bio-molécula (un Ab) es inmovilizada sobre la superficie de un chip. Su pareja de unión o ligando (un Ag) es inyectada en solución acuosa mediante un flujo constante que pasa sobre la bio-molécula inmovilizada bajo condiciones controladas escrupulosamente como: flujo continuo, composición del tampón, y temperatura.

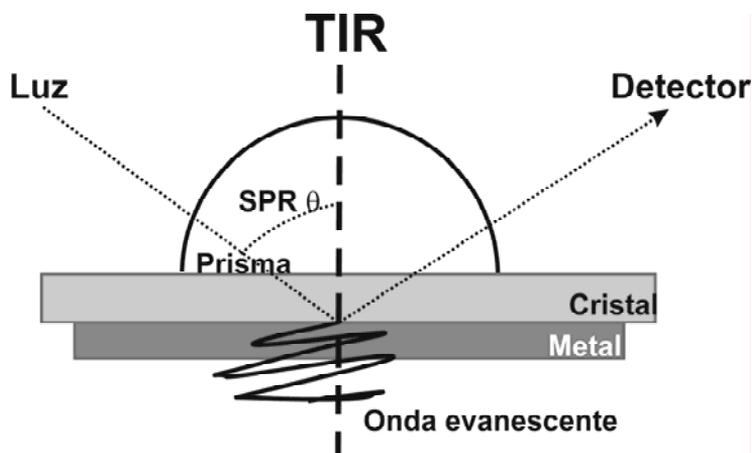


Figura 6.- Esquema del principio en que se basa la SPR. Un haz de luz polarizado en un plano, monocromático golpea la capa de cristal y es reflejada (TIR), con un ángulo (SPR θ). Los fotones al interactuar con los electrones dan de una parte la disminución de la luz reflejada y de la otra una onda evanescente que se propaga dentro del medio inferior metálico (capa fina de oro). Las biomoléculas inmovilizadas en la superficie de oro (metal) durante la interacción con una segunda biomolécula varían el ángulo SPR (θ). Esta variación del ángulo es recogida en el detector y su magnitud es expresada como unidades de resonancia (RU) que son directamente proporcionales a la interacción llevada a término. La relación de RU (ordenadas) *versus* tiempo (abcisas) se expresa mediante el denominado sensorgrama.

Los cambios que dan lugar a las interacciones bio-moleculares son registrados por el instrumento en dependencia del tiempo transcurrido desde el momento en que se inicia la inyección de material. Todo ello se expresa en el denominado sensorgrama que se puede representar con RU en el eje de ordenadas y el tiempo en segundos en el eje de abcisas. Por todo ello queda claro que el sensorgrama expresa la interacción ocurrida en tiempo real (ver figura 7, ejemplo de sensorgrama) (289).

Un sensorgrama típico de una interacción bio-molecular conlleva dos fases distintas, una fase de asociación cuando el Ag es inyectado y la interacción tiene lugar conforme este fluye a través de la superficie del chip, y una fase de disociación cuando el material inyectado finaliza y la lectura ya corresponde al cambio semi-permanente del Ag unido al Ab en la superficie. La disociación del Ag con el Ab puede seguir su curso según su propia velocidad de disociación, mientras va fluyendo el tampón o bien se puede acelerar por medio de la inyección de una fase de regeneración.

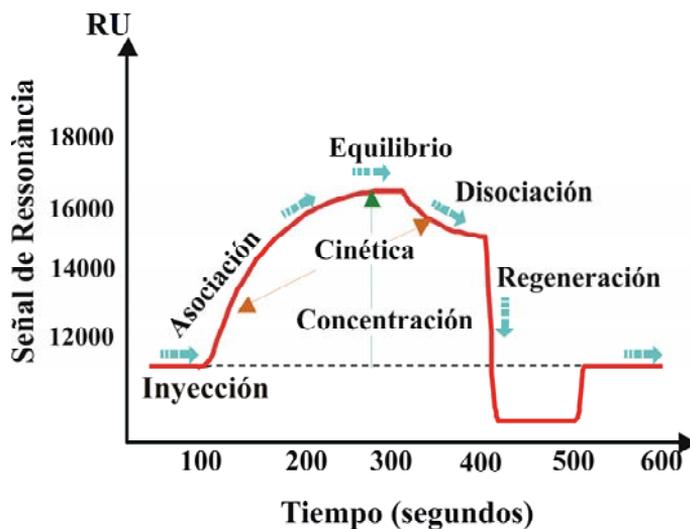


Figura 7.- Sensorgrama típico cuando el analito o Ag se asocia al Ab mientras fluye la solución que contiene este Ag (fase de asociación), cuando el Ag se disocia del Ab (solamente fluye el tampón) hasta alcanzar un estado estacionario (fase de disociación), y la fase de regeneración de la superficie para recuperar el estado original de los Abs (condiciones ácidas o básicas, con o sin fuerza iónica o con formadores de complejos como el E.D.T.A.).

Se pueden aplicar a la superficie soluciones competitivas, orgánicas, ácidas, básicas o salinas para separar el Ag del Ab y recuperar el estado original de la superficie para poder ser re-utilizada. Las condiciones de regeneración se deben optimizar para cada Ab o interacción y con ello asegurarse que el tiempo de vida del Ab inmovilizado en la superficie sea el máximo posible (ver figura 7, ejemplo de sensorgrama).

El instrumento utilizado en esta tesis, Biacore-3000, permite monitorizar la interacción de cuatro Abs diferentes simultáneamente por medio de cuatro FC independientes.

Esta metodología es totalmente idónea para la caracterización de los distintos Abs que se utilizan en esta tesis. Estos Abs han podido ser estudiados y caracterizados por medio de SPR, en presencia de distintas isoformas o variantes moleculares de la hGH.

En la primera parte de esta tesis se describe la caracterización de los distintos mAbs implicados en los inmunoensayos de los diferentes métodos directos descritos. La caracterización ha consistido en establecer parámetros inmunoglobulina-específicos sobre el comportamiento en la inmovilización, requerimientos de regeneración, especificidad, cinéticas de cada interacción, entre otras. Por todo ello ha sido posible una comparación precisa de las distintas interacciones moleculares presentadas.

Capitulo 2: OBJETIVOS

2. OBJETIVOS.

El trabajo realizado se ha llevado a cabo dentro del contexto del abuso de hGH en el ámbito del deporte y se ha realizado dentro del periodo de desarrollo de una metodología analítica para la detección del abuso de hGH. Todo ello se viene realizando desde hace años y en el inicio del trabajo no existía aun un método analítico oficial reconocido por la WADA. Hasta ahora se han desarrollado distintas estrategias basadas en distintos planteamientos. En la primera estrategia, denominada como método directo, se utilizan diferentes métodos para establecer una proporción relativa de variantes moleculares de la hGH, proporción que se altera cuando se administra hGH exógena. En la segunda estrategia, denominada indirecta, se miden bio-marcadores determinados que reflejen la actividad de la hGH, bio-marcadores que aumentan cuando se administra hGH exógena.

Con estas condiciones, hasta la fecha, no se habían comparado las dos estrategias con una misma serie de datos. Esta comparación de datos es lo que se ha llevado a cabo en este trabajo.

Los inmunoensayos comerciales son de difícil estudio y evaluación. Los anticuerpos que utilizan son en general de difícil acceso e información. Solo es posible evaluarlos a través de su resultado analítico final. En cambio los inmunoensayos no comerciales y que están en fase de desarrollo, en principio pueden ser evaluables por partes, estudiando individualmente su comportamiento.

Con estas características iniciales descritas, los objetivos de esta tesis son:

- Completar el desarrollo de metodologías para la detección del abuso de hGH en el ámbito del deporte.
- Evaluar la estrategia denominada directa mediante la valoración de dos aproximaciones que miden en cada caso la alteración en la proporción de distintas isoformas.
- Evaluar los anticuerpos monoclonales reproducidos específicamente por otros laboratorios (Munich, Tokio) para el desarrollo de inmunoensayos exclusivos.
- Comparar los distintos inmunoensayos con una única muestra obtenida a partir de ensayos clínicos específicos.
- Contrastar por último la estrategia denominada indirecta con utilización de bio-marcadores para la detección también del abuso de hGH en el deporte.

De las estrategias mencionadas inicialmente, en la denominada estrategia directa, se intenta establecer la presencia de administración exógena de rhGH mediante una proporción relativa de variantes moleculares de la hGH en sangre alterada. Dentro de esta estrategia hasta hoy se han utilizado dos aproximaciones distintas basada cada una en la medición de distintas variantes moleculares de hGH. En ambas aproximaciones se han utilizado diferentes inmunoensayos desarrollados específicamente para la detección del abuso de hGH en el deporte. En primer lugar una basada en cuatro inmunoensayos tipo ILMA o LIA. En la segunda

aproximación se desarrollaron dos inmunoensayos tipo ELISA (posteriormente se paso a FCMIA utilizando los mismos mAbs que en el inmunoensayo ELISA).

Antes de comparar ambas aproximaciones se ha procedido a un mejor conocimiento de la funcionalidad de los diferentes inmunoensayos mediante la caracterización lo más completa posible de los mAbs utilizados mediante el método de SPR. Cabe citar que otros Abs que no intervienen actualmente en estos métodos pero que podrían ser interesantes en un futuro próximo también han sido caracterizados, aunque sus resultados no son el motivo principal de este trabajo a y por lo tanto se encuentran fuera de los objetivos de esta tesis. No obstante en algún momento algunos de ellos serán citados para fundamentar mejor determinadas decisiones que se tomaron en el transcurso de este trabajo. MAbs como el A1-549 comercial; el mAb anti-20 kDa hGH hGH-33 del CNB de Madrid (137), los mAbs anti-20 kDa hGH, 5C4 y 1G12, de la Universidad Ludwig-Maximilians de Munich (133), y los mAb anti-20 kDa hGH #1 a #13 del Doping Control Center de Beijing.

Otro objetivo a comentar ha sido el de analizar y evaluar las distintas aproximaciones de la estrategia directa, así y la capacidad de cada aproximación para detectar la administración exógena de hGH y el margen de detección en unidad de tiempo para la rhGH (WOO: windows of opportunity).

Para la segunda estrategia acerca de la detección del abuso de hGH, denominada como indirecta, se han podido contrastar bio-

marcadores derivados de la actividad de la hGH. Con esta estrategia se han contrastado los resultados obtenidos para valorar también la WOO. En este caso estos bio-marcadores se han analizado mediante inmunoensayos comerciales. Se han analizado los resultados obtenidos según las bases establecidas por el proyecto de estudio conocido como GH-2000(262). Los resultados obtenidos se han podido verificar y comparar mediante distintas fórmulas discriminantes.

Con tal de poder alcanzar estos objetivos, se han llevado a cabo en el transcurso del trabajo de esta tesis dos ensayos clínicos separados en el tiempo y utilizados como herramienta de trabajo. Estos ensayos clínicos fueron contrastados mediante valores fármaco-cinéticos. De las muestras obtenidas han derivado los resultados evaluados en este trabajo.

Capitulo 3: MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1 Anticuerpos contra la hGH.

3.1.1 Anticuerpos comerciales.

El mAb específico anti-22 kDa hGH fue suministrado por Biospacific (Emeryville, USA) con el n° de clon A36030047P por lo cual se mencionara como mAb A36. Este anticuerpo, clasificado como IgG_{1kappa}, fue producido en líquido ascítico de ratón utilizando como inmunógeno glándula hipofisaria humana. La purificación de este anticuerpo se realizo por medio de cromatografía de intercambio iónico (DEAE). La especificidad de la inmunoglobulina purificada, así como posibles reacciones cruzadas, no fueron suministradas por el fabricante. El mAb anti-ratón obtenido de cabra del tipo IgG (H+L) fue suministrado por Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, USA (ref. 31992). Este anticuerpo se ha utilizado para evaluar las uniones no específicas (NSB) de cualquiera de los analitos en el estudio realizado para la caracterización de los anticuerpos mediante SPR. La señal obtenida ha sido restada a las señales obtenidas con los anticuerpos anti-hGH utilizados.

3.1.2 Anticuerpos no comerciales.

Para los anticuerpos de la serie AK que anteriormente se les adjudico otra nomenclatura en los primeros trabajos publicados (mAb AK565 antes 1B3, mAb AK566 antes 5D7, mAb AK567 antes 8A9, mAb AK568 antes 8B11 y mAb AK569 antes 10A7)

MATERIAL Y MÉTODOS

producidos y utilizados para aplicar al método de inmunoensayo LIA o (ILMA)(98). Estos mAbs fueron cedidos por el Dr. Martin Bidlingmaier de Endocrine Research Laboratories, Medizinische Klinik Innenstadt (Ludwig-Maximilians University, Munich, Germany).

El mAb de ratón D05 anti-20 kDa hGH fue re-clonado (según el procedimiento patentado (286) en el laboratorio Mitsubishi Chemical Medience Corporation (MCM) en Tokyo (Japón). El procedimiento de obtención para el mAb específico anti-20 kDa D05 producido y utilizado para aplicar al método de ELISA ha sido previamente publicado (286). Este mAb D05 fue cedido por el Dr. Makoto Ueki de MCM.. Dos mAbs específicos y dirigidos en principio contra la isoforma de 20 kDa hGH, el mAb 5C4 y mAb 1G12, fueron producidos en Alemania (Universidad Ludwig-Maximilians, Munich) por los doctores C. J. Strasburger, M. Bidlingmaier y Z. Wu, y cedidos por el Dr. Martin Bidlingmaier(133), y por último el mAb #7 en principio dirigido contra la isoforma de 20 kDa hGH.fue producido en el Doping Control Center de Beijing (China) y cedido por el Dr. Moutian Wu.

3.2 Antígenos para el estudio de los anticuerpos anti-hGH por SPR.

La isoforma de 22 kDa hGH-N (Genotropin®, en España comercializado como Genotonorm®) fabricada mediante tecnología DNA recombinante por medio de la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*). Este producto fue suministrado por Pfizer Laboratories (New York, USA). Otra isoforma de 22 kDa hGH (recombinante 22 kDa

MATERIAL Y MÉTODOS

IRP 98/574) también obtenida por medio de tecnología DNA recombinante utilizando *E. coli* fueron suministradas por el National Institute for Biological Standards and Controls (NIBSC) (Hertfordshire, Gran Bretaña). Una mezcla de isoformas de hGH parcialmente purificadas (Pituitary hGH, IRP 80/505) obtenida comercialmente de extractos de glándula hipofisaria humana preparados por el NIBSC.

La isoforma de 20 kDa hGH-N fue cedida por MCM obtenida con tecnología DNA recombinante mediante *E. coli*. Este material fue producido según el procedimiento ya publicado (68). Las variantes moleculares de origen placentario de 22 kDa hGH-V recombinante y 20 kDa hGH-V recombinante, así como, la prolactina humana recombinante (hPr1) y GHP recombinante fueron comprados a ProsPec-Tanny Technogene Ltd. (Weizmann Science Park, Rehovot, Israel). Las dos preparaciones de lactógeno placentario humanos (hPL), obtenidos de extractos de placenta y purificados por medio de cromatografía, fueron obtenidos del NIBSC (Hertfordshire, Gran Bretaña) código 73/545 y de la empresa Affiland (Lieja, Bélgica).

La variante de 17 kDa (una mezcla de las secuencias de aminoácidos de las posiciones 44-191 (AA₄₄₋₁₉₁) y 45-191 (AA₄₅₋₁₉₁) fue obtenida en nuestro propio laboratorio por el procedimiento de proteólisis limitada, a partir de la isoforma recombinante de 22 kDa hGH (IRP, 98/574) que fue suministrada por el NIBSC (Hertfordshire, Gran Bretaña). El procedimiento ha sido descrito previamente (52).

MATERIAL Y MÉTODOS

La variante de 5 kDa fue obtenida en nuestro propio laboratorio por medio de síntesis química de fase sólida (290), una técnica estándar para sintetizar péptidos de hasta 50 – 60 aminoácidos con altos niveles de eficiencia. El procedimiento ha sido descrito previamente (50).

3.3 Reactivos utilizados en inmunoensayos.

3.3.1 Reactivos para ELISA y FCMIA-Luminex®.

El kit de marcaje con biotina para proteínas FluoReporter biotin XX utilizado para marcar con biotina el anticuerpo de lectura o secundario fue suministrado por Molecular Probes (New York, USA). El conjugado de estreptavidina-HRP (peroxidasa de rábano) Amdex™ fue suministrado por Amersham Biosciences (Buckinghamshire, Gran Bretaña). El reactivo sustrato de color 3,3',5,5'-tetra-methylbenzidine (TMBZ microwell peroxidase substrate) fue suministrado por KPL (Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Maryland, USA).

El reactivo bloqueante heterofilico (HBR) fue suministrado por Scantibodies Laboratories (Santee, USA). El polietileno glicol sorbitan-monolaurato (Tween®-20) fue suministrado por Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA). El agente bloqueante BlockAce fue suministrado por Dainihon Pharmaceuticals (Dainippon Sumitomo Pharma Co., Osaka, Japón). La albúmina sérica bovina (BSA) fue suministrada por Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA). Las microplacas Nunc-Immuno Module F8-Maxisorp fueron suministradas por Nalge Nunc International (Nalgene Thermo

MATERIAL Y MÉTODOS

Scientific, Rochester, USA). El suero de ratón fue suministrado por Chemicon (Merck Millipore, Billerica, USA). Caseína de leche bovina en forma de sal sódica fue suministrada por Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, USA). El ácido etano-sulfónico 2-N-morfolino (MES) fue suministrado por Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). El 1-etil-3-(3-dietilaminopropil)-carbodiimida clorhidrato (EDC) y N-hidroxi-sulfosuccinimida (Sulfo-NHS) utilizados en el método Luminex® fueron suministrados por Pierce (Rockford, USA). Las microesferas carboxiladas, xMAP 110 y xMAP 190 fueron suministradas por Luminex Corporation (Austin, USA). El conjugado de estreptavidina R-ficoeritrina (PE) SAPE S866 fue suministrado por Molecular Probes, Inc. (Eugene, USA).

Otros reactivos generales fueron de la máxima calidad y pureza analítica comercialmente disponible.

3.3.2 Reactivos para FIA-TR.

Las microplacas Maxisorp Nunc (No.: 442404) fueron suministradas por Nalge Nunc International (Nalgene Thermo Scientific, Rochester, USA). Los selladores de acetato de microplacas fueron suministrados por Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA). El tampón de coatación hidrogeno fosfato disódico-dihidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) y la solución de hidróxido sódico (NaOH) 1 M fueron suministrados por Fluka (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). El estándar IRP 80/505 y el IRP 88/624 fueron suministrados por el NIBSC (Hertfordshire, Gran Bretaña). El suero de oveja (S-2263) fue suministrado por Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). La solución de lavado concentrada (Delfia® wash

MATERIAL Y MÉTODOS

concétrate, No.: 1244-114), el tampón de ensayo (Delfia® assay buffer, No.: 4002-0010, preparado para su uso), la estreptavidina marcada con Europio (Delfia® Streptavidin Europium, Stav-Eu, No.: 1244-360) y la solución potenciadora (Delfia® Enhancement solution, No.: 1244-105 protegida de la luz y preparada para su uso) fueron suministrados por Delfia-PerkinElmer (Shelton, USA). Otros reactivos generales fueron de la máxima calidad y pureza analítica comercialmente disponible.

3.3.3 Reactivos para ILMA.

El desarrollo y puesta a punto del kit se realizó en Alemania (98). El acridinio (MACN-Acrinium-NHS-Ester acridinium ester) para marcar el anticuerpo secundario AK569 fue suministrado por in.vent Diagnostica GmbH (Hennigsdorf, Alemania). Las columnas de purificación Nap5 fueron suministradas por GE Healthcare Europe GmbH (Munich, Alemania). La columna para HPLC BioRad Bio-Sil SEC 400-5 fue suministrada por BioRad Laboratories (Hercules, USA). Los tubos de poliestireno fueron suministrados por Greiner (Frickenhausen, Alemania). El Karion FP fue suministrado por Merck KGAA (Darmstadt, Alemania). El suero de oveja fue suministrado por Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Los estándares internacionales de referencia IRP 80/505 e IRP 88/624 fueron suministrados por el NIBSC (Hertfordshire, Gran Bretaña). El suero humano libre de hGH fue suministrado por BRAHMS (Hennigsdorf, Alemania). El kit Basiskit específico para luminiscencia fue suministrado por BRAHMS (Hennigsdorf,

MATERIAL Y MÉTODOS

Alemania). Los kits 1 y 2 para los inmunoensayos diferenciales de isoformas de hGH (cada kit incluye los denominados “rec y pit assays”) fueron suministrados por CMZ (Berlin, Alemania).

Los kits comerciales de GH, IGF-I e IGFBP-3 fueron suministrados por Siemens-Diagnostic Products Corporation (Los Angeles, USA). El kit comercial de radio-inmuno-ensayo (RIA) para el marcador P-III-NP “UniQ RIA kit” fue suministrado por Orion Diagnostica (Espoo, Finlandia).

3.4 Resonancia del Plasmon de Superficie (SPR).

3.4.1 Condiciones generales.

Los análisis por SPR fueron realizados a una temperatura constante de 25.00 °C y a flujos de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ y 40 $\mu\text{L}/\text{min}$, excepto para el procedimiento de inmovilización de superficies que fue realizado a 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. En general los volúmenes de muestra utilizados fueron de 60 μL .

Para minimizar el efecto de las interacciones debidas a NSB sobre el resultado global, se utilizó un canal como referencia, el canal de flujo (FC) 1, de los cuatro canales posibles existentes en el chip. Un anticuerpo obtenido de cabra específico anti-ratón fue inmovilizado en la superficie FC1. Se obtuvieron respuestas relativas con la combinación del resto de canales (FC2, FC3 y FC4) expresadas como RU como resultado de la sustracción (FC2 - FC1; FC3 - FC1 y FC4 - FC1). Durante la evaluación, los diferentes chips utilizados fueron desacoplados del instrumento después de hacer fluir aire a través de las superficies y guardados a 4 °C.

3.4.2 Reactivos SPR.

Los análisis de SPR fueron realizados en un instrumento BIAcore 3000 (Biacore, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Alemania) en Laboratorio de Bioanálisis del Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques. Parc de Salut Mar) en Barcelona.

Los chips-sensores utilizados en los experimentos fueron de dextrano carboxi-metilado de alta densidad y denominados como CM5 por el fabricante. Estos chips-sensores, superficies con una capa de oro y una capa de 100 nm de dextrano coatada sobre aquella, fueron suministrados por Biacore (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Alemania). El tampón de trabajo denominado “standard running buffer” y compuesto por HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, y surfactante P-20 al 0.005% (v/v) (HBS-EP), a pH 7.4, así como también la N-hidroxisuccinimida (NHS), la N-etil-N(dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y la etanolamina-hidrocloruro 1 M a pH 8.5 fueron suministrados por Biacore (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Alemania).

3.4.3. Inmovilización de biomoléculas en SPR.

La inmovilización de bio-moléculas sobre la superficie fue realizada utilizando la química denominada “standard amine coupling” tal como esta descrita por el fabricante Biacore. Brevemente; los grupos carboxilos presentes en el dextrano carboxi-metilado del chip se activaron por medio de la inyección de una mezcla en proporción 1:1 (v/v) de NHS 100 mM y EDC 400 mM. A continuación de la activación de la superficie, el acoplamiento de

MATERIAL Y MÉTODOS

las bio-moléculas de interés se realizó por medio de grupos amino primarios utilizando soluciones de concentración entre 50-80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ diluidos sobre tampón de acetato sódico 10 mM a pH 4.0 denominado “coupling buffer” para acabar obteniendo niveles de inmovilización altos. El nivel de activación corresponde a una respuesta en SPR de ~ 300 unidades de resonancia (RU). Los grupos carboxilos restantes y todavía activados pero que no reaccionaron fueron bloqueados con la inyección de 60 μL de etanolamina-hidrocloruro 1 M a pH 8.5. Después de la inmovilización de las nuevas superficies el chip-sensor (4 superficies por cada chip) permanecieron entre 3-4 horas como mínimo en el instrumento estabilizados con un flujo constante de “running buffer” de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ con el fin de conseguir una estabilización antes de iniciar cualquier experimento.

3.4.4 Condiciones de regeneración de superficies.

Antes de realizar los análisis de SPR, se estudiaron las condiciones de regeneración de la superficie para reinstaurar las condiciones iniciales. Entre otras diferentes condiciones se probaron cambios graduales de la fuerza iónica, de pH, etc., con el objetivo de obtener la mejor regeneración posible de la superficie y que se produjeran los mínimos daños estructurales para las moléculas de anticuerpo inmovilizadas. La regeneración más óptima se alcanzó con una solución mezclada de ácido trifluoroacético (TFA) 20 mM y glicina 20 mM.

3.4.5 Interacciones, cinética y análisis de datos.

La reactividad cruzada ante los diferentes anticuerpos inmovilizados fue evaluada mediante inyecciones de todos los posibles analitos a concentraciones de ~ 200 ng/mL sobre la superficie, conteniendo esta un nivel de densidad alto de anticuerpos inmovilizados. Las reacciones cruzadas se estudiaron inyectando los analitos a una velocidad de flujo de $20 \mu\text{L}/\text{min}$. Las distintas isoformas de hGH así como de otros analitos se inyectaron tanto en soluciones separadas como en mezclas a distintas ratios.

Para la cinética, series de al menos cinco concentraciones diferentes de los analitos de interés (aquellos que ofrecían respuesta de interacción con el anticuerpo) se inyectaron a distintas velocidades de flujo (20 y $40 \mu\text{L}/\text{min}$). El análisis de datos se realizó mediante el programa informático específico BIAevaluation 4.1 software (Biacore, Uppsala, Suecia). Este análisis incluía entre otras las valoraciones de las constantes de velocidad de asociación (k_a) y velocidad de disociación (k_d), así como también las constantes de asociación (KA) y disociación (KD). Para los ajustes de las curvas realizados se utilizaron modelos con o sin efectos de transporte de masas para cada opción específica (prueba de ajuste simultánea k_a/k_d).

Se llevaron a cabo experimentos de combinaciones de analitos inyectados sobre la superficie de cada anticuerpo para comprobar el efecto de enmascaramiento que pudiera presentar unos sobre otros. Se realizaron combinaciones, teniendo en cuenta en los casos en que se conocían sus niveles fisiológicos, de analitos en el valor fisiológico real o en valores aumentados para ambos 10 veces.

3.5 Ensayos Clínicos.

3.5.1 Primer Ensayo Clínico.

3.5.1.1 Materiales.

El medicamento Genotonorm (Genotropin®) fue suministrado por Pfizer Laboratories (New York, USA) (por medio del Departamento de Farmacia del Hospital del Mar-Parc Salut Mar).

3.5.1.2 Sujetos a estudio.

Los voluntarios inicialmente fueron seleccionados aplicando criterios de inclusión y exclusión establecidos en la documentación presentada al Comité Ético de Investigaciones Clínicas (CEIC). Entre ellos incluían una historia clínica en la que no se detectaron alteraciones en el desarrollo y crecimiento de los sujetos, valores analíticos dentro de los márgenes poblacionales así como también una exploración clínica complementaria realizada antes de que el posible voluntario fuera incluido en el ensayo.

Se reclutaron tres sujetos varones voluntarios cuyas características demográficas globales eran (promedio \pm DE) edad 21.67 ± 0.58 (años), altura 179.33 ± 1.61 (cm), peso 76.73 ± 3.66 (kg) e índice de masa corporal (BMI) de 23.85 ± 0.91 .

3.5.1.3 Diseño del estudio.

El estudio fue diseñado como un ensayo simple-ciego controlado y con asignación aleatoria, fue aprobado por el Comité Ético de

MATERIAL Y MÉTODOS

Investigación Clínica del Parc Salut Mar (CEIC-IMAS N° 2005/1945) y los voluntarios dieron el consentimiento informado por escrito. El ensayo se llevo a cabo en el Área de Investigación Clínica de la Unidad de Investigación de Farmacología Humana y Neurociencias del Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques. Parc de Salut Mar). Después de una evaluación basal antes de iniciarse la administración del fármaco, a las 8.00 de la mañana se les administró por vía subcutánea 6 UI/diarias (3 UI equivalentes a 1 mg de rhGH) a cada voluntario durante 3 días, equivalentes a 0.026 ± 0.001 desviaciones estándar (DE) mg/kg/día como valor promedio, equivalentes a 0.078 UI/kg/día ± 0.004 DE.

El periodo de lavado (conocido también en términos de ensayo clínico como wash-out) se fijó hasta las 48 horas de haber finalizado la administración de rhGH. Tanto las muestras de sangre como de orina fueron recogidas según el esquema detallado en la tabla 7. Las muestras de sangre fueron obtenidas de vena del antebrazo y recogidas en tubo Vacutainer® de plástico con gel separador. Estas muestras se dejaron reposar durante un tiempo mínimo de 30 minutos y luego fueron centrifugadas a 4 °C, posteriormente el suero separado fue alicuotado (0.5 mL) y congelado a -80°C hasta el momento de efectuar los correspondientes análisis. Las muestras de orina fueron recogidas en tres fracciones horarias por día, alrededor de hora en punto.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 7.- Indicación de la administración rutinaria de rhGH durante el primer ensayo clínico y de la recogida de las diferentes muestras. La recogida de orina comprende intervalos de tiempo, indicados a pie de tabla.

Días de administración de rhGH																		
	Día 1					Día 2					Día 3							
Tiempo*	0	2	4	6	8	10	0	2	4	6	8	10	0	2	4	6	8	10
rhGH	■						■						■					
Orina***	■			■		■	■			■		■	■			■		■
Sangre	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
Periodo de lavado (wash-out)																		
	Día 4					Día 5												
Tiempo*	0	2	4	6	8	10	0	2	4	6	8	10						
Orina***	■					■	■					■						
Sangre	■						■											

*: Horas.

***: Día 1 orina 0: orina espontánea. Días de 1 al 5, orina 6: orina de 0 a 6 horas; orina 10: orina de 6 a 10 horas. Días 2, 3, 4 y 5, orina 0: orina de 10 a 24 horas (0 horas del día siguiente).

3.5.2 Segundo Ensayo Clínico.

3.5.2.1 Materiales.

El medicamento Genotonorm (Genotropin®) fue suministrado por Pfizer Laboratories (New York, USA) (por medio del Departamento de Farmacia del Hospital del Mar-Parc Salut Mar).

3.5.2.2 Sujetos del estudio.

Se reclutaron nueve sujetos varones voluntarios. Los voluntarios inicialmente fueron seleccionados aplicando criterios de inclusión y exclusión establecidos en la documentación presentada al CEIC. Entre ellos incluían una historia clínica en la que no se detectaron alteraciones en el desarrollo y crecimiento de los sujetos, valores analíticos dentro de los márgenes poblacionales así como también

MATERIAL Y MÉTODOS

una exploración clínica complementaria realizada antes de que el posible voluntario fuera incluido en el ensayo.

Las características demográficas globales eran (promedio \pm DE), edad de 24.42 ± 1.40 (años), altura de 176.56 ± 6.74 (cm), peso de 76.11 ± 6.07 (kg), e índice de masa corporal (BMI) de 24.42 ± 1.40 . Las características demográficas separadas eran para los 7 sujetos receptores del tratamiento con rhGH, edad de 23.71 ± 1.50 (años), altura de 177.21 ± 7.53 (cm), peso de 77.39 ± 5.86 (kg), e índice de masa corporal (BMI) de 24.66 ± 1.44 ; y para los 2 sujetos blancos, edad de 26.00 ± 4.24 (años), altura de 174.25 ± 3.18 (cm), peso de 71.65 ± 6.15 (kg), e índice de masa corporal (BMI) de 23.57 ± 1.16 .

3.5.2.3 Diseño del estudio.

El estudio se llevo a cabo según las correspondientes normas éticas internacionales establecidas para este tipo de estudios. Se estableció y realizo un procedimiento y con la correspondiente solicitud se obtuvo el permiso del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Parc Salut Mar en Barcelona (CEIC-Parc Salut MAR, nº 2009/2510,) y los voluntarios elegidos dieron antes de participar el consentimiento informado por escrito

El ensayo clínico fue simple-ciego, en modo aleatorio y controlado y se llevó a cabo en el Área de Investigación Clínica de la Unidad de Investigación de Farmacología Humana y Neurociencias del Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques Parc de Salut Mar). La hormona recombinante de hGH (rhGH) se administró a siete de los voluntarios, los otros dos voluntarios se utilizaron como controles sin darles el tratamiento del fármaco (denominados como

MATERIAL Y MÉTODOS

sujetos blancos). No se les administró placebo como alternativa debido a recrear mejor las condiciones reales del ámbito del deporte en la que se da una situación establecida según un modelo denominado como “off/on/off”, es decir el contexto se sitúa en que el deportista abusa de hGH con rhGH y en el caso de no hacerlo, no utiliza en su sustitución ninguna sustancia placebo. A los siete voluntarios receptores del tratamiento con rhGH se les administro diariamente 6 UI cada día (3 UI equivalentes a 1 mg de rhGH) a las 8.00 h a.m. por vía subcutánea durante un total de 7 días, esta dosis era equivalente en valor promedio a $0.026 \text{ mg/kg/día} \pm 0.002 \text{ DE}$, equivalentes a $0.078 \text{ UI/kg} \pm 0.006$.

El esquema del diseño, con la obtención detallada de las muestras de sangre y orina se muestra en la tabla 8. Después de 2 evaluaciones previas, se inició la administración de rhGH cada mañana a las 8 h a.m., a los siete voluntarios durante siete días. El periodo de lavado fue llevado a cabo hasta completar los catorce días de haber finalizado la administración de rhGH.

Las muestras de sangre venosa se obtuvieron de una vena antecubital del brazo y recogidas en tubos de plástico Vacutainer® con gel separador. Después de un periodo de espera para dejar completar la coagulación de las muestras, estas se centrifugaron a 4°C , y posteriormente el suero obtenido fue alicuotado (0.5 mL) y congelado a -80°C hasta que las muestras fueron analizadas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 8.- Indicación de la administración rutinaria de rhGH durante el primer ensayo clínico y de la recogida de las diferentes muestras. La recogida de orina comprende intervalos de tiempo indicados a pie de tabla.

Antes del inicio con rhGH												
	3 días previos al inicio						1 día previo al inicio					
Tiempo*	0	2	4	6	8	10	0	2	4	6	8	10
Orina**												
Sangre												

*: Horas.

** : Orina 24 horas.

Tratamiento con rhGH (6 UI/día; 2 mg/día)																		
	Día 1						Día 2						Día 3					
Tiempo*	0	2	4	6	8	10	0	2	4	6	8	10	0	2	4	6	8	10
rhGH																		
Orina***																		
Sangre																		
	Día 4						Día 5						Día 6					
Tiempo*	0	2	4	6	8	10	0	2	4	6	8	10	0	2	4	6	8	10
rhGH																		
Orina***																		
Sangre																		

*: Horas.

***: Orina 8: 0-8 horas; orina 0: de 8 a 24 horas.

Ultimo día de tratamiento con rhGH (6 UI/día; 2 mg/día)							
	Día 7						
Tiempo*	0	2	4	6	8	10	12
rhGH							
Orina***							
Sangre							

*: Horas.

***: Orina 8: 0-8 horas; orina 0: de 8 a 24 horas.

Periodo de lavado (wash-out)

	Día 8		Día 9	Día 14	Día 21	Día 22
Tiempo*	0	8	0	0	0	0
Orina***						
Sangre						

*: Horas.

***: Día 8, orina 8: 0-8 horas; orina 0: de 8 a 24 horas. Día 9, orina 0: de 8 a 24 horas. Días 14 y 22: orina de 24 horas de tiempo de recogida.

3.5.3 Muestras poblacionales y de atletas.

Los valores de la muestra poblacional local se obtuvieron de estudios previos realizados en el grupo de Bioanálisis y cuyos detalles ya han sido publicados (291). Esta muestra poblacional consistía en 39 varones practicantes de deporte recreacional con un promedio de practica deportiva de 4.9 horas/semana \pm 1.9 SD y con las siguientes características demográficas, edad 24.00 (años) \pm 5.69 SD, peso 73.88 (kg) \pm 8.88 SD, altura 176.23 (cm) \pm 6.41 SD e Índice de Masa Corporal (B.M.I.) de 23.9 \pm 3.91 SD. Esta muestra de 39 varones fue escogida dadas sus características muy similares a los sujetos voluntarios de los dos ensayos clínicos. Las mediciones analíticas de la IGF-I para este grupo se realizaron tal como se ha publicado (291) antes de que el kit comercial de RIA kit de Nichols Institute Diagnostics (San Juan Capristano, USA) fuera retirado del mercado por el fabricante en el año 2005 y los valores analíticos de P-III-NP se realizaron con el mismo método descrito anteriormente, el kit comercial UniQ RIA kit de Orion Diagnostica (Espoo, Finlandia)(291).

También se utilizaron muestras de atletas con test de detección de hGH realizado en el laboratorio anti-dopaje de Barcelona en estos últimos 2 años. La población al ser muestras oficiales se desconoce cuales son sus características demográficas pero estaba formada por 95 atletas varones y 53 mujeres.

3.6 Desarrollo de métodos analíticos.

3.6.1 Métodos utilizados en la estrategia directa.

3.6.1.1 ELISA específico para isoformas de 22 kDa y 20 kDa hGH.

Los análisis de ELISA se llevaron a cabo en muestras de los dos ensayos y se realizaron conjuntamente en los dos laboratorios, en el “Research and Development Department” del laboratorio de MCM en Tokio (Japón) así como también en el Laboratorio de Bioanálisis del Institut Hospital del Mar d’Investigacions Mèdiques Parc de Salut Mar) de Barcelona. El material específico necesario para el análisis por ELISA para las isoformas específicas de 22 y 20 kDa hGH se preparó en el laboratorio de MCM (Tokio, Japón). Este ELISA específico para cada isoforma ya ha sido descrito previamente (118;134). No obstante el procedimiento utilizado se describe a continuación. Se utilizaron microplacas con los mAbs específicos previamente coatados al fondo del pocillo, el mAb A36 (0.5 µg por pocillo) y el mAb D05 (1 µg por pocillo) en cada una de las respectivas placas para el correspondiente ELISA, la placa con mAb A36 coatado para el ELISA específico para medir la isoforma de 22 kDa hGH y la placa con mAb D05 para el ELISA específico para medir la isoforma de 20 kDa hGH. El Ab secundario biotinilado AF1067 se preparó según las instrucciones del fabricante del kit “FluoReporter Biotin-XX Protein Labeling Kit”. Brevemente, 0.2 mL de una solución de 0.5 mg/mL de Ab

MATERIAL Y MÉTODOS

policlonal de cabra anti-GH AF1067 se mezclaron con 20 μL de bicarbonato sódico 1 M recién preparado y 2 μL de Biotin-XX (Componente A) recién preparado en 200 μL de agua milli-Q ultrapura. La mezcla se incubó durante 1.5 horas a temperatura ambiente (TA), y el exceso de reactivo fue reemplazado con tampón fosfato-salino (PBS) 10 mM por diálisis. La solución de anticuerpo biotinilado resultante fue colocada en un tubo de 2.0 mL y el volumen total se ajustó a 500 μL con PBS 10 mM.

Para analizar las muestras, inicialmente se realizó un pre-lavado con tampón de lavado (tampón PBS 10 mM, Tween®-20 0.05 %, a pH 7.4) con 0.4 mL cada vez, dos veces. A continuación se dispensaron mediante pipeta semi-automática 0.075 mL de tampón de dilución de muestra (NaCl 1.37 M, ácido fosfórico 100 mM, BSA 2 %, HBR 10 de mg/L, Tween®-20 al 0.1% y suero de ratón al 0.1%, a pH 7.4) a cada pocillo y a continuación 0.025 mL de cada respectivo calibrador o muestra por duplicado. Las microplacas se incubaron entre 17-24 horas a 4 °C. Después de lavar mediante 0.4 mL 5 veces con tampón de lavado, se añadió a cada pocillo 0.1 mL de mAb anti-GH obtenido de cabra y marcado con biotina y a continuación se incubaron las placas 3.5 horas a 4 °C. Después de lavar de nuevo 5 veces las microplacas, se añadieron a cada pocillo 0.1 mL de solución de conjugado estreptavidina-HRP y se incubaron durante 1 hora a TA. Después de lavar las microplacas de nuevo 5 veces se añadieron a cada pocillo 0.1 mL de sustrato de color (TMBZ/H₂O₂) y se incubaron 20 minutos a TA. La reacción enzimática de color fue detenida añadiendo a cada pocillo 0.1 mL de ácido fosfórico 1 M. A continuación la absorbancia de cada pocillo se leyó en un

MATERIAL Y MÉTODOS

lector de placas a 450 nm utilizando el filtro de 620 nm como lectura de referencia. El método fue comparado entre laboratorios realizando los análisis de las muestras tanto en Tokio (Research and Development Department of MCM) como en Barcelona en el Laboratorio de Bioanálisis del Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques. Parc de Salut Mar). Todos los casos en los cuales se dieron valores altos que excedían el rango de cuantificación lineal fueron repetidos y evaluados por dilución de la muestra mediante el mismo tampón de ensayo. En Tokio se utilizó como lector de micro-placas para ELISA el instrumento Immunoplate reader, tipo Sunrise® de la casa comercial Tecan Trading AG (Ginebra, Suiza). Los datos fueron calculados y evaluados utilizando el ajuste logístico de la curva conocido como “4 parametros” (ajuste 4PL) en el propio software del instrumento. En Barcelona se utilizó el lector de placas Biorad PR3100 de BioRad Laboratories (Hercules, USA). Los datos fueron calculados y evaluados utilizando el 4PL en un software Sigma-Plot (Systat Software Inc., v 9.0, Chicago, USA).

3.6.1.2 Inmunoensayo simultaneo por citometria de flujo (Luminex®) específico para isoformas de 22 kDa y 20 kDa hGH.

El material específico necesario para el análisis por el método Luminex® para las isoformas específicas de 22 y 20 kDa hGH se preparó exclusivamente en el “Research and Development Department” de MCM por medio de la tecnología XMap-

MATERIAL Y MÉTODOS

Luminex® multi-análisis o “multiplexed” basada en la detección por medio de citometría de flujo a través de un inmunoensayo con FCMIA tal como se ha descrito previamente (132;292). El marcaje para el Ab secundario AF1067, se realizó tal como se ha descrito en el apartado anterior.

Para los inmunoensayos multi-análisis o “multiplexed” para las isoformas de 22 kDa y 20 kDa hGH, los dos anticuerpos específicos, mAb A36 y mAb D05 se inmovilizaron sobre microesferas seleccionadas con xMAP 110 y xMAP 190 respectivamente. En la lectura de fluorescencias, las microesferas al pasar a través del canal de flujo del instrumento, se clasificaban en base al código de color del respectivo xMAP, y las lecturas en el detector según la respuesta al fluorocromo ficoeritrina (PE) incorporado al anticuerpo secundario, se acumulaban para cada serie según el tipo de microesfera. De este modo, este método permitía multi-analizar con gran precisión los dos inmuno-ensayos para cada isoforma de forma simultánea en una misma y única muestra.

La preparación de inmuno-microesferas con anticuerpos anti-20 kDa y anti-22 kDa hGH unidos covalentemente se siguió el procedimiento que se describe a continuación. El solvente de las soluciones de anticuerpo anti-isoformas de hGH fue sustituido por tampón MES fresco antes de su utilización (MES 50 mM a pH 5.0 con NaOH 4N). Se alicuotaron 200 µL de soluciones de mAb por triplicado y se filtraron por micro-diálisis 5 veces contra tampón MES para 5, 10, 20, 20 y 20 minutos respectivamente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para el inmuno-ensayo de 20 kDa, se inmovilizaron sobre microesferas xMAP 110, alrededor de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de mAb con la reacción de 1.66 mg/mL de solución de mAb D05. Para el ensayo de 22 kDa, se inmovilizaron sobre microesferas xMAP 190, alrededor de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de solución de 5.2 mg/mL de mAb A36.

Para la activación de las microesferas, 200 μL de microesferas carboxiladas (alrededor de 2.5×10^6 partículas) se colocaron en tubos de 1.5 mL y el solvente fue eliminado por centrifugación a $1.000 \times g$ durante 10 minutos. Las microesferas se lavaron dos veces con 80 μL de tampón hidrogeno-fosfato sódico 0.1 M a pH 6.2. Después de someterse a ultra-sonicación durante 1 minuto, las microesferas fueron activadas incubándose con 10 μL de solución sulfo-NHS (50 mg/mL) durante 2 horas y a continuación con otra incubación de 10 μL de 50 mg/mL de solución EDC durante otros 20 minutos a TA, en oscuridad. Luego las microesferas se lavaron una vez con 500 μL de tampón MES 50 mM a pH 5.0.

Las microesferas ya activadas se resuspendieron en 500 μL de anticuerpo de captura en tampón MES y se mezclaron utilizando un “mixer” de rotación durante 2 horas a TA en oscuridad (Figura 8).

Después de centrifugar, el precipitado se lavó con 1.0 mL de PBS conteniendo 0.1% de Tween®- 20. El anticuerpo resultante ya coatado a las microesferas fue suspendido en 1.0 mL de PBS conteniendo 0.1% de Tween®-20, BSA al 1% y NaN_3 al 0.05%, y se almacenaron en refrigerador entre $2-8^\circ \text{C}$ hasta su utilización.

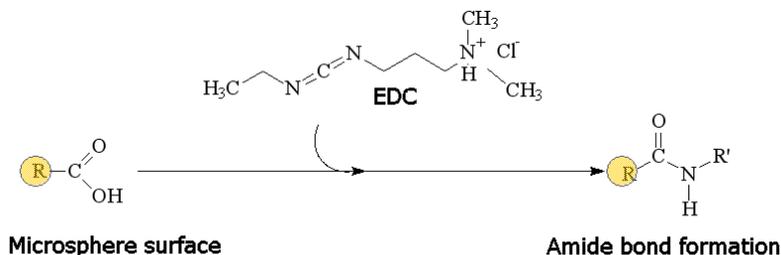


Figura 8.- Inmovilización de IgG sobre microesferas.
(R: microesfera, R': IgG)

Los análisis de las muestras por el método Luminex® para las isoformas específicas de 22 y 20 kDa hGH se llevó a cabo exclusivamente en el “Research and Development Department” de MCM. Para realizar el procedimiento analítico, alrededor de 2000 partículas de cada tipo de inmuno-microesferas de anti-20 kDa y anti-22 kDa se colocaron en cada pocillo de la placa de ensayo y estos se lavaron dos veces con 100 µL de tampón de lavado. Las muestras se diluyeron a 1:4 veces con tampón de dilución, y 75 µL de tampón de ensayo y 25 µL de cada muestra pre-diluida se alicuotaron dentro del pocillo. Las isoformas de hGH se capturaron durante la incubación en agitación continua durante 17 horas a 4°C, y luego tras la incubación, las microesferas de cada pocillo se lavaron 5 veces con 100 µL de tampón de ensayo. La segunda reacción con la respectiva isoforma de hGH capturada se realizó en agitación continua con 100 µL de Ab policlonal de cabra anti-hGH (AF1067) biotinilado en cada pocillo durante 3.5 horas a 4° C. Posteriormente se volvió a lavar la placa 5 veces y luego se añadieron a cada pocillo 100 µL de solución de conjugado

MATERIAL Y MÉTODOS

estreptavidina R-PE (diluido 50 veces antes de usarlo con 10% de BlockAce en PBS 10 mM a pH 7.4) manteniéndose en agitación durante 30 min a TA, con el objetivo de poder formar complejos de biotina-estreptavidina-fluorocromo. En las lecturas de fluorescencia, las direcciones espectrales de las microesferas se identificaron leyendo las señales a 657 nm y 720 nm con excitación a 633 nm. Simultáneamente, la inmuno-reacción se monitorizó a 580 nm con excitación a 532 nm y la respuesta del detector se acumuló para calibración en orden a cuantificar la isoforma diana.

Todos los casos en los cuales se dieron valores altos que excedían el límite de rango de cuantificación lineal fueron repetidos y evaluados por dilución de la muestra mediante el mismo tampón de ensayo.

Para estos análisis de citometría realizados en Japón con el sistema Luminex® se utilizó el sistema de detección de citometría de flujo “Multiplexed Array” Luminex® 100 Complete System de Luminex Corporation (Austin, USA). Los datos fueron evaluados por el propio software del instrumento en el laboratorio de MCM.

3.6.1.3 Inmunoensayo diferencial de isoformas FIA-TR (Diferencial Rec y diferencial Pit).

El inmunoensayo por FIA-TR se realizaba (actualmente ya no está disponible) en micro-placas que se realizó para analizar las muestras del primer ensayo clínico. Estos análisis se llevaron a cabo en el laboratorio anti-dopaje instalado en Turín (Italia) en el transcurso de los Juegos Olímpicos de invierno en el año 2006.

MATERIAL Y MÉTODOS

Esta metodología esta basada en la tecnología denominada DELFIA® (Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent Immunoassay) que a su vez se basa en la utilización de un compuesto fluorescente derivado del lantano y denominado europio como marcador de lectura que está unido a estreptavidina que a su vez forma complejo con la biotina que está unida al anticuerpo secundario. Los reactivos e inmunoensayos se prepararon en Alemania (Endocrine Research Laboratories, Medizinische Klinik Innenstadt, Ludwig-Maximilians University, Munich).

Los inmuno-ensayos FIA-TR se realizaron con los mismos anticuerpos: para el denominado kit 1, el mAb AK566 en el rec assay y el mAb AK565 en el pit assay, y para el denominado kit 2, el mAb AK568 en el rec assay y el AK567 en el pit assay. El mAb AK569 se utilizó como anticuerpo secundario o de lectura. Para marcar con biotina el anticuerpo secundario, se siguió el procedimiento habitual. La biotina-XX sulfosucinimidil ester (SSE) reacciona con aminas primarias de proteínas u otras bio-moléculas para formar conjugados estables de biotina.

Para la coatación de los mAb de captura al fondo de los pocillos de cada micro-placa respectiva, se coataron con los respectivos mAb: AK565, AK566, AK567 y AK568. En todos los casos, se disolvió cada respectivo mAb con buffer de coatación (coating buffer: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 50 mM ajustado a pH 9.6 con NaOH 1 M) con un volumen total para coatar 96 pocillos de aproximadamente 20 mL a una concentración de 50 $\mu\text{g}/20 \text{ mL}$. Se incorporó a cada pocillo mediante pipeta semi-automática 200 μL (que contenían 500

MATERIAL Y MÉTODOS

ng del respectivo mAb) de la solución, se tapo mediante film adhesivo la placa y se incubó a 4 °C durante toda la noche como mínimo. Las placas una vez coatadas se podían almacenar a 2-8 °C con un periodo máximo de 4 semanas.

Para la obtención de calibradores se realizaron diluciones a partir de los derivados hipofisarios IRP 80/505, una vez puestos en tampón de liofilización (K_2HPO_4 20.8 mM, Na-EDTA 5.4 mM, albúmina sérica bovina al 0.5%, a pH 8.0) se liofilizaron y posteriormente fueron reconstituidos con suero de oveja. Estos preparados se utilizaron como calibradores en concentraciones desde 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0 y 50.0 ng/mL.

Para las muestras utilizadas como controles se utilizó un pool de suero humano para preparar dos controles, al primero se le añadió el preparado IRP 80/505 (derivado hipofisario del NIBSC) y al segundo el preparado IRP 88/624 (hGH recombinante del NIBSC) actualmente ya fuera de catálogo y sustituido por el IRP 98/574.

Para llevar a cabo los inmunoensayos se siguió el procedimiento descrito a continuación. Se lavaron las microplacas tres veces y a continuación con tampón de lavado (Delfia® wash concentrate) preparado a partir del original concentrado diluyendo a 1:25 con agua milli-Q. Se añadió a cada pocillo de la respectiva microplaca 150 µL de tampón de ensayo (Delfia® assay buffer) y a continuación en cada pocillo de la microplaca coatada con el mAb correspondiente, 25 µL de los correspondientes calibrador, control y cada muestra respectivamente por duplicado con pipeta semi-automática. Se sellaron las microplacas con film adhesivo y se incubaron 2 horas a TA en un agitador de microplacas. Al finalizar

MATERIAL Y MÉTODOS

la incubación, las microplacas se lavaron 3 veces con el tampón de lavado y luego a continuación se añadió a cada pocillo 200 μ L de trazador (mAb AK569-biotinilado: 50 ng de mAb biotinilado por pocillo). Se sellaron las microplacas de nuevo con film adhesivo y se incubaron 2 horas a TA en un agitador de microplacas. Después de la incubación se lavaron 3 veces de nuevo con el tampón de lavado y a continuación se añadió a cada pocillo 200 μ L del conjugado estreptavidina-Europio (Delfia® Stav-Eu: preparado antes de su uso diluyendo el producto original 1:1000 con tampón de ensayo). Se sellaron las microplacas de nuevo con film adhesivo y se incubaron 30 minutos a TA en un agitador de microplacas. Después de la incubación se lavaron 6 veces de nuevo con el tampón de lavado y se añadió a cada pocillo 200 μ L de solución potenciadora. Se incubaron las microplacas sin sellarlas esta vez con el film adhesivo, durante 15 minutos en un agitador de microplacas. A continuación se midió cada microplaca en el fluorímetro con resolución de tiempo.

Las muestras se analizaron sin dilución previa. Solamente cuando se presentaron valores superiores al rango analítico del método por encima de 50 ng/mL, las muestras se diluyeron con suero de oveja para poder ser re-analizadas.

Para las lecturas de los ensayos se utilizó el lector de fluorescencia de resolución de tiempo Victor-D (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) como parte de un sistema semi-automático Delfia®. El instrumento incluía un software Multicalc para el ajuste automático de curvas y evaluación de resultados.

3.6.1.4 Inmunoensayo diferencial de isoformas ILMA (Diferencial Rec y diferencial Pit).

Los análisis se realizaron por medio del segundo inmunoensayo diferencial de isoformas basado en el método ILMA y realizado en tubo. Este inmunoensayo sustituyó al primero de FIA-TR debido a un problema de sensibilidad, puesta de manifiesto sobre todo en los ensayos “permissivos” pit. Los análisis con el inmunoensayo ILMA se llevaron a cabo tanto en el laboratorio de la “Medizinische Klinik-Innenstadt” de la Ludwig-Maximilians-University en Munich (Alemania) como en el Laboratorio de Bioanálisis del Institut Hospital del Mar d’Investigacions Mèdiques. Parc de Salut Mar) de Barcelona. Tanto en Munich como en Barcelona se utilizó el mismo instrumento para las lecturas, el luminómetro AutoLumat LB 953 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Germany) con la versión de software v 4.03 para el ajuste automático de curvas y evaluación de resultados.

Los inmuno-ensayos ILMA se realizaron con los mismos anticuerpos descritos anteriormente: para el denominado kit 1, el mAb AK566 en el rec assay y el mAb AK565 en el pit assay, y para el denominado kit 2, el mAb AK568 en el rec assay y el AK567 en el pit assay. El mAb AK569-107 se utilizó como anticuerpo secundario o de lectura.

El procedimiento de obtención de los mAb utilizados en los inmuno-ensayos ha sido descrito previamente (98). Los mAbs se generaron en ratones inmunizados con hGH recombinante o hGH de derivados hipofisarios y luego posteriormente seleccionados con respecto a sus afinidades hacia la forma de 22 kDa recombinante

MATERIAL Y MÉTODOS

(rhGH IRP 88/624 del NIBSC) o hacia la mezcla de derivados hipofisarios (phGH IRP 80/505 del NIBSC). Se identificaron 2 mAbs que mostraban un grado de reacción cruzada del 100 % para la forma de 22 kDa rhGH (mAbs AK568 y AK566) y 2 mAbs que mostraban un grado de reacción cruzada del 100 % para el derivado hipofisario phGH y con menor porcentaje 22 kDa hGH (mAbs AK567 y AK565)(284). De todos los mAbs citados solamente el mAb AK565 presentaba también un grado de reacción cruzada del 75 % para la variante de 17 kDa hGH(284). Se utilizaron estos 4 mAbs como anticuerpos de captura en los 4 inmuno-ensayos descritos (mAbs de captura para los ensayos rec y pit del kit 1 y rec y pit del kit 2). A otro anticuerpo, el mAb AK569, se le encontró que se unía tanto a la forma pura recombinante como a la mezcla de phGH con afinidad similar y por lo cual se podía usar como anticuerpo de detección en los 4 inmuno-ensayos, en combinación con los 4 anticuerpos de captura ya mencionados. Los epitopos de todos los mAbs fueron identificados por medio de experimentos de unión competitiva con un amplio espectro de variantes y fragmentos de hGH.

Para marcar con acridinio el anticuerpo secundario, 200 µg de anticuerpo purificado (anticuerpo secundario de lectura mAb AK569) en tampón fosfato 250 mM a pH 8.0, se incubaron 20 minutos a TA con 17.1 µL de acridinio, de una solución de 1 g/L en acetonitrilo haciendo un ratio molar de 1:10. La reacción se paró añadiendo Tris 1 M, volumen 1/15, y posteriormente el anticuerpo marcado se purificó para separarlo del acridinio libre con una columna Nap5 y luego mediante HPLC con la columna BioRad

MATERIAL Y MÉTODOS

Bio-Sil SEC 400-5 (tampón: 175 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 75 mM KH_2PO_4 , 0.05% NaN_3 , a pH 7.5; velocidad de flujo: 0.8 mL/min). La tasa promedio de incorporación fue de 3.8 acridinio / 1 de IgG (moléculas). El anticuerpo marcado fue liofilizado después de transferirlo a un tampón de liofilización (KH_2PO_4 16.6 mM, K_2HPO_4 33.4 mM, albúmina bovina sérica 5.5%, IgG bovina 0.41%, IgG murina 0.125%, colorante alimenticio azul 0.01%, a pH 6.5).

Para la coatación de los mAb de captura al fondo de los tubos de poliestireno, estos se coataron con los respectivos mAb:

- AK565 (2.5 μg de anticuerpo por tubo en 300 μL de tampón de coatación ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 200 mM, NaCl 100 mM, a pH 6.5)
- AK566 (1.5 μg de anticuerpo por tubo en 300 μL de tampón de coatación)
- AK567 (1.5 μg de anticuerpo por tubo en 300 μL de tampón de coatación)
- AK568 (1.5 μg de anticuerpo por tubo en 300 μL de tampón de coatación)

Se incubaron durante toda la noche a TA.

Los tubos fueron luego bloqueados con una solución de KH_2PO_4 6.5 mM y $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 3.5 mM a pH 6.5 conteniendo Karion FP al 3%, albúmina sérica bovina al 0.5% (libre de proteasa) y luego secados al vacío.

Para la obtención de calibradores y controles se siguió el siguiente procedimiento, en el caso de los calibradores las diluciones de los derivados hipofisarios del IRP 80/505 puestos en tampón de

MATERIAL Y MÉTODOS

liofilización (K_2HPO_4 20.8 mM, Na-EDTA 5.4 mM, albúmina bovina sérica al 0.5%, a pH 8.0) se liofilizaron y posteriormente fueron reconstituidos con suero ovino. Estos preparados se utilizaron como calibradores en concentraciones desde 0.1, 0.3, 0.9, 2.7, 8.1, 24.3 hasta 48.6 ng/mL.

Las muestras utilizadas como controles se produjeron por adición de las preparaciones de referencia IRP 80/505 (para hGH hipofisaria o “control negativo”) o IRP 80/505 e IRP 88/624 (para una mezcla de preparado hipofisario y hGH recombinante o “control positivo” al tampón de liofilización (K_2HPO_4 20.8 mM, Na-EDTA 5.4 mM, albúmina sérica bovina al 0.5%, a pH 8.0). Antes de usar, los controles liofilizados fueron diluidos o reconstituidos con suero humano libre de hGH.

Para realizar los inmuno-ensayos se colocó en cada tubo coitado correspondiente (rec/pit kit 1 y rec/pit kit 2) 50 μ L de calibrador, control y muestra respectivamente por duplicado con pipeta semi-automática y a continuación se añadió a cada tubo 150 μ L de tampón de incubación de muestra (PBS 1X con KH_2PO_4 10 mM, K_2HPO_4 20 mM, Na-EDTA 10 mM, BSA 0.5%, NaN_3 0.09%, IgG bovina 0.1%, IgG de ratón 0.05%, IgG de oveja 0.1%, IgG de conejo 0.05%, y 0.005% de colorante amarillo para comida, a pH 9.0. Estos tubos se incubaron en agitación horizontal constante (~ 300 r.p.m.) en un agitador horizontal durante 2 horas a TA. Al finalizar la incubación, los tubos se lavaron 5 veces con 1 mL de tampón de lavado (Tris 8 mM, NaCl 0.06 M, Tween-20 al 0.02%, agente anti-espumante al 0.0002%), y luego a continuación se añadió a cada tubo 200 μ L de trazador (mAb AK569/10A7-

MATERIAL Y MÉTODOS

acridinio: 5 ng de anticuerpo marcado por tubo) reconstituido con tampón denominado como “tampón R” (KH_2PO_4 83.3 mM, K_2HPO_4 166.7 mM, Na-EDTA 10 mM, NaCl 100 mM, NaN_3 al 0.09%, a pH 6.5) y se incubaron los tubos de nuevo en agitación horizontal constante (~ 300 r.p.m.) en un agitador horizontal durante 2 horas a TA. Después de la incubación como paso final los tubos se lavaron de nuevo con 1 mL de tampón de lavado 5 veces. Posteriormente los tubos fueron leídos mediante la adición de 2 reactivos, solución ácida H_2O_2 y solución básica NaOH (Basiskit reactivo 1 y 2) para generar la señal de luz (RLU: Relative Luminescence Units) en el luminómetro (1 segundo de medición por tubo).

Las muestras se analizaron sin dilución previa. Solamente cuando se presentaron valores superiores al rango analítico del método, las muestras se diluyeron con suero de oveja para poder ser re-analizadas.

3.6.1.5 Inmunoensayo de GH por quimioluminiscencia.

Los niveles de suero de hGH de los dos ensayos clínicos también se analizaron mediante un ensayo quimio-luminiscente inmuno-métrico de fase sólida, de dos lugares de unión, por medio del kit comercial GH que se analizó en el instrumento Immulite-1000 (Siemens-DPC, Los Angeles, USA). Esta medición se realizó para poder disponer de otros valores alternativos realizados mediante un kit comercial fácilmente disponible y muy utilizado en el ámbito

MATERIAL Y MÉTODOS

clínico-hospitalario para poder proporcionar una información alternativa comparativa. Los datos de este ensayo proporcionados por el fabricante eran, precisión intra-ensayo 5.3–6.5 %, precisión inter-ensayo 5.5 – 6.2 %, rango de calibración hasta 40 µg/L, sensibilidad de 0.01 µg/L.

El fabricante da información al respecto de la reactividad cruzada que presenta la isoforma de 20 kDa hGH en el método Immulite. Esta fue probada y se encontró que llegaba hasta el 63 %. Las muestras se analizaron sin dilución previa. Solamente cuando se presentaron valores superiores al rango de calibración del método por encima de 40 µg/L, las muestras se diluyeron con el diluyente proporcionado al efecto por el fabricante para poder ser re-analizadas.

3.6.2 Métodos utilizados en la estrategia indirecta. Marcadores biológicos.

3.6.2.1 IGF-I.

La IGF-I fue analizada mediante un método inmunométrico quimioluminiscente marcado enzimáticamente, de fase sólida. Se analizaron mediante el instrumento automático Immulite-1000. El primer Ab utilizado era un mAb de origen murino anti-IGF-I, coatado a una partícula (fase sólida) y un segundo Ab policlonal obtenido de conejo anti-IGF-I conjugado a fosfatasa alcalina.

MATERIAL Y MÉTODOS

La determinación de IGF-I total requiere un pre-tratamiento de la muestra para poder liberar la IGF-I del complejo denominado “ternario” formado por IGF-I / IGF BPs mayoritariamente IGFBP 3 / ALS) presente en la circulación sanguínea, siendo la reducción eficiente de las interferencias que puedan producir las IGF BPs.

Las interferencias con las IGF BPs se solventan normalmente tratando previamente los sueros con un ácido necesario para liberar la IGF-I, como paso previo, para posteriormente neutralizar los lugares de unión de las IGF BPs con un exceso de IGF-II. En el caso de la IGF-I analizada por Immulite-1000, las muestras se prediluyeron con un tampón de pre-tratamiento proporcionado por el fabricante sin que este especificara la naturaleza del diluyente, solamente informando de que se trataba de un tampón con matriz libre de IGF-I. Las muestras se diluyeron según las instrucciones del fabricante en la siguiente proporción, 25 μ L de suero y 225 μ L de diluyente. El instrumento corregía automáticamente el resultado teniendo en cuenta la dilución.

Los valores esperados en relación con la edad de los sujetos eran, entre 21-25 años 116-358 μ g/L, entre 26-30 años 117-329 μ g/L, entre 31-35 años 115-307 μ g/L, entre 36-40 años 109-284 μ g/L. Los datos de este ensayo proporcionados por el fabricante eran, sensibilidad analítica 20 μ g/L, precisión intra-ensayo 2.3–3.9 %, precisión inter-ensayo 4.7 – 8.1%). Los análisis de IGF-I se realizaron siguiendo en todo momento las instrucciones del fabricante.

3.6.2.2 IGF BP-3.

Los niveles en suero del marcador IGF BP-3 se analizaron mediante un método inmunométrico quimioluminiscente marcado enzimáticamente, de fase sólida. Este kit comercial se analizó utilizando el analizador Immulite-1000. Las muestras se tuvieron que pre-diluir con un diluyente proporcionado por el fabricante sin que este especificara la naturaleza del diluyente, solamente informando de que se trataba de una solución de matriz proteica en solución tampón sin anticuerpo anti-IGF BP-3. Las muestras se diluyeron según las instrucciones del fabricante en la siguiente proporción, 10 μ L de suero y 1000 μ L de diluyente (dilución 1:101). El instrumento corrige automáticamente el resultado teniendo en cuenta la dilución efectuada.

Los valores esperados eran, entre 21-25 años 3.4-7.8 mg/L, entre 26-30 años 3.5-7.6 mg/L, entre 31-35 años 3.5-7.0 mg/L, entre 36-40 años 3.4-6.7 mg/L. Los datos de este ensayo proporcionados por el fabricante eran, sensibilidad analítica 0.1 mg/L, precisión intra-ensayo 7.5-9.9 %. Estos análisis se realizaron siguiendo en todo momento las instrucciones del fabricante.

3.6.2.3 P-III-NP.

Las mediciones del marcador P-III-NP en este trabajo se llevaron a cabo mediante el kit de RIA (Orion Diagnostica, Espoo, Finlandia). Los valores esperados en relación con la edad de los sujetos eran, entre 2.3 y 6.4 μ g/L. Los datos de este ensayo proporcionados por el fabricante eran, sensibilidad analítica 0.3 μ g/L, precisión intra-

MATERIAL Y MÉTODOS

ensayo 3.0-7.0 %, precisión inter-ensayo 4.5-7.2 %. El rango analítico era de 1.0 a 50.0 µg/L. Los tubos del RIA para este marcador se contaron en el contador de centelleo y las cuentas por minuto (c.p.m.) proporcionadas por el instrumento tanto en la curva de calibradores utilizados, como controles, y muestras se procesaron directamente por el software del instrumento utilizando el ajuste de curva polinómico tipo “spline”. Los análisis de P-III-NP se realizaron siguiendo en todo momento las instrucciones del fabricante.

Para las lecturas de RIA se utilizó el contador de centelleo "1470 Wizard gamma scintillation" del fabricante Perkin Elmer (PerkinElmer, Boston, USA). Los resultados se procesaron mediante el propio software del instrumento RiaCalc WIZ.

3.7 Análisis estadístico.

3.7.1 Estrategia directa.

Para cuantificar el nivel de concordancia de los métodos analíticos, se realizaron el denominado test de Bland-Altman (B.A.)(293) y para conocer la dependencia lineal de un método respecto a otro el test de correlación de Pearson (P.r.).

El test B.A. se basa en evaluar el nivel de concordancia entre dos métodos analíticos y compara las diferencias entre las mediciones realizadas respectivamente con cada par de variables de cada uno de los dos métodos, frente a la media aritmética de las dos mismas mediciones. Con este test B.A. también se han obtenido límites de concordancia a partir del cálculo del intervalo de confianza (IC) de

MATERIAL Y MÉTODOS

1.96 desviaciones estándar que incluye el 95% de las diferencias observadas. Las diferencias observadas se han expresado en porcentajes (%). El test de B.A. se llevó a cabo con el software estadístico específico para análisis clínicos “Analyse-it” (Analyse-it Software Ltd., Leeds, UK).

La correlación P.r. nos da una medida de la dependencia lineal entre dos grupos de variables pertenecientes cada grupo a cada uno de los dos métodos comparados y se ha aplicado para conocer el grado de la fuerza de la dependencia lineal entre estos dos grupos de variables. Los coeficientes de correlación P.r. y sus intervalos de confianza del 95% se calcularon con el paquete estadístico de software R de la “R Foundation for Statistical Computing, R Development Core Team 2008” (Viena, Austria, <http://www.R-project.org>).

Los valores inferiores al límite de cuantificación (LOQ), así como también los valores superiores al rango lineal del método, estos últimos solamente aquellos que no pudieron ser cuantificados con exactitud por motivos de interferencia analítica, fueron automáticamente excluidos por los respectivos software de cálculo estadístico, tanto en el caso del test de B.A. como para la correlación P.r.

Los parámetros farmacocinéticos se estimaron utilizando el programa de Microsoft Excel versión 11.0, con los archivos anexados específicos para farmacocinética denominados Pk1 y Pk2.

3.7.2 Estrategia Indirecta

Para poder asegurar la correcta aplicación de la fórmula discriminante obtenida mediante el proyecto GH-2000, todos los resultados previamente fueron transferidos matemáticamente a la misma metodología analítica que se utilizó en su día en el proyecto GH-2000, es decir los métodos analíticos de “Institute Nichols” para IGF-I y los de CIS Biointernational (Oris Industries, Gif-sur-Yvette, France) para P-III-NP. Para esta conversión se utilizaron trabajos de correlación de métodos publicados previamente, tanto en la conversión de datos para pasar los del método Immulite IGF-I a RIA IGF-I de Nichols Institute Diagnostics(294) y del método RIA P-III-NP de Orion Diagnostica (Espoo, Finlandia) a RIA P-III-NP de CIS-Biointernational (Oris Industries, Gif-sur-Yvette, France)(291). Después de la aplicación de la fórmula discriminante del proyecto GH-2000 se realizó un nuevo análisis estadístico para obtener con nuestros propios datos una nueva fórmula discriminante distinta de la del proyecto GH-2000 utilizando para ello el programa SPSS software versión 12.0 (SPSS Inc, Chicago, USA). Las diferencias entre los valores correspondientes a diferentes tiempos con respecto a los valores basales obtenidos para los diferentes biomarcadores analizados se evaluaron mediante el test de Wilcoxon realizado con el programa SPSS software versión 12.0 (SPSS Inc, Chicago, USA). La evaluación de la capacidad de distinguir entre los valores correspondientes a sujetos no tratados (sujetos blanco no tratados o bien los valores de sujetos antes de iniciar el tratamiento con rhGH) y los sujetos tratados (valores de sujetos ya una vez iniciado el tratamiento con rhGH) se realizó utilizando un

MATERIAL Y MÉTODOS

análisis lineal discriminante obteniéndose una función matemática por medio de las concentraciones convertidas al valor del logaritmo natural y teniendo en cuenta la edad expresados sus valores en escala reciproca. Los marcadores discriminantes ajustados con la edad (“D-score”) se calibraron con los valores obtenidos de las muestras poblacionales ya descritas como referencia. La formula estandarizada era la definida como en que la media de esta población de referencia elegida era 0 y la S D era 1.

Para el análisis de los marcadores biológicos IGF-I, P-III-NP e IGFBP 3 no se presentaron ni valores inferiores ni valores superiores al rango linear de cada método.

Capítulo 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de esta tesis se han publicado respectivamente en:

Tracking growth hormone abuse in sport: a comparison of distinct isoform-based assays. Bosch J, Ueki M, Such-Sanmartín G, Segura J, Gutiérrez-Gallego R. *Anal Chim Acta.* 2012; 733:56-63.

PMID: 22704376

Tracking growth hormone abuse in sport: Performance of marker proteins in a controlled setting. Bosch J, Such-Sanmartín G, Segura J, Gutiérrez-Gallego R. *Anal Chim Acta.* 2012; 745C:118-23.

PMID: 22938615

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Caracterización de Abs implicados en los inmunoensayos utilizados.

4.1.1 Generalidades.

La caracterización de los Abs implicados en los inmunoensayos de variantes para la detección del abuso de hGH en el deporte se realizó para intentar comprender mejor los como funcionan de estos ensayos. Aun que se han caracterizado una treintena de Abs específicos contra la hGH, muchos de los cuales no estan disponibles comercialmente o incluso aun en fase de desarrollo, dentro del contexto de esta tesis la caracterización solamente se limitó a los Abs implicados en los inmunoensayos, el diferencial de variantes rec y pit, (Abs de captura mAbs AK565-AK566 para el kit 1 y AK567-AK568 para el kit 2, y con el mAb secundario AK569 para los cuatro inmunoensayos), y los inmunoensayos específicos de variantes de 22 kDa y 20 kDa hGH (Abs de captura mAbs A36020047P, que a partir de ahora solamente se le denominará como mAb A36, y el mAb D05). El Ab policlonal AF1067 utilizado actualmente como secundario o de detección en este ultimo inmunoensayo, tanto en el método ELISA como en el método Luminex®, fue el único que no se caracterizo. Su fuente es comercial (R&D Systems, Techne Corporation, Minneapolis, USA) y sus características policlonales le conferían según la información del fabricante características de amplia especificidad tanto para la variante de 22 kDa como para la variante de 20 kDa. En estos dos inmunoensayos desarrollados en Tokio, inicialmente se utilizó como Ab secundario un mAb IgG₁ de ratón denominado A1-549

fabricado por Bioclone Australia Pty Limited (Sydney, Australia), de amplia especificidad. De este Ab se comprobó su amplia especificidad tanto para la variante de 22 kDa como la de 20 kDa hGH. Posteriormente fue sustituido en Japón por otro Ab de producción propia (al igual que el mAb D05) denominado mAb D14 (134) con similares características. Un tiempo después de nuevo se sustituyó el mAb D14 por este actual Ab policlonal AF1067.

En general las características de estos Abs (A1549, D14 y AF1067) eran de amplia especificidad con igual reconocimiento para las dos variantes (22 y 20 kDa) con los cual dada la selección realizada por los Abs de captura A36 y D05 era completamente efectivo se considero por lo tanto no realizar la caracterización de este Ab policlonal. En concreto los Abs A1-549 y AF1067 fueron considerados adecuados en Japón para ser utilizados como Abs secundarios en este tipo de inmunoensayos selectivos. En trabajos previos en Tokio para estos inmunoensayos ya fueron probados ambos Abs tanto en ELISA para 22 kDa hGH (ver figura 9) como 20 kDa hGH (ver figura 10) y en concreto el Ab policlonal AF1067 mostró mejor sensibilidad que el mAb A1-549 por lo que fue finalmente seleccionado.

Para una mejor aclaración y comprensión los resultados de la caracterización se describirá en dos bloques, el primero será el que concierne a aquellos Abs que resultaron específicos contra únicamente una sola variante de la hGH con lo cual conferían al inmunoensayo unas características muy concretas de especificidad.

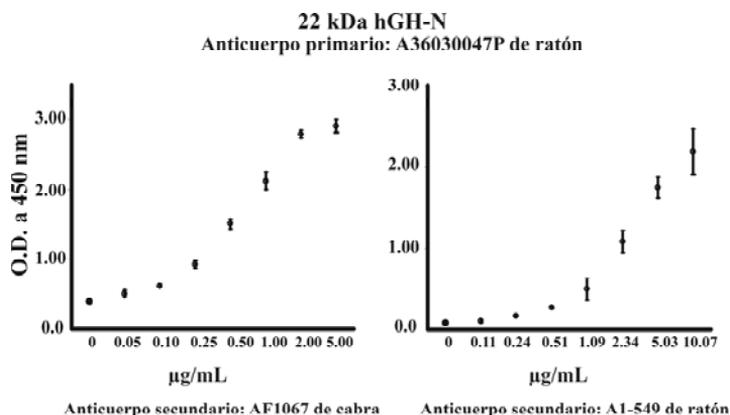


Figura 9.- Los Abs A1-549 y AF1067 comparados en una curva de dosis-respuesta de concentraciones crecientes de la variante de 22 kDa hGH.

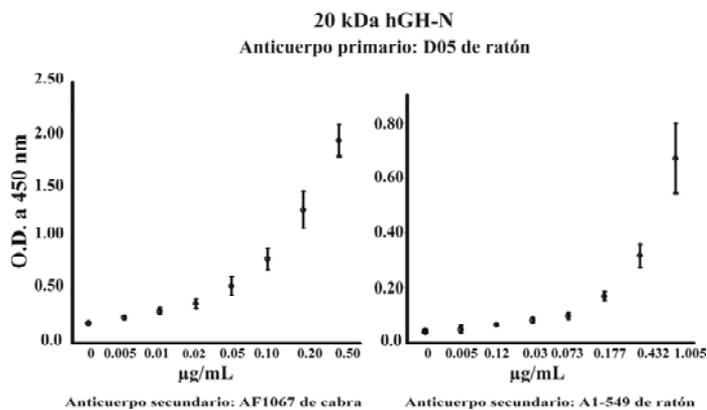


Figura 10.- Los Abs A1-549 y AF1067 comparados en una curva de dosis-respuesta de concentraciones crecientes de la variante de 20 kDa hGH.

En el segundo bloque se presentaran los Abs que resultaron no específicos y que reconocían a más de una variante de la hGH.

Esta parte del trabajo con SPR se llevó a cabo con cada Ab inmovilizado en la superficie de un FC de un chip-sensor por medio

de acoplamiento por grupos amino (ver apartado de Material y métodos). Este enfoque de fijación de Ab no era el mismo del que se utilizó posteriormente en el formato definitivo de los inmunoensayos. No obstante, ambos enfoques si coincidían en que estaban basados en la inmovilización aleatoria de las proteínas a una superficie y por lo tanto se consideró que los resultados del estudio de SPR se podían extrapolar al comportamiento del formato final.

En el primer bloque de resultados hay tres Abs que resultaron claramente específicos, el mAb A36 específico para la variante de 22 kDa hGH, el mAb D05 específico para la variante de 20 kDa hGH y el mAb AK 569 específico también para la variante de 22 kDa hGH. En el caso de los dos primeros la especificidad representaba algo esperable dado el enfoque de los inmunoensayos para lo que eran utilizados. En el caso del tercer Ab si representaba algo inesperado. Este mAb AK569 es el utilizado como Ab secundario o de detección en los inmunoensayos diferenciales de variantes moleculares de hGH, los ensayos denominados rec y pit.

En el segundo bloque de resultados el resto de Abs eran claramente no específicos, los mAbs AK566, AK565, AK568 y AK567.

Se utilizaron para la caracterización de los diferentes Abs distintos analitos, tanto de origen hipofisario humano como de origen DNA recombinante que eran en algún caso secuencialmente idénticos, o bien similares o equivalentes a los secretados por la glándula humana de la hipófisis en otros casos. Se incluyeron variantes moleculares de la hGH de distinto PM como 5, 17, 20, y 22 kDa. En el caso de las variantes de 22 y 20 kDa hGH en condiciones

fisiológicas se presentan en una ratio de 90:10, respectivamente en circulación sanguínea periférica (31;32). También se utilizaron proteínas relacionadas con hGH como hLP, hPRLy GHBP entre otras, tal como está descrito con detalle en el apartado de material y métodos.

El análisis de los distintos Abs implicados en los diferentes inmunoensayos incluyó el establecimiento de parámetros cinéticos y termodinámicos, evaluación del grado de reactividad cruzada de los Abs hacia los diferentes analitos probados y el estudio del efecto de mezclas bien definidas en el reconocimiento de la reactividad cruzada de los Abs.

Todos los Abs utilizados en esta parte del estudio fueron inmovilizados utilizando condiciones muy similares de concentración de Ab durante la inmovilización y condiciones de tampón y pH (ver apartado de material y métodos) llegándose a alcanzar niveles de inmovilización similares en valores de RU. Con tal de poder comparar mejor las respuestas de las distintas interacciones que se presentaron, se utilizaron las mismas concentraciones en los diferentes analitos inyectados (200 ng/mL) concentración que se escogió teniendo en cuenta los criterios de obtener una clara respuesta en un análisis directo, evitar la saturación en una inyección directa de material, y permitir una correcta regeneración después de la inyección.

Esta concentración de 200 ng/mL, no significaba representar condiciones fisiológicas y era equivalente a ~ 9 nM para el caso de 22 kDa hGH, 20 kDa hGH, hPRL y hPL. En el caso de la variante

de 5 kDa hGH equivalía a ~ 39 nM mientras que en el caso de la variante de 17 kDa equivalía a ~ 12 nM.

En un esquema muy general de los sensorgramas obtenidos mediante SPR, de las interacciones entre las variantes de hGH o proteínas análogas relacionadas y los diferentes Abs inmovilizados, se muestran en la figura 11.

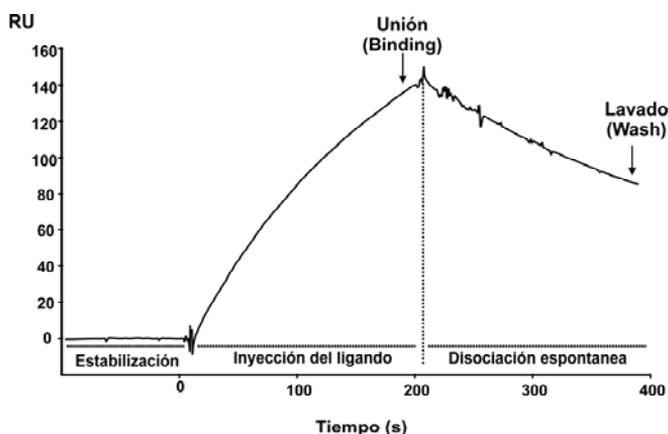


Figura 11.- Sensorgrama típico de SPR con las distintas fases de estabilización (pre-inyección), inyección del ligando y fase de disociación indicadas en la figura. También se indican los puntos en el sensorgrama en los que se han tomado las lecturas de RU para comparar la respuesta de los diferentes Abs y entre los distintos analitos.

El concepto de respuesta teórica máxima (R_{max}) se utiliza en SPR para conocer con antelación cual sería la máxima respuesta que se puede obtener a niveles de saturación para cada analito y cada Ab según haya sido su nivel de inmovilización. También da una ligera idea de conocer si en el proceso de inmovilización las características del Ab han permitido una orientación correcta de este.

Esta respuesta de R_{max} se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$R_{max} = [M \text{ analito} : M \text{ ligando}] \times \text{nivel INM} \times \text{STQ};$$

donde en este caso, M analito representa el peso molecular de la variante de 22 kDa de hGH, el M ligando representa el peso molecular del Ab inmovilizado, el nivel INM representa el valor en RU del nivel de inmovilización obtenido y STQ la ratio estequiométrica de la interacción.

4.1.2 Resultados generales.

Se caracterizaron los mAb de los dos “rec assays” AK566 y AK568, los mAb de los dos “pit assay” AK565 y AK567, el mAb secundario AK569 utilizado indistintamente en los dos “rec assays” y los dos “pit assays”, el mAb comercial A36 utilizado en los inmunoensayos de ELISA y Luminex para la medición de la variante de 22 kDa hGH, y finalmente el mAb D05 utilizado en los inmunoensayos de ELISA y Luminex para la medición de la variante de 20 kDa hGH.

Un mAb policlonal IgG (H+L) anti-ratón obtenido de cabra se utilizó para obtener información en cada análisis de las uniones no específicas (NSB) de cada uno de los analitos utilizados. Las lecturas RU del FC1, siempre utilizado para las NSB, fueron muy estables sin que apenas se resintieran las superficies de los distintos chips utilizados en el estudio, superficies sometidas a condiciones de regeneración a pesar de que no se hubieran dado interacciones

específicas en los sucesivos análisis llevados a cabo. Este mAb se inmovilizó siempre en el canal de flujo (FC) 1 del instrumento BiaCore 3000 de SPR y con ello se obtuvo la señal en RU representativa de NSB que fue sustraída a la obtenida en cada uno de los otros canales FC2, FC3 y FC4, para los correspondientes Abs inmovilizados. Con ello se utilizaron señales correspondientes para cada canal: FC 2 – FC 1, FC 3 – FC 1 y FC 4 – FC 1.

Todas las variantes de hGH y proteínas análogas que mostraron algún mínimo de interacción hacia los Abs fueron analizadas para obtener parámetros cinéticos. En resumen, todos los experimentos se realizaron a dos diferentes velocidades de flujo, 20 $\mu\text{L}/\text{minuto}$ y 40 $\mu\text{L}/\text{minuto}$ para evaluar la presencia de limitación de transporte de masa. Se utilizaron al menos 5 diferentes concentraciones (en muchos casos se emplearon hasta ocho) para la determinación de los parámetros cinéticos (295).

Los datos cinéticos obtenidos se ajustaron según el modelo de unión “1:1 de Langmuir” para determinar las velocidades de asociación y disociación (K_a y K_d) y con ellas las constantes de asociación y disociación (K_A y K_D) para encontrar la aproximación más convergente. Con los datos ya ajustados, también se chequearon utilizando otros modelos de aproximación del propio programa de cálculo de BiaCore. También se calcularon las respuestas máximas para cada Ab inmovilizado según la fórmula ya descrita(289).

Ya que la interacción con las distintas variantes de 22 kDa (incluyendo el material hipofisario IRP WHO 80/505) mostraron modelos de unión muy parecidos, las interacciones para calcular los parámetros de cinética se presentan únicamente con el producto

farmacéutico Genotonorm® (22 kDa hGH). Un ejemplo de experimentos de este tipo con SPR se incluye en la figura 12.

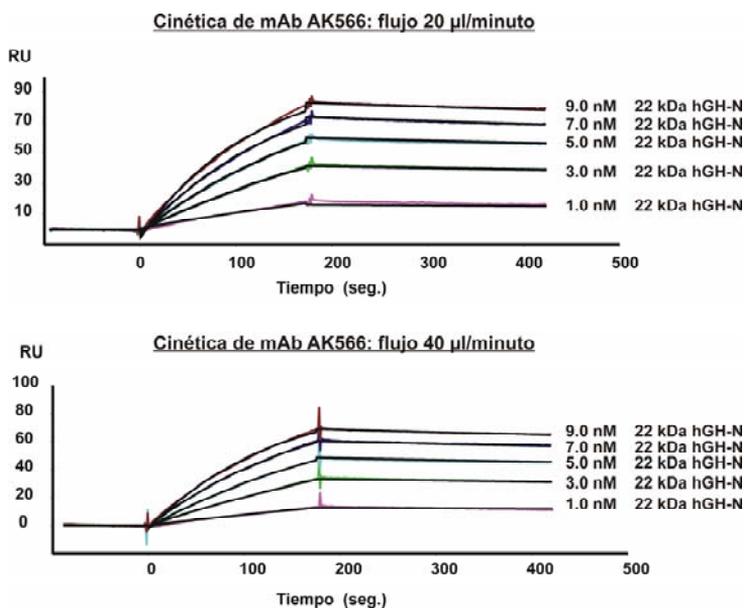


Figura 12.- Determinación de parámetros cinéticos de la interacción entre la variante recombinante de 22 kDa hGH y el mAb AK566. Los experimentos se realizaron a velocidades de flujo de 20 (panel superior) y 40 µl/min (panel inferior) y a 5 diferentes concentraciones. Las cinco curvas en cada uno de los paneles corresponde a distintas concentraciones y el ajuste teórico se sobre impone en color negro.

4.1.3 Abs específicos.

Tres Abs presentaron reacciones claramente específicas bien contra la variante de 22 kDa hGH o bien contra la variante de 20 kDa hGH.

Los valores en RU de respuesta absoluta para estos Abs, justo al finalizar la inyección, y justo antes de la regeneración de la

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

superficie, se reflejan en la tabla 9 y los valores relativos en porcentaje sobre la máxima respuesta se reflejan en la tabla 10.

Tabla 9.- Resumen de las interacciones entre las diferentes variantes de la hGH y otras proteínas análogas con los Abs específicos. La columna mAb indica el Ab inmovilizado y la columna RU indica el nivel de inmovilización del mAb en la superficie. Las abreviaturas ya han sido detalladas previamente. Los analitos fueron inyectados a una concentración de 200 ng/mL. Las lecturas enmarcadas en color gris corresponden a la lectura más alta observada. La columna A corresponde a la lectura en fase de asociación y la columna B corresponde a la lectura en fase de disociación. Resultados expresados en RU.

mAb	RU	phGH		22 kDa hGH		22 kDa Geno®		17 kDa		5 kDa		
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	
AK569	9251	1022	1012	686	688	871	874	25	24	3	2	
A36	13053	186	187	435	434	502	509	8	9	-3	-2	
D05	16835	8	3	10	3	5	0	5	2	7	2	
	20 kDa hGH		22 kDa hGH-V		20 kDa hGH-V		rhPRL		hPL Aff.		hPL NIBSC	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
AK569	2	1	153	150	2	1	2	1	4	3	4	3
A36	-3	-2	197	187	-2	-1	-2	-1	16	13	-1	-1
D05	37	31	9	3	5	1	5	3	7	2	5	2

Las abreviaturas utilizadas en la tabla son: para el material hipofisario IRP 80/505 del NIBSC (phGH)(296); para la variante recombinante de 22 kDa IRP 98/574 del NIBSC (22 kDa hGH)(297).

Para la variante recombinante de 22 kDa farmacológica Genotonorm® (22 kDa Geno®); para la variante de 17 kDa de origen proteolítico (17 kDa)(52); para la variante de 5 kDa de síntesis química (5 kDa)(50); para la variante recombinante de 20 kDa de origen hipofisario (20 kDa hGH)(68); para la variante

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

recombinante de 22 kDa de origen placentario (22 kDa hGH-V); para la variante recombinante de 20 kDa de origen de placentario (20 kDa hGH-V); para la prolactina humana recombinante (rhPRL); para el lactógeno placentario de origen humano purificado de Affiland (hPL Aff.); para el lactógeno placentario de origen humano purificado de NIBSC (hPL NIBSC).

Tabla 10.- Resumen de interacciones entre las diferentes variantes de la hGH y otras proteínas análogas con los distintos Abs expresadas como percentiles relativos con respecto a la respuesta observada más elevada (valores enmarcados en color gris en la tabla anterior 9). La columna mAb indica los mAbs inmovilizados. Las abreviaturas son las ya descritas. La columna A corresponde a lectura en fase de asociación y la columna B en fase de disociación. Resultados expresados en %.

mAb	phGH		22 kDa hGH		22 kDa Geno®		17 kDa P		5 kDa S			
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B		
AK569	100	99	67	67	85	86	2	2	0	0		
A36	37	37	85	85	100	99	2	2	-1	0		
D05	22	8	27	8	14	0	14	5	19	5		
mAb	20 kDa hGH		22 kDa hGH-V		20 kDa hGH-V		rhPRL		hPL Aff.		hPL NIBSC	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
AK569	0	0	15	15	0	0	0	0	0	0	0	0
A36	-1	0	39	37	0	0	0	0	3	3	0	0
D05	100	84	24	8	14	3	14	8	19	5	14	5

La columna A corresponde a la lectura en fase de asociación o binding; la columna B corresponde a la lectura en fase de disociación o lavado.

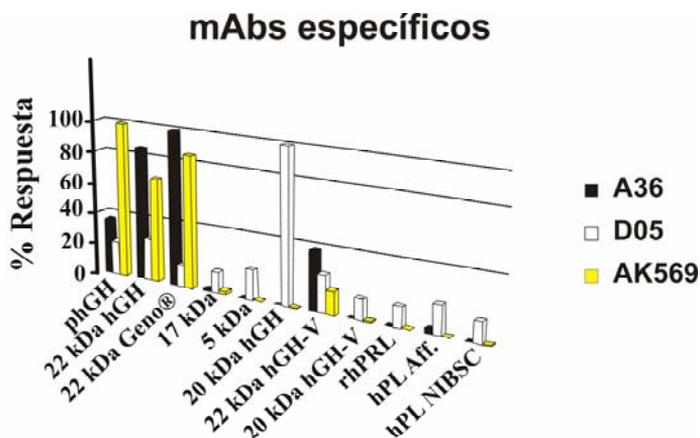


Figura 13.- Gráfico de los Abs que resultaron específicos para una sola variante de hGH. Las barras verticales corresponden a los valores de respuesta dados en percentiles (en relación a la respuesta obtenida más elevada) en el eje de ordenadas. En el eje de abscisas se representan los respectivos analitos interaccionados, cuyas abreviaturas ya se han definido anteriormente.

Las barras representadas en la gráfica corresponden a los puntos de lectura de cada sensorgrama en el momento de finalizar la inyección (tabla 10, columna A). En el caso del mAb D05 esto hace que en el gráfico (figura 13) parezca que tiene respuestas de ~ 20-28 % pero estas RU se desvanecen hasta valores muy bajos después de 3 minutos de lavado (ver tabla 10, columna B).

Los experimentos de cinética realizados para estos Abs dieron los resultados que se exponen para cada analito en las tablas 11 (para K_a y K_d) y 12 (para K_A y K_D).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 11.- Constantes de velocidad de asociación y disociación (K_a y K_d) de los mAbs AK569, A36 y D05 según los distintos analitos probados. Las casillas marcadas con guiones no se han realizado debido a los bajos niveles de respuesta absoluta obtenidos durante el análisis de interacciones simples. Los analitos 20 kDa hGH-V, hPRL y la variante de 5 kDa no constan en la tabla debido a que no se realizaron cinéticas en ningún caso por las insuficientes respuestas observadas en interacciones simples. Las unidades vienen dadas en $1/M\ s$ ($M^{-1}\ s^{-1}$) para K_a y $1/s$ (s^{-1}) para K_d .

MATERIAL HIPOFISÁRIO								
	phGH IRP 80/505		22 kDa hGH IRP 98/574		20 kDa hGH Recombinante		17 kDa Proteólisis	
	K_a	K_d	K_a	K_d	K_a	K_d	K_a	K_d
AK569	$1.1E^6$	$1.2E^{-4}$	$3.2E^5$	$1.0E^{-4}$	-----	-----	$2.9E^4$	$2.4E^{-4}$
A36	$4.6E^5$	$1.3E^{-4}$	$5.3E^5$	$1.1E^{-4}$	-----	-----	$1.1E^3$	$1.7E^{-6}$
D05	-----	-----	-----	-----	$2.1E^5$	$9.6E^{-4}$	-----	-----

MATERIAL PLACENTARIO						
	22 kDa hGH-V recombinante		hPL Aff.		NIBSC	
	K_a	K_d	K_a	K_d	K_a	K_d
AK569	$3.1E^3$	$3.4E^{-4}$	-----	-----	-----	-----
A36	-----	-----	-----	-----	-----	-----
D05	-----	-----	-----	-----	-----	-----

En la figura 14 se pueden observar las interacciones más relevantes por SPR de estos tres mAbs, el mAb AK569 que actúa como secundario en los kits 1 y 2 para los inmunoensayos diferenciales de isoformas de hGH (figura 14, parte A) y los mAbs de captura o primarios utilizados en los ensayos ELISA y Luminex® específicos para las isoformas de 22 kDa hGH, el mAb A36 y 20 kDa hGH, el mAb D05 (figura 14, parte B y figura 14, parte C).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 12.- Constantes de asociación y disociación (K_A y K_D) de los mAbs AK569, A36 y D05 según los distintos analitos probados. Las casillas marcadas con guiones no se han realizado por los motivos expuestos en la anterior tabla. Las cinéticas de los analitos 20 kDa hGH-V, rhPRL y la variante de 5 kDa no constan en la tabla por los motivos expuestos en la tabla anterior. Las unidades vienen dadas en $1/M$ (M^{-1}) para K_A y M para K_D . El mAb A36 corresponde al clon n° A36020047P.

MATERIAL HIPOFISÁRIO								
	phGH		22 kDa hGH		20 kDa hGH		17 kDa	
	IRP 80/505		IRP 98/574		Recombinante		Proteolisis	
	K_A	K_D	K_A	K_D	K_A	K_D	K_A	K_D
AK569	$9.2E^9$	$1.1E^{-10}$	$3.2E^9$	$3.1E^{-10}$	-----	-----	$1.2E^8$	$8.3E^{-9}$
A36	$3.5E^9$	$2.8E^{-10}$	$4.8E^9$	$2.1E^{-10}$	-----	-----	$6.5E^8$	$1.5E^{-9}$
D05	-----	-----	-----	-----	$2.2E^8$	$4.6E^{-9}$	-----	-----

MATERIAL PLACENTARIO						
	22 kDa hGH-V		hPL			
	recombinante		Affiland		NIBSC	
	K_A	K_D	K_A	K_D	K_A	K_D
AK569	$9.1E^6$	$1.1E^{-7}$	-----	-----	-----	-----
A36	-----	-----	-----	-----	-----	-----
D05	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Para estos tres mAbs la especificidad estricta que se presento fue obvia indicando que solamente se reconocían las isoformas que en un principio eran su objetivo inicial para el caso de los mAbs A36 y D05, y en el caso del mAb AK569, la especificidad que se presentaba no era tan esperada pero no obstante era muy clara.

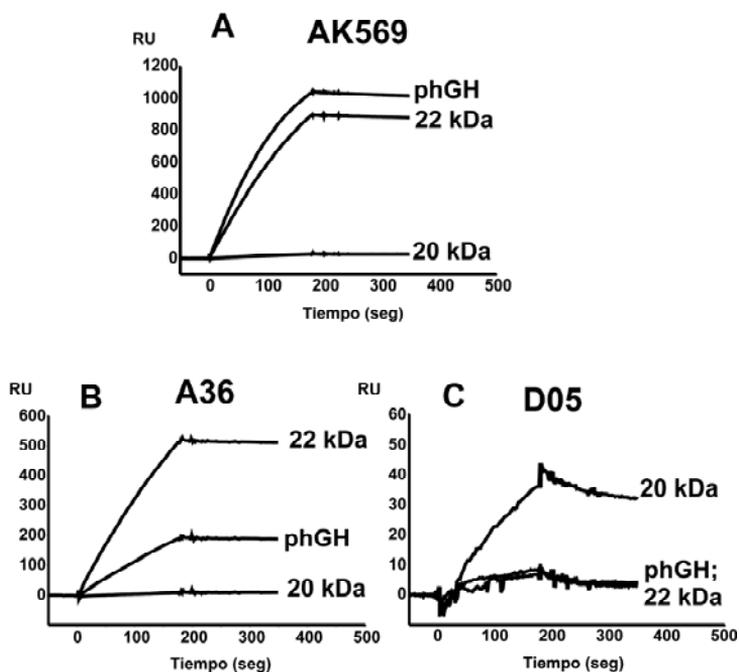


Figura 14.- Sensorgramas de las interacciones de los tres mAbs específicos obtenidas por SPR. En el eje de ordenadas se muestran las respuestas en unidades de resonancia (RU), en el eje de abcisas el tiempo en segundos. Los analitos que constan en el grafico son solamente aquellos que presentaban interacciones más claras habiéndose prescindido de aquellos con interacción baja o nula y también del material placentario. Las abreviaturas de cada analito son las que ya se han descrito anteriormente.

4.1.3.1 mAb AK569.

El mAb AK569 es el Ab secundario que se utilizó en los inmunoensayos diferenciales de variantes de hGH. Este Ab, como tal, se le consideraba un Ab que no necesariamente debía mostrar buenas propiedades de unión a la superficie dado su uso como Ab en solución. Se obtuvieron unos niveles de inmovilización muy

buenos (a una densidad de 9251 RU, equivalente a unos 9 ng por mm^2) y los niveles absolutos de unión con distintos analitos fueron sorprendentemente elevados. Los niveles de unión más elevados se obtuvieron con el material de referencia hipofisario del NIBSC, el IRP 80/505, dando una respuesta de 1022 RU a una concentración ~ 9 nM (~ 200 ng/mL). La R_{max} teórica que se obtenía para este mAb estaba cercana a 2700 RU lo que indicaba que aparentemente la inmovilización no era del todo eficiente. Los valores obtenidos en la interacción a la concentración antes expuesta cercana aunque todavía no de saturación (9 nM) estaban aún alejados de esta R_{max} (289). No obstante, el valor de 1000 RU antes mencionado era cuatro veces mayor que la respuesta más alta obtenida para cualquiera de los otros Abs primarios que se analizaron, si exceptuamos el caso del Ab de comercial A36 que llegó hasta al menos aproximadamente la mitad (~ 500 RU) con respuestas frente a 22 kDa hGH. Las preparaciones de 22 kDa recombinantes respondían al ~ 85 % para Genotonorm® y ~ 67 % y para el estándar recombinante 98/574 del NIBSC. La variante equivalente a 22 kDa hGH-V placentaria solamente dio alrededor del ~ 15 % de unión indicando la relevancia de algunas de las diferencias de aminoácidos entre la hGH y hGH-V. La otra única variante en la que se observó unión (cerca del 2 %) fue la variante de 17 kDa proteolítica. Ninguna de las dos variantes de 20 kDa, la hGH y hGH-V, ni tampoco la variante de 5 kDa, fue reconocida por este mAb AK569, así como tampoco la rhPRL y el hPL placentario. Si el mAb AK569 se comportaba de un modo similar, tanto en solución como unido a una superficie, estos resultados indicarían

que en el inmunoensayo correspondiente, tanto el hPL como la rhPRL no causarían en principio resultados anómalos. Aun así, el nulo reconocimiento de la segunda variante más abundante de hGH, la de 20 kDa, fue inicialmente inesperado. A partir de estos datos, el epitopo de reconocimiento podría por tanto residir en la secuencia de AA entre AA32 y AA47, pudiendo estar más concretamente involucrada la parte de secuencia cercana al AA 37, ya que la variante placentaria de 22 kDa hGH-V reaccionaba solamente dando un 15 % de respuesta y esta variante presenta un cambio en la secuencia en el AA 37, en el que la prolina es sustituida por la leucina. El otro dato que corroboraba esta hipótesis lo presentaba la variante de 17 kDa ya que era reconocida pero solo apenas en un escaso 2 % que apoyaba el que el epitopo estaría restringido a un trozo de la secuencia entre el AA32 y el AA44.

En global se podría asegurar que de los Abs caracterizados, el AK569 sería con diferencia el que presenta las mejores propiedades en superficie (*Vide Infra*).

4.1.3.2 mAb A36.

El mAb de captura A36 fue el único Ab comercial que está implicado en uno de los dos inmunoensayos para la detección del abuso de hGH. Este Ab presentaba especificidad para la variante de 22 kDa hGH.

La respuesta máxima que se obtuvo con este mAb A36 indicaba que aparentemente la inmovilización era efectiva y eficiente. Para poder

valorar mejor la orientación de este mAb la variante de 22 kDa hGH también fue inmovilizada en la superficie de un chip-sensor y se realizó la interacción interactuando con el mAb A36 inyectado en solución. La respuesta del mAb A36 hacia la variante de 22 kDa hGH inmovilizada fue relativamente idéntica comparada a la situación invertida.

La especificidad de este Ab fue valorada mediante interacciones con otras variantes de hGH. De estas interacciones se dedujo que el epitopo reconocido por el mAb A36 podía residir entre la secuencia de AA33 y AA46. A partir de una comparación entre las respuestas para la variante de 22 kDa y la falta de respuesta para la variante de 5 kDa se podría argumentar que esta variante carece de una parte del epitopo (a partir de la secuencia de residuos AA43 y AA46). En el caso de la variante placentaria de 22 kDa hGH-V las respuestas cercanas al 40 % no interferían esta posibilidad dado que en esta parte de la secuencia (AA43-AA46) no presenta diferencias de secuencia de AA respecto a la variante de 22 kDa hipofisaria.

Para evaluar las constantes cinéticas del mAb A36 se utilizó la variante de 22 kDa hGH del preparado recombinante del NIBSC IRP 98/574. Los datos obtenidos de las K_a no variaban cuando la velocidad de flujo era incrementada (para un flujo de 20 mL/minuto $5.3E^5$ frente a $7.3E^5$ para un flujo de 40 uL/minuto).

Esto era indicativo de la ausencia de limitación de transporte de masas. Este efecto aparece cuando el analito es transportado a la superficie a una velocidad inferior que la velocidad de interacción, lo cual merma la primera capa de la solución de muestra de moléculas del analito, es decir que en caso de presentarse este

efecto la pendiente del sensorgrama estaría más influenciada por la difusión que por la cinética de la propia reacción. Al aumentar las velocidades de flujo la influencia de la difusión en si misma estaba minimizada(298). Se realizaron aproximaciones teóricas de los datos experimentales de diferentes experimentos para asegurar el ajuste optimo y siguiendo criterios generales establecidos(299). Los datos cinéticos obtenidos estaban en concordancia con los presentados en su momento por Hashimoto y *col.*(134) utilizando el mismo mAb aunque con numero de lote diferente, en este trabajo se obtuvo una K_D de 2.1×10^{-10} M, y Hashimoto y *cols.* obtuvieron una K_D : 1.06×10^{-10} M, únicos datos comparables ya que se desconocen más detalles del trabajo publicado.

4.1.3.3 mAb D05.

El mAb D05 generado en el laboratorio de MCM (Tokio) mediante el procedimiento ya descrito(286) fue conocido según sus autores por ser específico contra la variante recombinante de 20 kDa hGH. No obstante sus respuestas de interacción en SPR eran muy pobres, después también confirmadas por resultados en inmunoensayos posteriores con una baja sensibilidad mostrada cuando se compararon los inmunoanálisis de variantes (ver más adelante). Para poder determinar su rango de concentración lineal en SPR, se utilizó un chip con una superficie de densidad inferior (9702 RU) a la expuesta anteriormente (ver tabla 9: 16835 RU). Con este valor se calculó la respuesta máxima (R_{max}) teórica para la variante de 20 kDa rhGH que dio un valor de 1294 RU.

Similar a los otros Abs estudiados, una concentración de saturación de la variante de 20 kDa hGH de $\sim 50 \mu\text{g/mL}$ ($\sim 2500 \text{ nM}$) resulto dar respuestas relativas de alrededor de $\sim 60 \text{ RU}$. Este resultado representaba que se alcanzaba solamente un $\sim 5 \%$ de la R_{max} teórica. Esta respuesta se podía correlacionar directamente con la mala orientación alcanzada por el mAb sobre la superficie del chip. Se han descrito distintos efectos que pueden causar una inmovilización incorrecta (300). Una posibilidad podría ser que la capacidad de unión de algunos mAbs quedaría mermada por la diferente distribución de grupos amino de los dominios Fab del anticuerpo que permitirían la unión del mAb a la superficie por estos dominios (301). Pese a que la inmovilización de Abs en inmunoensayos se realiza generalmente mediante una aproximación por adsorción pasiva, la baja sensibilidad en estos ensayos corrobora que los estudios de SPR son representativos.

La especificidad de este mAb D05 se evaluó mediante inyecciones de otros analitos entre ellos otras variantes de hGH a concentraciones equivalentes ya comentadas. La especificidad del mAb D05 para la variante de 20 kDa hGH, con el nulo reconocimiento para la variante de 22 kDa hGH solamente se podía explicar por la localización del epítipo en la única parte de la secuencia que es diferencial para esta variante de 20 kDa hGH, es decir la unión entre los AA32 y AA33. Para poder evaluar la posibilidad de mejorar la orientación del mAb D05 en la superficie se diseñaron diferentes pruebas. En primer lugar, la variante de 20 kDa hGH fue inmovilizada en la superficie en un nuevo chip-sensor (nivel de inmovilización de 2224 RU) y el mAb D05 se inyectó a

una concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$ (1500 nM). A partir de la respuesta relativamente elevada de 424 RU (frente a 60 RU obtenida en situación inversa) se podía deducir que al inmovilizar este mAb se observaba un pobre reconocimiento relacionado con la orientación en la superficie.

Se realizaron otras pruebas para intentar mejorar la respuesta de este mAb con la aplicación al chip de otras proteínas como la proteína A y la proteína G(301). También se tuvo en cuenta una aproximación distinta probando inmovilizaciones del mAb D05 a diferentes pH más bajos. Con distintos valores de pH se puede variar el gradiente de protonación de los distintos aminoácidos, permitiendo posiblemente un cambio en la orientación preferencial. En el diseño de esta evaluación el pH 3 fue el elegido como de límite inferior para asegurar la carga negativa de los grupos carboxilo en la superficie del chip(302).

A valores de pH superiores a 5.5 se observaba una atracción limitada indicando menos protonación de los aminoácidos, tanto argininas como lisinas, pero anticipando una reducida inmovilización. Con el gradual decrecimiento del pH se indujeron más protonación en el Ab, particularmente en glutamina, treonina, tirosina y residuos de serina causando una menor repulsión con a la superficie. Finalmente, a un pH de 3.9 se observaban pocas diferencias en la atracción con respecto al pH de 4.4 indicando la anulación parcial de las cargas negativas del dextrano carboximetilado.

Con los datos obtenidos, se eligió un pH de 4.4 (valores inferiores a este pH de 4.4 mostraban que no habían variaciones importantes de

la pendiente y por encima de valores de pH de 5.5 parecían no tener efectividad) para la inmovilización con tal de asegurar que todos los aminoácidos implicados pudieran protonarse y así obtener una mayor inmovilización aleatoria que con la inicial obtenida a pH 5.5. Bajo estas condiciones de inmovilización la variante de 20 kDa hGH se inyectó a través de la superficie a concentraciones altas (~ 50 µg/mL, ~ 2500 nM). Comparando los resultados obtenidos para el mAb D05 en las superficies preparadas a pH 5.5 y pH 4.4, se podía deducir que solamente se obtenían mejoras mínimas frente a la misma concentración de hGH 20 kDa (37 RU versus 60 RU) con niveles de inmovilización similares (7812 RU versus 8170 RU).

Otro intento para mejorar la eficacia de la orientación de este mAb fue el realizar una proteólisis parcial utilizando la enzima papaina para obtener fragmentos Fab del mAb. Aunque se mejoró la respuesta de la interacción entre este mAb y su analito específico, la variante de 20 kDa hGH, el porcentaje de fragmentos bien orientados en su unión a la superficie del chip solamente mejoró hasta llegar al 6 % siendo esta cifra todavía insuficiente.

Los diferentes resultados obtenidos con distintas estrategias parecían indicar que era difícil obtener mejoras en las propiedades de inmovilización en superficies sólidas como la del chip de este mAb. No obstante las propiedades de unión en otras superficies como las de los pocillos de las microplacas de ELISA también se veían afectadas por la mala propiedad de inmovilización. El intento de adsorción pasiva en el fondo de cada pocillo al elaborar las microplacas para ELISA actualmente se realiza con el doble de

cantidad de mAb D05 (1 µg/pocillo) que con el otro mAb utilizado en la otra microplaca, el mAb A36 (0.5 µg/pocillo).

4.1.4 Abs no específicos.

Los valores en RU de respuesta absoluta en las interacciones de estos Abs frente a sus Ags correspondientes se exponen en la tabla 13 y sus valores relativos en porcentaje sobre la máxima respuesta se exponen en la tabla 14.

Las abreviaturas utilizadas en la tabla ya han sido descritas anteriormente.

Tabla 13.- Resumen de las interacciones entre las diferentes variantes de la hGH y proteínas análogas y los Abs no específicos. La columna mAb indica el Ab inmovilizado y la columna RU indica el nivel de inmovilización obtenido. Las abreviaturas ya han sido detalladas previamente. Todos los analitos fueron inyectados a una concentración de 200 ng/mL. Las lecturas enmarcadas en color gris corresponden a la lectura más alta observada. La columna A corresponde a lectura en fase de asociación; la columna B corresponde a lectura en fase de disociación. Resultados expresados en RU.

mAb	RU	phGH		22 kDa hGH		22 kDa Geno®		17 kDa		5 kDa		
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	
AK566	8289	69	68	163	161	194	193	90	65	2	-1	
AK568	10787	16	16	41	42	42	44	51	32	-1	-2	
AK565	9298	24	23	28	24	24	21	138	73	-3	-1	
AK567	6721	61	40	83	46	82	43	271	257	5	-2	
mAb	20 kDa hGH		22 kDa hGH-V		20 kDa hGH-V		rhPRL		hPL Aff.		hPL NIBSC	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
AK566	111	110	89	79	17	13	2	1	23	21	68	66
AK568	49	50	45	43	13	11	2	0	4	1	17	7
AK565	74	50	24	20	10	8	4	3	29	24	44	38
AK567	169	128	67	40	35	20	14	7	59	46	91	75

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 14.- Resumen de las interacciones entre las diferentes variantes de la hGH y proteínas análogas y los Abs no específicos expresadas como percentiles relativos con respecto a la respuesta observada más elevada (valores enmarcados en color gris en la tabla anterior (tabla 13). La columna mAb indica los Abs inmovilizados en la superficie. Las abreviaturas ya han sido descritas previamente. La columna A corresponde a lectura en fase de asociación; la columna B corresponde a lectura en fase de disociación. Resultados expresados en %.

mAb	phGH		22 kDa hGH		22 kDa Geno®		17 kDa P		5 kDa S	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
AK566	36	35	84	83	100	99	46	34	1	-1
AK568	31	31	80	82	82	86	100	63	-2	-4
AK565	17	17	20	17	17	15	100	53	-2	-1
AK567	23	15	31	17	30	16	100	95	2	-1

mAb	20 kDa hGH		22 kDa hGH-V		20 kDa hGH-V		rhPRL		hPL Aff.		hPL NIBSC	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
AK566	57	57	46	41	9	7	1	1	12	11	35	34
AK568	98	96	88	84	25	22	4	0	8	2	33	14
AK565	54	36	17	14	7	6	3	2	21	17	32	28
AK567	62	47	25	15	13	7	5	3	22	17	34	28

Los resultados expresados en estas tablas se representan gráficamente como percentiles de respuesta absoluta para cada analito en las figuras 15 y 16. Las abreviaturas utilizadas en el gráfico para los distintos analitos son las ya descritas hasta ahora.

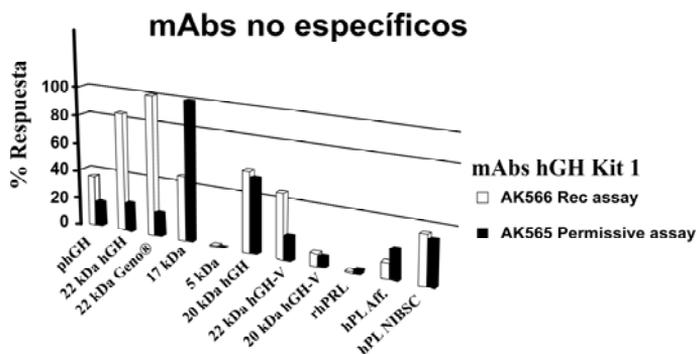


Figura 15.- Gráfico de los Abs no específicos para las distintas variantes o proteínas relacionadas con la hGH. Estos mAbs pertenecen al denominado kit 1 del inmunoensayo diferencial de isoformas de hGH. Las barras verticales corresponden a los valores de respuesta dados en percentiles (en relación a la respuesta obtenida más elevada) en el eje de ordenadas. En el eje de abcisas se representan los respectivos analitos interaccionados, cuyas abreviaturas ya se han definido anteriormente.

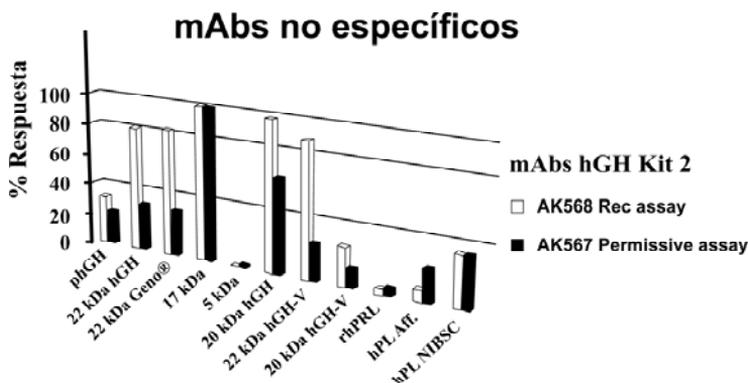


Figura 16.- Gráfico de los Abs no específicos para las distintas variantes o proteínas relacionadas con la hGH. Estos mAbs pertenecen al denominado kit 2 del inmunoensayo diferencial de isoformas de hGH. Las barras verticales corresponden a los valores de respuesta dados en percentiles (en relación a la respuesta obtenida más elevada) en el eje de ordenadas. En el eje de abcisas se representan los respectivos analitos interaccionados, cuyas abreviaturas ya se han definido anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de las dos figuras (figura 15 y figura 16) se puede observar claramente la miscelánea de interacciones de los anticuerpos de captura implicados en los kits 1 y 2 de los inmunoensayos diferenciales de isoformas de hGH. Los sensorgramas con las interacciones más relevantes se muestran en la figura 17.

En la figura 17 se pueden observar las interacciones más relevantes por SPR de estos cuatro mAbs, el AK566 (figura 17, parte A) y AK565 (figura 17, parte B) que actúan como Abs de captura en el kit 1 y el AK568 (figura 17, parte C) y AK567 (figura 17, parte D) que actúan como Abs de captura en el kit 2.

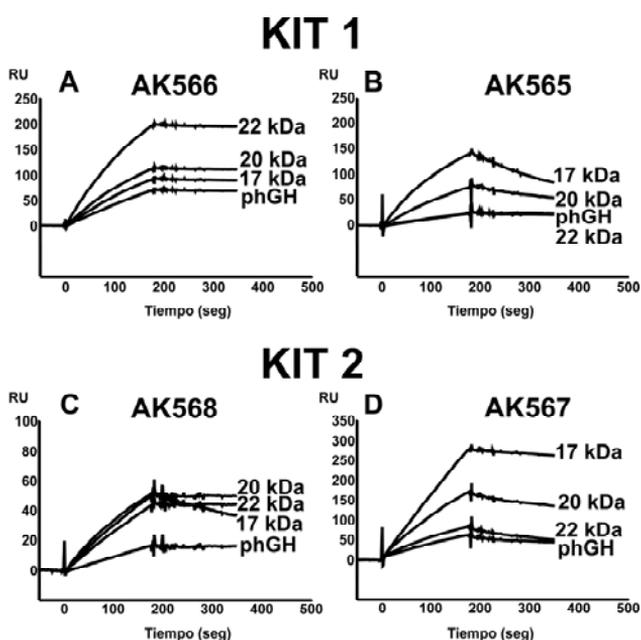


Figura 17.- Sensorgramas de las interacciones de los cuatro mAbs no específicos obtenidas por SPR. En el eje de ordenadas se muestran las respuestas en RU, en el eje de abscisas el tiempo en segundos. Los analitos que constan en el grafico son solamente aquellos que presentaban interacciones claras habiéndose prescindido de aquellos con interacción baja o ausente y también del material placentario. Las abreviaturas de cada analito son las que ya se han descrito anteriormente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los experimentos de cinética realizados para estos Abs dieron los resultados que se exponen para cada analito en las tablas 15 (para K_a y K_d) y 16 (para K_A y K_D).

Tabla 15.- Constantes de velocidad de asociación y disociación (K_a y K_d) de los mAbs AK565, AK566, AK567 y AK568, según los distintos analitos probados. Los valores marcados con guiones no se han realizado debido a los bajos niveles de respuesta obtenidos por el escaso o nulo reconocimiento de la bio-molécula por parte del Ab. Las cinéticas de los analitos 20 kDa hGH-V, rhPRL y la variante de 5 kDa no constan en la tabla debido a que no se realizaron cinéticas dadas las nulas respuestas observadas en las interacciones. Las unidades vienen dadas en $1/M\ s$ ($M^{-1}\ s^{-1}$) para K_a y $1/s$ (s^{-1}) para K_d .

MATERIAL HIPOFISÁRIO								
	Hipófisis IRP 80/505		22 kDa hGH IRP 98/574		20 kDa hGH Recombinante		17 kDa Proteólisis	
	K_a	K_d	K_a	K_d	K_a	K_d	K_a	K_d
AK566	6.4E ⁵	8.1E ⁻⁴	9.4E ⁵	2.5E ⁻⁴	1.0E ⁶	3.1E ⁻⁴	6.9E ⁴	1.1E ⁻³
AK568	9.2E ⁴	5.8E ⁻⁵	4.5E ⁴	2.6E ⁻⁴	8.5E ⁴	1.6E ⁻⁴	1.6E ³	2.1E ⁻³
AK565	1.3E ³	5.7E ⁻⁴	5.2E ³	1.0E ⁻³	2.1E ⁵	1.4E ⁻³	1.3E ⁵	3.2E ⁻³
AK567	3.8E ³	1.9E ⁻³	1.0E ⁴	3.3E ⁻³	4.1E ⁵	9.8E ⁻⁴	9.0E ⁴	8.9E ⁻⁴
MATERIAL PLACENTARIO								
	22 kDa recombinante		Lactógeno placentario humano					
	K_a	K_d	Affiland		NIBSC			
	K_a	K_d	K_a	K_d	K_a	K_d		
AK566	-----	-----	-----	-----	1.6E ⁵	1.3E ⁻³		
AK568	-----	-----	-----	-----	5.4E ³	7.6E ⁻³		
AK565	4.9E ²	2.0E ⁻³	1.1E ³	3.5E ⁻³	5.7E ⁴	1.2E ⁻³		
AK567	4.6E ³	3.7E ⁻³	5.0 E ²	4.7E ⁻³	7.8E ⁴	1.2E ⁻³		

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 16.- Constantes de asociación y disociación (K_A y K_D) de los mAbs AK566, AK568, AK565 y AK567, según los distintos analitos probados. Los valores marcados con guiones no se han realizado por el escaso o nulo reconocimiento de la bio-molécula por parte del Ab. Las cinéticas de los analitos 20 kDa hGH-V, rhPRL y la variante de 5 kDa no constan en la tabla debido a que no se realizaron cinéticas dadas las nulas respuestas observadas en las interacciones.. Las unidades vienen dadas en $1/M$ (M^{-1}) para K_A y M para K_D .

MATERIAL HIPOFISÁRIO								
	Hipófisis		22 kDa hGH		20 kDa hGH		17 kDa	
	IRP 80/505		IRP 98/574		Recombinante		Proteolisis	
	K_A	K_D	K_A	K_D	K_A	K_D	K_A	K_D
AK566	$7.9E^8$	$1.3E^{-9}$	$3.8E^9$	$2.7E^{-10}$	$3.2E^9$	$3.1E^{-10}$	$6.3E^7$	$1.6E^{-8}$
AK568	$1.6E^9$	$6.3E^{-10}$	$1.7E^8$	$5.8E^{-9}$	$5.3E^8$	$1.9E^{-9}$	$7.6E^5$	$1.3E^{-6}$
AK565	$2.3E^6$	$4.4E^{-7}$	$5.2E^6$	$1.9E^{-7}$	$1.5E^8$	$6.7E^{-9}$	$4.1E^7$	$2.5E^{-8}$
AK567	$2.0E^6$	$5.0E^{-7}$	$3.0E^6$	$3.3E^{-7}$	$4.2E^8$	$2.4E^{-9}$	$1.0E^8$	$9.9E^{-9}$

MATERIAL PLACENTARIO						
	22 kDa		Lactógeno placentario humano			
	recombinante		Affiland		NIBSC	
	K_A	K_D	K_A	K_D	K_A	K_D
AK566	-----	-----	-----	-----	$1.2E^8$	$8.1E^{-9}$
AK568	-----	-----	-----	-----	$7.1E^5$	$1.4E^{-6}$
AK565	$2.5E^5$	$4.1E^{-6}$	$3.1E^5$	$3.2E^{-6}$	$4.8E^7$	$2.1E^{-8}$
AK567	$1.2E^6$	$8.0E^{-7}$	$1.1E^5$	$9.4E^{-6}$	$6.5E^7$	$1.5E^{-8}$

4.1.4.1 mAb AK566.

Del resumen de los datos obtenidos por SPR se deducía que el mAb AK566 reaccionaba con la variante de 22 kDa hGH tanto la derivada del extracto phGH como de la derivada placentaria de 22 kDa. El material recombinante ofrecía la respuesta más elevada con un $\sim 15\%$ de diferencia entre el recombinante de 22 kDa del NIBSC y el recombinante de 22 kDa de origen farmacéutico (Genotonorm®). Las variantes placentarias daban cerca de $\sim 45\%$

de respuesta mientras que el derivado del material hipofisario mostraba solamente cerca de un $\sim 35\%$ respuesta. Además que el mAb AK566 también reconocía a las dos variantes de 20 kDa hGH, mucho más a la recombinante hipofisaria ($\sim 57\%$) y en mucha menor extensión la de origen placentario ($\sim 9\%$). A partir de lo observado con la variante de 17 kDa hGH que era reconocida cerca de $\sim 47\%$ de respuesta y no reconocía en cambio a la variante de 5 kDa, se podía deducir que el epitopo de reconocimiento debería residir en la secuencia de AA46 y AA191 de la forma mayoritaria de 22 kDa hGH. No se observaba respuesta ante la rhPRL pero el mAb AK566 si presentaba una reacción cruzada con el lactógeno placentario humano ($\sim 12\text{--}35\%$) en dependencia del origen de esta molécula, es decir del distinto fabricante. La observación de que el mAb AK566 interaccionaba con la variante de 20 kDa hGH era al menos algo peculiar, pero de hecho este mAb incluido en el inmunoensayo ya pre-definido por sus autores como “diferencial rec.

La reacción cruzada del hPL es menos sorprendente. Una búsqueda con la herramienta denominada Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) para el hPL ofrece a la hGH como segundo mejor emparejamiento después del precursor hormonal de la somatotropina coriónica humana y una alineación de secuencia con una homología del 77% con la variante de 22 kDa con las regiones más homologas entre la secuencia de AA 35 y AA 191.

4.1.4.2 mAb AK568.

El otro mAb de los denominados como rec, o sea el mAb AK568 respondía peor en términos de unión absoluta cuando se comparaba con el mAb mencionado anteriormente AK566. La mejor respuesta a un analito daba solamente 50 RU mientras que en el caso del mAb AK566 este valor era 4 veces superior indicando que bajo condiciones similares en un inmunoensayo el mAb AK568 debería ser menos sensible que el AK566. El mAb AK568, que según sus autores era incluido en el inmunoensayo "diferencial rec", reconocía de forma preferencial la variante de 22 kDa hGH sin embargo mostraba un reconocimiento más alto para la variante de 17 kDa (100 % de respuesta, ver tablas 13 y 14) aunque con una velocidad de disociación también más alta. El segundo mejor reconocimiento era para la variante de 20 kDa hGH de origen hipofisario (~ 96 %), dando niveles de respuesta muy cercanos a niveles de unión como en el caso de la variante de 17 kDa. El material hipofisario phGH presentaba un menor reconocimiento, igual que pasaba con el mAb anterior (AK566) y seguramente la definición dada por los autores de estos dos mAbs, incluidos en los inmunoensayos "diferencial rec", el reconocimiento del material recombinante de 22 kDa hGH según estos datos estaría al menos justificada siempre que se comparara entre la variante de 22 kDa y el material hipofisario purificado.

Las tres variantes de 22 kDa hGH (22 kDa NIBSC, 22 kDa Genotonorm® y 22 kDa hGH-V) estaban en porcentajes de unión entre 81 y 89 % de la respuesta máxima (obtenida con 17 kDa) y era difícil discriminar las diferencias entre las variantes de origen

hipofisario y placentarias. Los patrones de referencia del NIBSC, que contienen hGH hipofisaria y hPL mostraban una unión de ~ 33 % con el mAb AK568, mientras que la variante placentaria de 20 kDa hGH solamente mostraba una unión de ~ 25 % aunque proporcionando un elemento estructural reconocido por el Ab. Entre la secuencia de AA de la teórica variante de 20 kDa placentaria y la variante de 20 kDa de origen hipofisario, se computa una homología de ~ 93 %. Los primeros 32 aminoácidos se podían excluir como parte del epítipo para este mAb AK568 (secuencia no presente en la variante de 17 kDa hGH). También la secuencia C-terminal de AA134 hasta AA176 se podía excluir ya que está presente en ambas secuencias. Por todo ello el epítipo de reconocimiento debería estar cercano a la parte de la secuencia de AA50-AA51, AA77, AA97-AA98, AA-111, AA125-AA127 o AA134.

Tanto la variante de 5 kDa hGH como la rhPRL no fueron reconocidas por el mAb AK568. Si los dos Abs mencionados aquí incluidos en los inmunoensayos “diferenciales rec” se comparaban con los mAb específicos vistos anteriormente, mAb AK569 y mAb A36, el mAb AK569 presentaba la mejor respuesta (~ 1000 RU) y el mAb A36 la segunda mejor respuesta absoluta obtenida con respecto a la variante de 22 kDa hGH recombinante (~500 RU). Esto representaba aproximadamente 3.2 veces y 1.6 veces respectivamente, de la respuesta obtenida con el mAb AK566.

4.1.4.3 mAb AK565.

El mAb AK565 se trataba de un mAb con una amplia capacidad de reconocimiento. En general las respuestas obtenidas para las distintas variantes (ver figuras 15, 16 y 17) así como también las constantes cinéticas (ver tablas 15 y 16) eran inferiores en comparación con las anteriores, dado lo cual no parecía ser un mAb con unas características de unión a la superficie buenas (al menos en la aproximación por la plataforma SPR). El Ab reconocía la mayor parte de moléculas presentadas excepto la variante de 5 kDa hGH y tenía la mejor respuesta con la variante de 17 kDa (~ 140 RU) la cual además representaba la respuesta más elevada (100 %). El segundo mejor reconocimiento resultaba ser el de la variante hipofisaria de 20 kDa con un ~ 54 % de respuesta comparada con la anterior. Tanto el material phGH (IRP 80/505 del NIBSC) como el material recombinante de variantes aisladas de 22 kDa (orígenes hipofisario y placentario) ofrecían una unión de aproximadamente ~ 17 – 20 % mientras que la variante de 20 kDa hGH placentaria solamente daba cerca de un ~ 7 % de unión. También el hPL fue reconocido por este Ab con menos diferencias entre los preparados del NIBSC (~ 32 %) que en el caso del de origen del suministrador Affiland (~ 21 %). Ambos materiales eran de origen humano purificados, obviamente las diferencias de interacción podían provenir de diferentes métodos de purificación realizados por los fabricantes. En el caso del material del NIBSC el procedimiento de purificación está más detallado que en el caso de Affiland. Finalmente, tanto la rhPRL como la variante de 5 kDa, no eran reconocidas por este Ab al menos de modo significativo.

4.1.4.4 mAb AK567.

El mAb AK567, también resulto ser de amplia especificidad. En general cabe destacar que este mAb mostraba un mejor comportamiento de unión cuando era inmovilizado en la superficie, si se comparaba con el anterior mAb también utilizado en los ensayos “diferenciales pit” (mAb AK565). Sin embargo, la tendencia observada estaba muy cercana a la del mAb AK565. Se observaron niveles de interacción elevados para la variante de 17 kDa hGH (la respuesta más elevada de la serie al 100 %). La variante de 20 kDa de origen hipofisario mostraba alrededor del ~ 62 % de unión con respecto a la respuesta más alta. La variante de 22 kDa hGH de origen hipofisario dio cerca de ~ 30 % de unión respecto a la respuesta máxima (no se observaron diferencias entre el producto de origen farmacéutico y el estándar obtenido del NIBSC), muy similar a la que se observó para el hPL (~ 33 % para la preparación del NIBSC y ~ 22 % para la procedente del suministrador Affiland). Tanto el material hipofisario del NIBSC como la variante recombinante placentaria de 22 kDa dieron cerca de aproximadamente ~ 22 % de unión mientras que la variante de 20 kDa placentaria daba cerca del ~ 13 % de unión. El mAb AK567 también mostraba algo de unión (~ 5 %) para la rhPRL siendo el único mAb de este estudio que reconoció aunque vagamente a este analito. Finalmente, la variante de 5 kDa hGH no fue reconocida por el mAb AK567.

4.1.4.5 Anticuerpos no específicos en conjunto.

Los cuatro mAbs representados en los sensorgramas de la figura 17 reconocían diferentes variantes de hGH y con diferente amplitud. A partir de la pareja de mAbs que componen el kit 1, el mAb AK566 reconocía de forma preferencial la isoforma de 22 kDa (figura 17, A) mientras que el AK565 reconocía de forma preferente la variante de 17 kDa (figura 17, B). Bajo condiciones de concentración equivalentes el AK566 presentaba una sensibilidad más elevada, tanto en términos de respuesta absoluta como de estabilidad del complejo Ag-Ab (figura 17, A). El mAb AK565 mostraba de forma clara diferentes cinéticas de unión para las variantes de 17 kDa, 20 kDa y 22 kDa hGH, como se hace evidente por las diferentes K_d (ver figura 17, B y tabla 15). Dadas estas diferentes K_d , superiores para 17 kDa y 20 kDa, se podía anticipar que en una muestra que contuviera un amplio grupo de variantes de la hGH, la de 22 kDa hGH eventualmente debía estar bastante enriquecida ya que la unión de esta variante era muy ajustada.

En una comparación similar para el par de mAbs del kit 2 se dieron diferentes resultados. El mAb AK567 reconocía de forma preferencial la variante de 17 kDa (figura 17, D) y el mAb AK568 (figura 17, C) la variante de 20 kDa hGH aunque esta última con escasa diferencia respecto a 22 y 17 kDa. El mAb AK567 utilizado en el ensayo “diferencial pit” (figura 17, D) mostraba respuestas cerca de 6 veces superiores para la variante de 17 kDa y respuestas 3 veces superiores para la variante de 20 kDa. También se observaba que los complejos formados con el mAb AK568 tanto para la variante de 20 kDa como para la de 22 kDa hGH eran más

estables comparados con la variante de 17 kDa que se disociaba más rápidamente como se aprecia en la figura 17, C. Los complejos formados con el mAb AK567 para la variante de 17 kDa eran más estables (figura 17, D) dada su inferior K_d (ver tabla 15 de datos cinéticos).

Como se puede apreciar en la figura 17, los mAbs AK565 (17, B) y AK567 (17, D) dieron respuestas similares para el analito del extracto de phGH del NIBSC y también para la variante de 22 kDa hGH, algo obvio dado que la composición del extracto de phGH es en su gran mayoría de 22 kDa hGH(296). Sin embargo esto no se cumplió con los mAbs AK566 y AK568 (figura 17, A y C) ya que la respuesta fue mucho más baja para el extracto de phGH del NIBSC comparada con la variante de 22 kDa hGH confirmando con ello de nuevo la correcta definición dada a estos dos mAbs por sus autores como de reconocimiento preferencial de la variante recombinante.

4.1.5 Efectos cooperativos/enmascarantes para los Abs específicos y no específicos.

En orden a evaluar un posible efecto cooperativo de las variantes interactuando individualmente, se diseñaron combinaciones a probar tal como se exponen en la tabla 17.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se intento que la variante de 22 kDa siempre estuviera presente en los experimentos con la concentración de 20 nM que representaría el estado basal y 200 nM que representaría una situación de administración exógena. Estas concentraciones no eran las fisiológicas pero en estas pruebas se trataba de evaluar el efecto que pudieran tener mezclas sobre el reconocimiento por parte de los Abs de un único analito.

Tabla 17.- Combinaciones para evaluar el efecto cooperativo-enmascarante de distintos analitos sobre la interacción de un único analito. Las concentraciones de rhPRL y hPL son similares a límites fisiológicos de concentración inferiores y superiores. En la parte derecha se muestran las lecturas en RU para todas las interacciones. Las lecturas se realizaron en la fase de lavado. Las abreviaturas de los analitos se indican a pie de tabla. El hPL es el purificado del NIBSC.

Efectos de los enlaces co-operativos y/o enmascarantes												
Variantes hGH [nM]				Variantes no-hGH [nM]			Abs					
				rh	hPL	GHP	AK 566	AK 568	AK 565	AK 567	AK 569	A36
22k	20k	17k	5k	PRL	hPL	GHP						
20	--	--	--	--	--	--	42	16	4	6	376	235
20	2	--	--	--	--	--	45	20	8	13	361	225
200	2	--	--	--	--	--	147	185	34	111	1357	1077
20	2	2	2	--	--	--	45	31	11	16	374	168
200	2	2	2	--	--	--	129	183	34	108	1323	735
20	2	2	2	--	--	1	33	21	11	16	521	147
20	2	2	2	--	--	5	36	20	12	13	670	183
200	2	2	2	--	--	5	126	168	37	107	1313	876
20	2	2	2	1	--	--	37	24	12	16	342	168
20	2	2	2	8	--	--	38	23	11	17	408	201
200	2	2	2	1	--	--	125	183	102	107	1307	882
200	2	2	2	8	--	--	102	180	101	38	1058	533
20	2	2	2	--	50	--	42	26	30	35	372	142
20	2	2	2	--	500	--	106	67	203	188	391	176
200	2	2	2	--	50	--	111	173	37	83	1263	884
200	2	2	2	--	500	--	110	177	221	171	1128	530

Abreviaturas: 22k, variante de 22 kDa hGH; 20k variante de 20 kDa hGH; 17k variante de 17 kDa (proteólisis); 5k variante de 5 kDa (síntesis química).

Para el mAb AK566 el resultado bajo condiciones basales con o sin la presencia de otras variantes de hGH parecía ser muy similar. El efecto de incrementar la variante de 22 kDa, daba como resultado un incremento similar teniendo en cuenta la presencia de otras variantes y en concordancia con las constantes cinéticas observadas (ver tablas 15 y 16). La presencia de GHBP recombinante en solución parecía no alterar las lecturas, probablemente o bien debido a una unión baja de esta proteína hacia variantes de 20 y 22 kDa hGH con lo cual estas últimas no estarían impedidas de interactuar con el correspondiente mAb o bien que a pesar de su unión no existía tampoco un impedimento de que el complejo formado interactuara con el mAb inmovilizado. En el caso del hPL el efecto de incrementar la concentración en presencia de concentraciones basales de 22 kDa hGH (20 nM) resultaba dar lecturas aumentadas. En contraste, cuando las concentraciones de 22 kDa hGH se aumentaron 10 veces, el incremento en el hPL desde 50 a 500 nM no afectó apenas a la lectura final. Esto se podía interpretar como una adición de efectos, cuando el hPL estaba a concentraciones de 500 nM con presencia escasa de 22 kDa se unía en su lugar al mAb, pero cuando la variante de 22 kDa era presente de forma masiva (200 nM) este efecto no estaba presente. La rhPRL presentaba un efecto escaso en las interacciones con este mAb.

Para el mAb AK568 si se observaba un efecto acumulativo de las otras variantes en la respuesta obtenida en la variante de 22 kDa según fuera la concentración de esta última, a concentraciones de 200 nM la respuesta se mantenía y a concentraciones fisiológicas (20 nM) la respuesta estaba 2 veces aumentada en presencia de

todas las variantes. La presencia de GHBP tampoco parecía afectar en este caso de forma ostensible a la unión de variantes de hGH con el mAb AK568; a concentraciones 1 nM la respuesta caía cerca del ~ 30 %, y un resultado similar se obtenía a concentraciones 5 nM de GHBP. Parecía que el complejo que se formaba entre la GHBP y las variantes de hGH ayudaría a presentar un menor reconocimiento por parte del mAb que si actuaba sobre las variantes individualmente.

No obstante el efecto de GHBP tanto a 1 nM como 5 nM se difuminaba cuando la variante de 22 kDa estaba presente a concentraciones de 200 nM. De alguna manera se cumplía el hecho de que la presencia masiva de 22 kDa hGH saturaba rápidamente la GHBP y está posteriormente tenía poca incidencia en las lecturas finales.

La rhPRL no parecía tener ningún efecto ya que los resultados eran parecidos tanto a concentraciones de 1 como de 8 nM. El hPL sin embargo si interaccionaba y presentaba un efecto parecido a lo observado con el anterior mAb, es decir que a bajas concentraciones de 22 kDa hGH se podía apreciar el efecto del hPL pero a concentraciones 10 veces superiores de 22 kDa hGH era apenas perceptible.

Tanto el mAb AK565 como el mAb AK567 se comportaban de modo bastante parecido con respecto a la presencia de distintos analitos. El reconocimiento de la variante de 20 kDa con respecto a la variante de 22 kDa era aceptable, las lecturas se duplicaban cuando la variante de 20 kDa se incluía en la mezcla a una concentración 10 veces inferior. La adición de la variante de 17 kDa

a la concentración de 2 nM tenía un efecto equivalente al que se observaba para la variante de 20 kDa hGH. La GHBP no contribuía en si misma a interferir en las interacciones de los mAbs AK565 y AK567 como se deducía de las lecturas obtenidas.

La rhPRL en las interacciones con el mAb AK565 triplicaba las lecturas de la mezcla de variantes de hGH cuando la variante de 22 kDa estaba presente a 200 nM. Este efecto era independiente de la concentración final de rhPRL (1 y 8 nM). Este efecto no se apreciaba en el mAb AK567, aunque en este caso la respuesta era 3 veces inferior cuando la rhPRL estaba presente a 8 nM. Las interacciones simples de estos dos mAbs con la rhPRL eran de respuesta prácticamente nula (ver figuras 15 y 16), por lo que es difícil de encontrar una explicación lógica para el caso del mAb AK565.

El hPL si presentaba un efecto acumulativo a la concentración de 50 nM. Sin embargo, a 500 nM de hPL en combinación con elevadas concentraciones de 22 kDa hGH (200 nM), no se mostraba la suma en respuestas de la contribución de la alta concentración de 22 kDa hGH (~100 RU) y de la contribución del hPL (~200 RU).

Para el mAb AK569, *a priori*, no eran de esperar efectos cooperativos como en los experimentos de variantes individuales que mostraban solamente uniones a la variante de 22 kDa hGH. Cuando la GHBP estaba presente la interacción con este mAb a concentraciones fisiológicas de 22 kDa hGH (20 nM) duplicaba sus valores de RU tanto a 1 nM como a 5 nM de GHBP. Cuando se aumentó la concentración de la variante de 22 kDa hGH a 200 nM este efecto desapareció tal como ya se ha descrito con los demás

mAbs al saturarse la GHBP. Para el primer caso con la duplicación de respuestas en RU, asumiendo que la GHBP en interacción simple no podía unirse a este mAb, el efecto observado podría ser debido a la asociación de GHBP con la variante de 22 kDa hGH y el reconocimiento del complejo por parte del mAb AK569. Esta observación estaría en concordancia con el sitio de unión del mAb AK569 para con la variante de 22 kDa hGH (ver figura 18), sitio de unión por otra parte también propuesto por los autores de este mAb(98).

En el caso del mAb A36, su comportamiento ante las diferentes combinaciones era parecido al mAb AK569, aunque sus respuestas son de menor consideración en cuanto a lecturas RU del orden del 52.7 ± 14.7 % en toda la extensión de respuestas con las distintas combinaciones. Es de mencionar que en este caso a concentraciones fisiológicas de 22 kDa hGH (20 nM) el efecto de la presencia de GHBP tiene poca incidencia en las respuestas ya que las lecturas obtenidas son similares tanto en presencia de GHBP 1 nM como de GHBP 5 nM. A concentraciones más elevadas de 22 kDa hGH (200 nM) ocurre casi lo mismo a lo descrito anteriormente para los otros mAbs.

Concentraciones elevadas de rhPRL (8 nM) parece incidir en una menor lectura del mAb A36 a concentraciones 200 nM de la isoforma de 22 kDa hGH, aunque dado que a concentraciones 10 veces más bajas de 20 nM este efecto no se observa y podría haber sido posible un efecto simplemente de impedimento estérico.

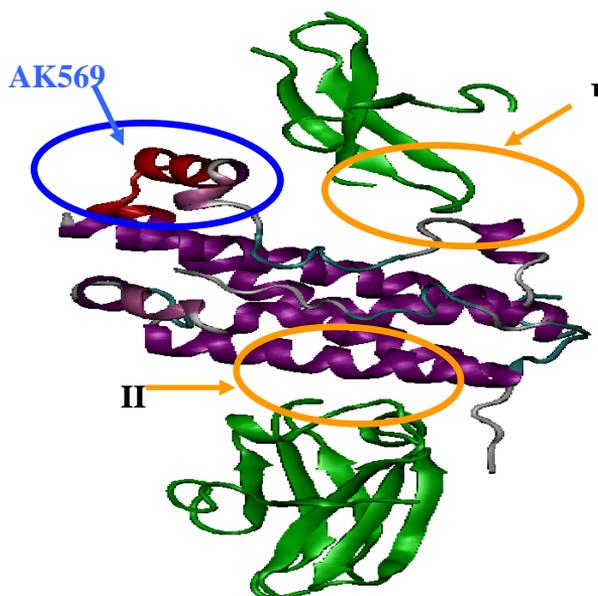


Figura 18.- Estructura con rayos X de la variante de 22 kDa hGH (en color morado) con los dos dominios extracelulares del receptor homodimérico (en color verde). Están indicados en círculos-elipse de color naranja los sitios de unión I y II para el receptor y en color azul el dominio de unión para el mAb AK569.

El mAb D05 específico para la variante de 20 kDa hGH dadas sus pobres propiedades de orientación en la superficie del chip no pudo ser sometido a estos efectos enmascarantes-co-operativos ya que hubiera sido posible confundir algún efecto con las mencionadas propiedades de este mAb y además teniendo en cuenta su clara especificidad los efectos si se hubieran presentado se podrían haber interpretado simplemente como causa del impedimento estérico.

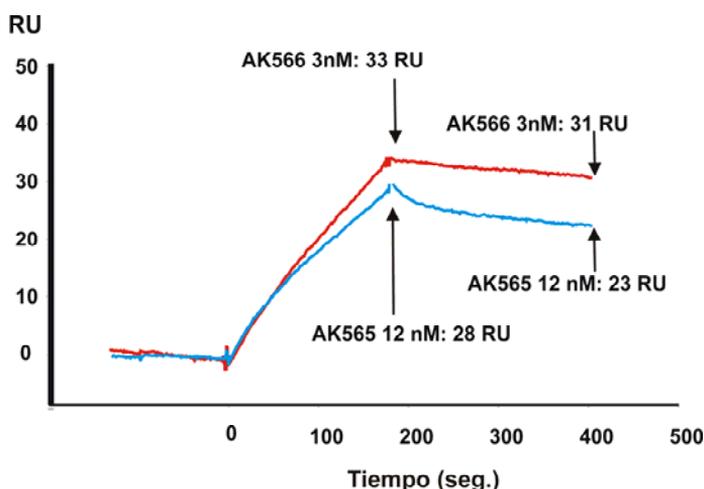
4.1.6 Discusión.

De esta evaluación se podía obtener una conclusión preliminar, ninguno de los denominados Abs primarios o de captura utilizados en los inmunoensayos diferenciales de variantes de hGH (ensayos rec y pit) tenían una especificidad absoluta e interaccionaron en mayor o menor grado a distintas variantes de hGH con la única excepción de la variante de 5 kDa. Esta misma premisa era completamente diferente para los dos inmunoensayos específicos de las variantes de 22 kDa hGH y 20 kDa hGH, ya que en ambos casos los mAbs de captura reconocían exclusivamente a cada uno de sus objetivos respectivos.

En el caso del primer tipo de inmunoensayo, el diferencial de isoformas de hGH (ensayos rec y pit), los mAbs de captura utilizados en cada par de inmunoensayos (AK566/AK565 y AK568/AK567) correspondían en realidad al material de 22 kDa hGH capturado previamente ya que es el único material que posteriormente podía ser reconocido por el mAb secundario o de detección que era exclusivamente específico para esta variante.

De los dos mAbs incluidos en los inmunoensayos denominados por sus autores como “diferencial rec”, en términos generales, el mAb AK566 si que reconocía preferencialmente la variante de 22 kDa sobre el resto de variantes. En el caso del mAb AK568 se podía hablar solo de preferencia respecto al material hipofisario del NIBSC pero no respecto a otras variantes como sería el caso de 17 kDa, 20 kDa y 22 kDa placentaria, con las que presentaba mejores respuestas en interacciones simples. Los dos mAbs AK566 y

AK568 presentaban no obstante constantes de asociación y disociación (K_A y K_D) similares para ambas variantes de 22 y 20 kDa hGH, del orden de 10^9 y 10^{-10} el AK566 y del orden 10^8 y 10^{-9} el AK568. Los otros dos mAbs que reconocen preferencialmente variantes derivadas de material hipofisario, los mAbs AK565 y AK567, tenían constantes de asociación y disociación de distinto nivel, K_A y K_D del orden de 10^6 y 10^{-7} para 22 kDa y del orden de 10^8 y 10^{-9} para 20 kDa. La variante de 17 kDa proteolítica presentaba para el mAb AK567 mejor orden de magnitud (10^8 y 10^{-9}). No obstante para los mAbs no específicos, en comparación con los mAbs específicos, los valores cinéticos eran en general inferiores en un orden de magnitud. Lo que mas contribuye a la diferencia de K_A se encuentra en la fase de disociación/lavado. Como ejemplo de este comportamiento se expone la interacción de la variante de 22 kDa hGH que a una concentración 3 nM con el mAb AK566 era comparable a la misma variante a una concentración de 12 nM con el mAb AK565 (ver figura 19). Al final de la fase de asociación (equivalente a la de lavado) ambos habían alcanzado un nivel parecido de unión, pero al ser la velocidad de disociación del último superior, la lectura dependía del tiempo transcurrido durante la disociación/lavado. Es de suponer pues que según el tiempo transcurrido las diferencias serian ampliables en valores absolutos entre los dos mAbs y los valores cinéticos estarían influidos por ello.



Reacción de los mAbs AK566 y AK565
contra la isoforma de 22 kDa hGH-N

Figura 19.- Comparación de respuestas de dos diferentes concentraciones de 22 kDa hGH sobre dos mAbs distintos (AK565 y AK566). Mientras que la fase de asociación alcanzaba valores de respuesta similares, la disociación era mucho más rápida para el mAb AK565 (1ª respuesta a los 302 segundos tras la inyección del analito y 2ª respuesta a los 539 segundos tras la inyección del analito) indicando que en un inmunoensayo este mAb daría lecturas muy inferiores.

Finalmente, el mAb AK569 de detección se unía a todas las variantes de origen hipofisario de 22 kDa probadas, incluido el material phGH del NIBSC (máxima respuesta) con afinidades similares. La respuesta superior que se daba para el material hipofisario *versus* la más escueta para la variante de 22 kDa hGH se explicaba por la velocidad de asociación más elevada del primero (10^6 vs 10^5 , respectivamente). La única variante de origen no hipofisario reconocida por este mAb AK569 fue la de 22 kDa placentaria. Esta variante mostró constantes de velocidad de

asociación (K_a) inferiores en dos órdenes de magnitud respecto a la variante de 22 kDa hipofisaria (10^5 vs 10^3) y en tres órdenes de magnitud respecto al extracto hipofisario phGH (10^6 vs 10^3)

Los mAbs de captura (parejas AK566-AK565 y AK568-AK567) daban respuestas para la variante de 22 kDa solamente dependientes de las características de afinidad y avidéz de cada mAb para con esta variante. Estos cuatro mAbs podían reconocer distintas variantes de hGH y con diferente amplitud y con distintas cinéticas de velocidad. Pero si los datos obtenidos en la caracterización por SPR se centraban solamente en las variantes de 22 kDa hGH y de phGH, las indicaciones originales (284) estaban justificadas y los dos mAbs de captura utilizados en los inmunoensayos “diferenciales rec” daban señales dos veces más elevadas para la variante de 22 kDa hGH comparadas con las del extracto phGH del NIBSC (IRP 80/505)(296). En la situación que se da en el caso de abuso de hGH la variante de 22 kDa tiene inicialmente una presencia masiva en sangre. Para esta variante en concreto en el caso de estos dos mAbs utilizados en los inmunoensayos “diferenciales rec”, la respuesta absoluta para el mAb AK566 era mucho más elevada que en caso del mAb AK568 bajo condiciones similares de superficie. En los mAbs de captura de los inmunoensayos “diferenciales pit” se dieron rendimientos de respuesta similares tanto para con el phGH como para con la variante aislada de 22 kDa hGH. Estos mAbs parecían presentar capacidades de superficie similares para estas dos variantes con respuestas de la misma magnitud.

Así pues las definiciones previas de los dos pares de mAbs de captura fueron corroboradas(284), aunque matizando algún aspecto, como ya se ha comentado, sobre el mAb AK568.

Dadas pues todas estas características ya comentadas, la diferente avidéz y afinidad de los distintos mAbs hacia las variantes de hGH a modo individual junto con la concentración relativa de cada caso, debería determinar la cantidad de 22 kDa hGH capturada para que la interacción posterior con este mAb secundario nos determinara realmente el resultado final. Esto debía ser consistente con las ratios entre ensayos rec y ensayos pit obtenidos con ambos kits 1 y 2 de los inmunoensayos diferenciales de isoformas de hGH.

Las características cinéticas de los cuatro mAbs de captura, según los datos expuestos aquí, tiene una clara influencia según sea la concentración de la muestra a analizar, es decir si en dicha muestra se dan simplemente características de concentración fisiológica de hGH con sus distintas variantes o bien si se dan características de abuso de hGH, es decir con la presencia masiva de 22 kDa hGH en forma de rhGH.

Con las características aquí mostradas el comportamiento más conservador del kit 1 parecía claro, como será corroborado más adelante con muestras reales obtenidas mediante ensayo clínico.

En general, a partir de los datos obtenidos por SPR era evidente que la suma de la selección previa efectuada por los mAbs de captura, unido a la característica del mAb secundario eran determinantes bajo condiciones fisiológicas. En condiciones de abuso de hGH con un exceso de la variante de 22 kDa, el par de mAbs empleado en el kit 1 (AK566/AK565) presentaba un poder de selección más fuerte

para esta variante de 22 kDa que el que se presentaba con el par de mAbs del kit 2 (AK568/AK567).

En el caso del otro inmunoensayo, el específico para 22 kDa y para 20 kDa, las limitaciones ya se ponían de manifiesto en el momento en que los dos mAbs de captura eran específicos para cada respectiva isoforma de hGH, pero con el perjuicio de que uno de ellos (mAb D05) presentaba unas características de unión a superficies sólidas muy limitada.

A partir de esta última característica era evidente que otro mAb con mejores propiedades de superficie que el mAb D05 debería ser suficiente para mejorar significativamente la sensibilidad. En nuestro propio laboratorio ya se han caracterizado 18 distintos Abs en teoría específicos contra la variante de 20 kDa. De todos estos Abs han destacado dos con unas excelentes propiedades de superficie (especificidad, capacidad, afinidad y estabilidad). Se pueden ver las respuestas a interacciones con la variante de 20 kDa hGH a una concentración 20 nM (figura 20). Uno de estos dos Abs era el mAb #7, producido por el laboratorio anti-dopaje de Beijing (China) en colaboración con la Universidad de Beijing (Dr. Du) y proporcionado gentilmente por el director del laboratorio anti-dopaje de Beijing, el Dr. Moutian Wu. El otro Ab era el mAb 5C4 producido en Alemania por el Dr. Zida Wu y el Dr. Martin Bidlingmaier. Este último ya ha sido experimentado recientemente en un inmunoensayo con una sensibilidad para la variante de 20 kDa de 0.002 µg/L(133).

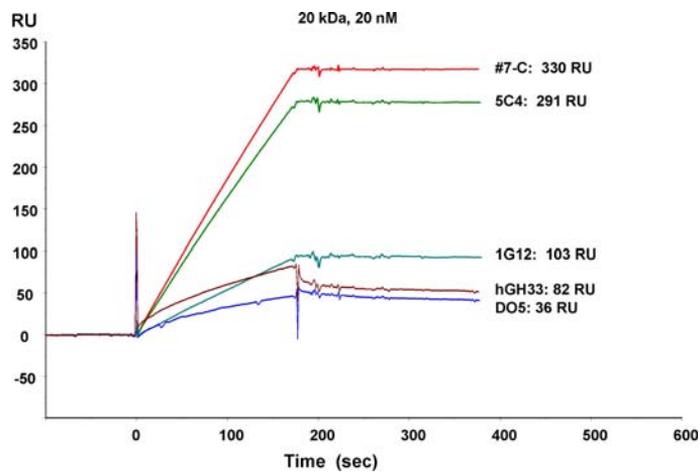


Figura 20.- Sensorgramas de SPR (superpuestos) de la interacción de la variante de 20 kDa hGH a una concentración 20 nM con diferentes Abs, entre ellos los mencionados mAbs 5C4 y #7.

4.2 Resultados del análisis de variantes de hGH.

Como ya se ha comentado dentro de la estrategia del método directo basada en la ratio de variantes alterado, con el objetivo de detectar el abuso de hGH en el deporte, se han desarrollado en estos últimos años dos diferentes aproximaciones. Estas dos aproximaciones se basan, mediante inmunoensayos distintos, en alcanzar como objetivo la obtención de una ratio entre la proporción de distintas variantes moleculares de hGH que se alteran cuando se da la situación de abuso de hGH. En la aproximación denominada como “inmunoensayo diferencial de isoformas de hGH” los mAbs utilizados, en concreto dos de ellos, miden preferencialmente la forma recombinante (AK566 en el kit 1 y AK568 en el kit 2) y los otros dos mAbs miden derivados de hGH hipofisarios o “diferenciales pit” (AK565 en el kit 1 y AK567 en el kit 2), siendo utilizado en los cuatro inmunoensayos el mismo mAb secundario (AK569). El resultado final sería la obtención de una ratio para cada kit, 1 y 2, denominada como ratio rec/pit que estaría muy alterada en caso de abuso de hGH.

En la otra aproximación denominada como “inmunoensayos específicos de variantes de 22 y 20 kDa hGH”, los mAbs utilizados para cada inmunoensayo medirían concretamente uno de ellos la variante de 22 kDa y en el otro caso la variante de 20 kDa. Con esta aproximación se obtendría también una ratio 22/20 kDa que igual que la anterior también estaría muy alterada en caso de abuso de hGH.

En este apartado de resultados se compararan ambas aproximaciones y su eficacia en la detección del abuso de hGH. Con la información obtenida y previamente ya presentada en el apartado anterior sobre la caracterización por SPR, se intentara encontrar la base sobre la cual funciona esta detección del abuso de hGH.

Los resultados obtenidos han derivado de muestras obtenidas mediante dos diferentes ensayos clínicos, realizados en dos períodos distintos separados en tiempo de aproximadamente tres años. En el primero de ellos el ensayo se realizó solamente con tres sujetos sin la presencia de ningún caso de sujeto blanco o control. Este ensayo se desarrollo en cuatro días, con tres días de tratamiento con rhGH (6 UI/día, equivalentes a 0.026 mg/kg/día de promedio) y solamente un día de lavado. Este enfoque una vez obtenidos resultados se consideró insuficiente tanto en los pocos días de duración de la administración de rhGH como en un único día de lavado del preparado farmacológico. En el caso del inmunoensayo ELISA para 22 y 20 kDa hGH este ensayo ya estaba totalmente desarrollado y se pudo aplicar sobre estas muestras, pero ni el inmunoensayo diferencial de isoformas de hGH (al menos en su formato actual en tubo) ni el inmunoensayo sobre citometría de flujo Luminex® no estaban todavía en funcionamiento. Las muestras inicialmente se analizaron con el anterior formato de microplaca para el inmunoensayo diferencial de isoformas de hGH por el método FIA-TR. Las muestras analizadas con el método FIA-TR presentaron el problema de que en los dos ensayos denominados “pit assays” se manifestó una clara falta de sensibilidad con muchos resultados < a

0.1 µg/mL (55 % en el kit 1 y 41 % en el kit 2). Las muestras de este primer ensayo también posteriormente se pudieron analizar mediante el nuevo método de ILMA o LIA en formato tubo y con luminómetro cuando este estuvo disponible.

Tres años después, se realizó un segundo ensayo clínico más amplio con 7 sujetos en dosis de administración con rhGH durante 7 días contando además con dos sujetos más como controles o blancos sin recibir rhGH. En esta ocasión el periodo de lavado se prolongo hasta un total de 14 días. Dado que los análisis se han llevado a cabo separados en el tiempo, se ha considerado preferible tratar los datos en dos bloques: primer ensayo clínico y segundo ensayo clínico. Esta presentación también se repetirá de nuevo en el apartado de resultados con marcadores biológicos por el mismo motivo.

4.2.1 Análisis de variantes de hGH en muestras del primer ensayo clínico.

Se recogieron para cada sujeto participante (sujetos voluntarios denominados como 12, 13, y 14) un total de 15 muestras de sangre a lo largo de los días del ensayo. Los resultados individuales de los distintos parámetros en relación con la hGH y con las distintas variantes de hGH en suero se detallan en el apartado de resultados anexo A.

El perfil farmacocinético sobre la administración de rhGH se calculó mediante las concentraciones del tercer día del ensayo analizadas con el método de quimioluminiscencia (Immulate-1000) y fue parecido (con ligeras diferencias) a datos previamente

publicados que indicaron que la administración de rhGH a los sujetos participantes fue correcta (85;303;304) siguiendo el patrón esperado con la misma vía de administración (subcutánea) y utilizando dosis parecidas. Los parámetros farmacocinéticos se calcularon y se exponen en la tabla 18.

En general, de la administración de 0.026 mg/kg/día de rhGH (valor promedio) resultaban incrementos de los niveles de concentración de hGH en suero de hasta un máximo entre ~ 20 - 30 µg/L, observados en el periodo entre las 4-6 horas después de la administración subcutánea. Las concentraciones volvieron de nuevo cerca del nivel basal en las 24 horas posteriores a la administración, apreciable en la figura 21.

Las curvas individuales, sin embargo, mostraban variaciones en términos de niveles máximos de hGH. Se apreciaba en uno de los sujetos (voluntario 13) la aparición de valores inferiores a los otros dos en el transcurso del primer día, después de la administración de rhGH. En el transcurso del segundo día del ensayo, se recogió únicamente una muestra de sangre a las 4 horas después de la administración subcutánea de rhGH como punto importante según datos bibliográficos previamente publicados(85) en orden a optimizar el volumen de muestra recogida en un punto de esperada concentración elevada de hGH. En el tercer día de administración, todas las variaciones inter-individuales parecían minimizarse con la observación de curvas similares en los tres sujetos (figura 21, hGH 48-72 h).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 18.- Valores promedio de farmacocinética (media \pm DS) obtenidos con diferentes métodos. AUC: área bajo la curva desde 0 a 24 horas. REC: constante de velocidad de eliminación. Cmax (T): concentración máxima durante los 3 días de administración con rhGH. Cmax (3): concentración máxima en el tercer día de tratamiento. Tmax (3): tiempo estimado de concentración máxima en el tercer día. Media $\frac{1}{2}$: vida-media. MRT: Tiempo medio de residencia (mean residence time).

Métodos	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}\cdot\text{L}^{-1}$)	REC k	Cmax (T) ($\mu\text{g/L}$)	Cmax (3) ($\mu\text{g/L}$)
IMMULITE	176.98 \pm 11.50	0.303 \pm 0.05	30.37 \pm 3.40	30.10 \pm 3.02
REC KIT 1	103.75 \pm 7.03	0.317 \pm 0.06	18.58 \pm 2.06	18.24 \pm 1.46
REC KIT 2	138.05 \pm 16.25	0.323 \pm 0.06	23.77 \pm 1.94	23.73 \pm 1.87
Métodos	Tmax (3) (hr)	Half 1/2 (hr)	MRT (hr)	-----
IMMULITE	4.00 \pm 0.00	2.32 \pm 0.36	4.93 \pm 0.12	-----
REC KIT 1	4.00 \pm 0.00	2.24 \pm 0.43	4.89 \pm 0.15	-----
REC KIT 2	4.00 \pm 0.00	2.19 \pm 0.40	4.88 \pm 0.17	-----

No en todas las muestras de este ensayo se midieron las variantes de 22 kDa hGH y 20 kDa hGH utilizando el método ELISA. Estos análisis se efectuaron sobre todas las muestras del voluntario 14,

pero solo en puntos seleccionados previamente en los voluntarios 12 y 13 basándose en datos previos obtenidos del análisis general de todas las muestras realizadas por Immulite-1000 (ver resultados anexo A y figura 21).

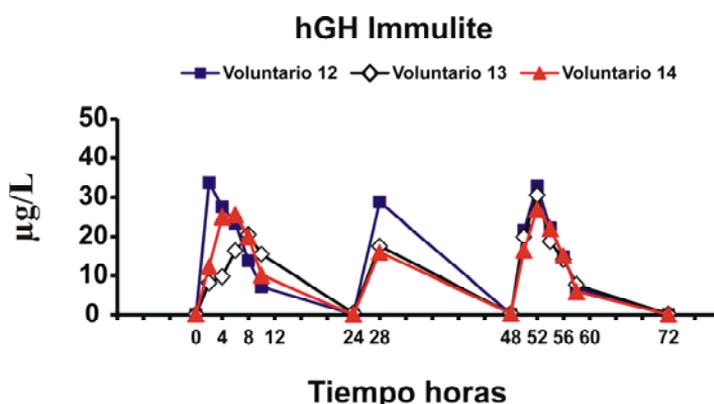


Figura 21.- Concentración de hGH en µg/L en función del tiempo después de la administración periódica de rhGH durante 3 días. Resultados obtenidos mediante Immulite-1000.

Más recientemente si se realizaron los análisis con los inmunoensayos diferenciales de isoformas de hGH con los kits 1 y 2 de rec y pit sobre todas las muestras de los tres voluntarios.

4.2.1.1 Análisis de variantes 22 kDa hGH y 20 kDa hGH: ratio 22/20 kDa.

Como ya se ha comentado, se realizaron los análisis en todos los puntos del sujeto 14, y en los sujetos 12 y 13 se realizaron solamente los puntos 0 y 4 horas del primer día, a las 24 y 28 horas del segundo día y finalmente en los puntos de 48 y 52 horas del tercer día y 72 horas del cuarto día (periodo de lavado) cuando la

rhGH ya no era administrada. Los resultados individualizados se detallan en el apartado de resultados anexo A.

En el momento de ser analizadas las muestras no se disponía de valores de corte o cut-off poblacionales (estaban pendientes de establecerse). Con ello aun no se disponía de una herramienta valida para poder evaluar si realmente existia o no un abuso de hGH y hasta cuando se podía detectar. Más adelante si se pudieron establecer estos valores a partir de un estudio demográfico llevado a cabo por Irie *et al.*(132). Se aplicaron sobre el valor promedio de las ratios obtenido en sujetos varones (392 sujetos varones) de 11.91 ± 4.84 , 3.7 desviaciones estándar (SD), para poder establecer, según criterios establecidos de la WADA, un riesgo potencial con una tasa de 1 en 10000 falsos positivos, dando un valor de corte para la ratio de 29.82, que aparece indicado con una línea horizontal negra en el gráfico de la figura 22, en la cual se representan las ratios calculados entre las variantes de 22 y 20 kDa hGH. A pesar de no disponer en un principio de un valor de corte establecido, ya se apreciaba que de las ratios obtenidos en estos tres voluntarios, el margen de WOO parecía claro en el margen de hasta las 12 horas después de la administración como se aprecia en el gráfico de la figura 22, hallándose todos los puntos pertenecientes a las 24 horas post-administración (triángulos negros de la figura 22) por debajo de la línea del valor de corte. En el caso del voluntario 13 se dio una ratio más elevada a las 24 horas después de la primera administración de rhGH y antes de la segunda dosis. Esta ratio fue la que quedó más cercana al valor de corte establecido. En valores

promedio \pm DS, la ratio de los tres sujetos antes de iniciarse la administración de rhGH fue de 5.2 ± 1.65 , pero en el conjunto de puntos post-24 horas de la administración fue de 9.5 ± 7.71 , con una dispersión de valores más elevada. En los puntos comprendidos entre las 2 y 12 horas post-administración los valores de la ratio fueron en su conjunto de 680.9 ± 489.31 , presentándose aquí la dispersión de valores más amplia, aunque dados los valores en que se movían las ratios, también más lógica.

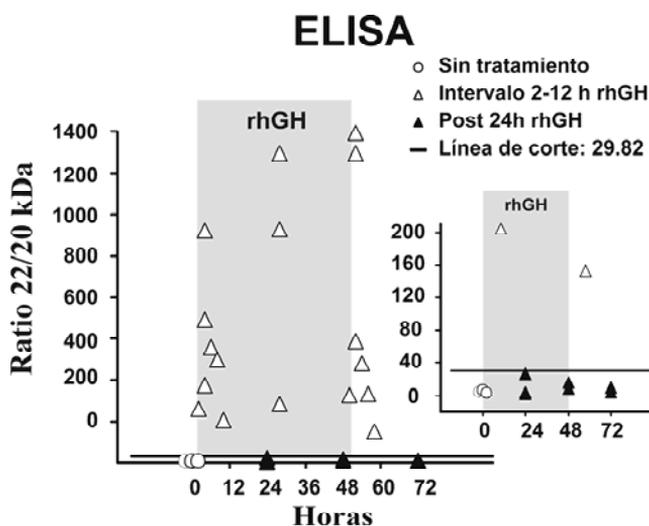


Figura 22.- Ratios obtenidas con el método de ELISA específico. Los triángulos abiertos representan puntos entre 2 y 12 horas post-administración de rhGH, los triángulos negros puntos 24 horas post-administración de rhGH y también a los 2, 7 y 14 días después de finalizar el tratamiento, los círculos abiertos representan puntos antes de iniciar los tres días de tratamiento. La línea horizontal negra muestra el valor de corte de 29.82. En la parte derecha de la figura se muestra la zona ampliada con las ratios por debajo de 100.

Posteriormente a la administración de rhGH (entre 2 y 12 horas) todos los ratios en estas horas iniciales estuvieron claramente por encima del valor de corte (29.82). Se alcanzaron ratios mínimas de 153.1 en el sujeto 14, 10 horas después de la administración de rhGH del tercer día y ratios máximas de 1591.7 en el sujeto 12, 4 horas después de la dosis de rhGH también del tercer día. En todos los casos los ratios se restablecieron a valores basales y claramente por debajo del valor de corte después de 24 horas tras cada administración.

4.2.1.2 Análisis del variantes rec y pit: ratio rec/pit.

Inicialmente se analizaron las muestras de los tres voluntarios por el anterior método de FIA-TR en microplaca siguiendo la misma pauta de los puntos de tiempo analizados explicado en el apartado anterior. Más recientemente, se han podido analizar estas mismas muestras por el método actual (ILMA). Los resultados individuales de ambos métodos se detallan en el apartado de resultados, anexo A.

En los análisis del método FIA-TR se dieron resultados en el inmunoensayo pit $<$ a 0.1 $\mu\text{g/L}$ (55.2 % en kit 1 y 41.4 % en kit 2). Aun así entre 2 y 12 horas después de la administración de rhGH el resultado era claramente positivo aplicando los valores de corte actuales (1.68 para kit 1 y 1.68 para kit 2) establecidos posteriormente por la WADA (305). En el término de 24 horas se daban aun tres casos con una ratio por encima del valor de corte,

aunque eran poco valorables debido a que estaban calculados con un valor extrapolido a partir de $0.100 \mu\text{g/L}$, dado que provenían de valores $< 0.1 \mu\text{g/L}$.

En el caso de la metodología actual por ILMA, tanto el límite de detección (LOD) como el LOQ fueron ampliamente mejorados respecto a FIA-TR y establecidos tanto por los autores(98) como en los resultados de validación realizados en nuestro propio laboratorio, resultados que se exponen en el apartado de resultados anexo A.

Las ratios obtenidas para el kit 1 y el kit 2 están representadas en las figuras 23 y 24 respectivamente. De los resultados obtenidos en este primer ensayo clínico con el inmunoensayo diferencial de isoformas de hGH (ILMA), no todas las ratios tanto del kit 1 como del kit 2 entre 2 y 12 horas post-administración de rhGH quedaban claramente por encima, como hubiera sido lo esperado, del valor respectivo de corte fijado por la WADA(305). Para 1 caso con el kit 1 y 5 casos con el kit 2 no ocurrió así. En el kit 1 el resultado correspondiente al voluntario 13, 4 horas post-administración de rhGH al tercer día dio una ratio de 1.36 (valor de corte del kit 1 para varones de 1.81). En cambio en el kit 2 se presentaron un total de 5 casos discrepantes entre lo esperable y el resultado real de la ratio.

En el mismo caso ya comentado, el de el voluntario 13, 4 horas post-administración de rhGH al tercer día dio una ratio de 1.26 (valor de corte del kit 2 para varones de 1.68) y también otros cuatro casos pertenecientes al voluntario 14 que correspondían a las 4 horas post-administración de rhGH al primer día, una ratio de

1.16, a las 2 y 4 horas post-administración de rhGH al tercer día con ratios de 1.41 y 1.57 respectivamente y a las 10 horas post-administración de rhGH al tercer día con una ratio de 1.60. Todos estos casos se podían considerar como falsos-negativos, ya que al estar en el intervalo de WOO de entre 2 y 12 horas era esperable que fuera la interpretación como positiva.

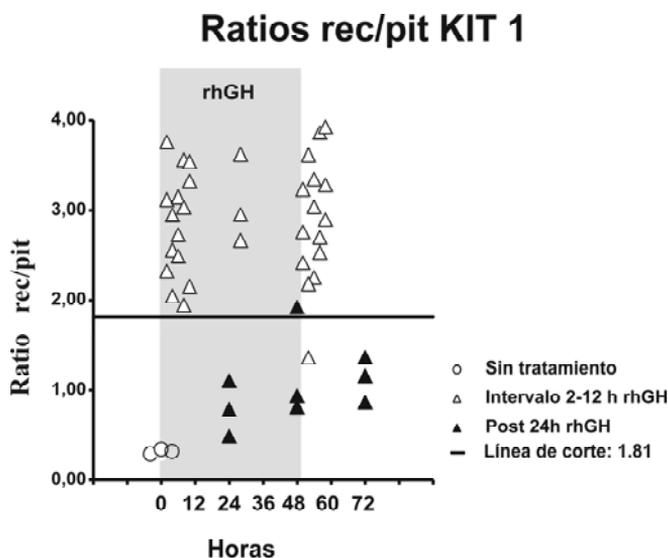


Figura 23.- Ratios obtenidas con el kit 1 ILMA del inmunoensayo diferencial de variantes. Los triángulos abiertos corresponden a puntos desde las 4 hasta las 12 horas (días 1, 2 y 3) post-administración de rhGH, los triángulos solidos de color negro corresponden a puntos de 24 horas post-administración de rhGH, los puntos abiertos corresponden a los tres sujetos receptores de rhGH pero antes de iniciar el tratamiento de 3 días con rhGH. La línea horizontal negra muestra el valor de corte de 1.81 para este kit.

A las 24 horas post-administración de rhGH solamente en un caso, para el kit 1, se observaba una ratio por encima del valor de corte. No ocurría lo mismo para el kit 2 en el que todos los valores 24

horas posteriores a la administración de rhGH estaban claramente por debajo del valor de corte.

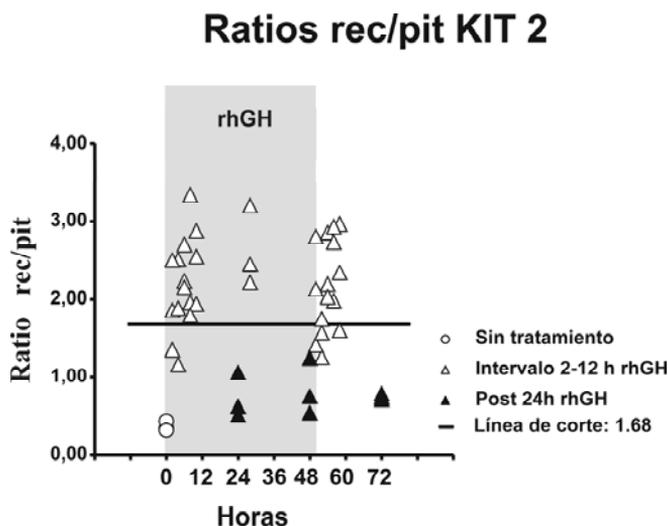


Figura 24.- Ratios obtenidas con el kit 2 ILMA del inmunoensayo diferencial de variantes. Los triángulos abiertos corresponden a puntos desde las 4 hasta las 12 horas (días 1, 2 y 3) post-administración de rhGH, los triángulos sólidos de color negro corresponden a puntos de 24 horas post-administración de rhGH, los puntos abiertos corresponden a los tres sujetos receptores de rhGH pero antes de iniciar el tratamiento de 3 días con rhGH. La línea horizontal negra muestra el valor de corte de 1.68 para este kit.

En ninguno de los tres voluntarios en sus valores de las ratios antes de iniciar el tratamiento (condiciones basales) de tres días con rhGH se dio un solo falso-positivo. En este ensayo clínico no obstante, al ser realizado en un inicio de este trabajo como finalidad de prueba para los inmunoensayos ELISA específicos para las variantes de 22 kDa y 20 kDa hGH se vio posteriormente que se trataba de un ensayo clínico muy corto en cuanto a la duración, tanto en número

de voluntarios como en número de días de administración de rhGH. Este extremo fue corroborado con los resultados obtenidos con los bio-marcadores (estrategia indirecta, *Vide Infra*)

4.2.1.3 Discusión.

Sobre los resultados que se obtuvieron con la metodología de FIA-TR no pueden entrar en la discusión por el problema de sensibilidad manifiesto que se presentó.

Posteriormente se dispuso de resultados con la nueva metodología ILMA de este primer ensayo clínico aunque también se dispuso antes de los datos más amplios del segundo ensayo clínico con lo que en el caso de los resultados del primer ensayo clínico no se llevaron a cabo pruebas estadísticas comparativas.

Al comparar los resultados del kit 1 y del kit 2 del primer ensayo clínico obtenidos por el método ILMA con los obtenidos por ELISA, teniendo en cuenta los respectivos valores de corte para cada kit, la concordancia en la interpretación de las ratios de valores basales previos al inicio de la administración de rhGH fue del 100 %, es decir lo que era esperable que saliera como resultado negativo-verdadero. En los intervalos de tiempo entre 2 y 12 horas posteriores a recibir dosis de rhGH, todas las ratios obtenidas por la aproximación de ELISA fueron de forma clara interpretables como resultados positivos. En esta aproximación, aunque fuera con un tamaño de muestra reducido, no se presentaron ni resultados falso-negativos, ni tampoco falso-positivos. Según estos resultados parecía claro que esta aproximación de la ratio 22/20 kDa tenía una

WOO de hasta 12 horas. También parece claro que la WOO del siguiente punto de muestreo a las 24 horas no era aplicable.

En el caso de la segunda aproximación, con la obtención de los ratios rec/pit por ILMA, se presentaron claras discrepancias con ratios no esperadas que daban resultados falso-negativos y que ya han sido comentados en el apartado de resultados. En el caso de esta segunda aproximación con la obtención de los ratios rec/pit, actualmente y siguiendo normas de la WADA se utilizan para la prueba de cribaje o “screening” indistintamente uno de los dos kits, pero en caso de resultado positivo este se debe confirmar antes de dar un resultado adverso para el atleta. Para la confirmación se utilizan conjuntamente los dos kits y debe salir la ratio en los dos casos interpretable como resultado positivo según el valor de corte para varones, es decir la ratio superior a 1.81 para el kit 1 y superior a 1.68 para el kit 2. Para estos casos discrepantes (1 con el kit 1 y 5 con el kit 2) se podía hacer una valoración conjunta con los dos kits y solamente en un caso hubo coincidencia de una ratio por debajo del valor de corte tanto para el kit 1 como para el kit 2, a las 4 horas de haber administrado la dosis de rhGH en el mismo voluntario. Es decir con esta aproximación realmente solo existía un caso de resultado falso-negativo. No obstante lo que representa un resultado falso-negativo es en si mismo de menor gravedad que el caso contrario de falso-positivo, ya que en este ultimo caso debería ser la única posibilidad que no debería pasar nunca. Para estos últimos casos comentados (6 discrepancias), las discrepancias observadas se podían relacionar directamente con las características evaluadas por

SPR.(apartado de caracterización de Abs) para cada pareja de Abs. Las diferencias observadas entre los mAbs utilizados en el kit 1 y en el kit 2 mostraban la relación con el respectivo poder discriminatorio de cada kit, mucho mayor en el kit 1 (mAbs AK566/AK565) que en el kit 2 (mAb AK568/AK567). Estas diferencias entre el poder de discriminación serían también observadas y comentadas de nuevo en el apartado relacionado con el segundo ensayo clínico.

En los inmunoensayos probados para las dos aproximaciones el punto de tiempo de 24 horas después de la administración de rhGH era el que ofrecía la mayor discrepancia respecto a la dualidad positivo/negativo ya que en ningún caso por la aproximación de la ratio 22/20 kDa por ELISA se dio una ratio por encima del valor de corte de 29.82. Para el caso de los inmunoensayos diferenciales de isoformas de hGH solamente en un caso se dio una ratio en el kit 1 por encima del valor de corte (voluntario 14).

La existencia de pocos datos (bajo tamaño de muestra) consecutivos obtenidos en este ensayo clínico no hizo recomendable utilizar herramientas estadísticas comparativas. No obstante es de destacar que tanto para este primer ensayo clínico como para el caso del segundo ensayo clínico, que vendrá a continuación, ha sido la primera vez que los inmunoensayos disponibles para la detección directa del abuso de hGH se han podido enfrentar.

La presencia por otra parte de un esperado efecto de retroalimentación (feed-back) negativa en la secreción endógena de la variante de 20 kDa hGH ante el aumento de 22 kDa hGH debido

a una administración exógena solo se pudo apreciar claramente en el voluntario 13. Esta respuesta no fue muy marcada y una posible explicación podía darse por efecto de la dosis baja de rhGH administrada, aunque esta dosis era equivalente a la utilizada normalmente en tratamientos aplicados a niños con déficit de hGH. En trabajos previos publicados con ensayos clínicos de rhGH se ha informado sobre la presencia de “feed-back” negativo en mujeres, pero no en varones (como en este trabajo) con dosis de rhGH de 0.033 mg/kg/día, dosis ya en si misma superior en un $\sim 27\%$ a la utilizada ahora aquí de 0.026/mg/kg(85). En otros trabajos si se observaron descensos en las concentraciones de 20 kDa hGH (feed-back negativo) en varones aunque utilizando dosis de rhGH mucho más elevadas (84). Respecto a la duración en la supresión (feed-back negativo) se ha observado la reaparición de concentraciones de 20 kDa hGH en circulación periférica entre 26 y 34 horas despues de dosis de rhGH elevadas (aproximadamente 2.5 veces las de este trabajo). Estos cambios prolongados proporcionan evidencias de que el modelo de las variantes de hGH se podría utilizar mejor en mujeres para detectar la administración exógena de rhGH, cosa lógica si también se tiene en cuenta que los valores de referencia poblacionales utilizados en clínica humana, el sexo femenino presenta valores entre 8-10 veces superiores en condiciones basales. Dependiendo del método utilizado para analizar la variante de 20 kDa hGH, las concentraciones en varones podrían ser indetectables o muy cercanas al LOD. En este caso si se carece de una buena sensibilidad se hará prácticamente imposible demostrar que pueda existir la supresión de la variante de 20 kDa hGH por feed-back

negativo al administrar rhGH exógena. Como se ha visto con los resultados presentados aquí las 24 horas post-administración son muy críticas en la detección del abuso de hGH. De alguna manera y según la dosis utilizada y extrapolando más allá de la variante de 20 kDa, también variantes derivadas de la hipófisis pueden o no estar afectadas por el feed-back negativo. Es evidente que entre 2 y 12 horas post-administración de rhGH la implicación que pueda tener la presencia de feed-back negativo es poca pero para la frontera de las 24 horas es también evidente que según la dosis que se utilice de rhGH, disponer en cualquier método que se utilice de una buena sensibilidad será obvio.

Las dosis bajas de rhGH administradas en este trabajo, pero equivalentes a tratamientos utilizados en pacientes con déficit de hGH, es decir son dosis efectivas en cuanto al fin deseado. En el ámbito deportivo nadie conoce a ciencia cierta las dosis utilizadas aunque con el fin que se persigue deberían utilizarse durante periodos largos de tiempo.

Con la aproximación de la ratio 22/20 kDa los valores de hasta 10 horas posteriores a la administración de rhGH aun estaban dentro del rango de varios cientos y hasta en algún caso de más de un millar. Esta amplitud de la ratio debería favorecer al menos el potencial discriminatorio de esta aproximación. Con el método ILMA los valores de ratio fueron de una menor amplitud del orden desde 0.50 en la fase de pre-administración hasta el rango de ~ 3.9 (kit 1) y 3.2 (kit 2) en los picos máximos alcanzados.

En global las interpretaciones de las ratios obtenidas en ambas aproximaciones (ratio 22/20 y rec/pit) resultaban coherentes, siendo

el punto de las 24 horas posteriores a la administración de rhGH, al menos con la dosis utilizada, muy crítico con respecto a la WOO. En ambas aproximaciones se podía intuir que la sensibilidad para cada caso era un punto crítico y aun mucho más en concreto la sensibilidad del inmunoensayo que proporcionaba el valor del denominador de cada ratio.

La reciente obtención de inmunoensayos basados en otros mAbs contra la variante de 20 kDa hGH distintos al mAb D05 y con sensibilidades mejoradas permite pensar en que esta aproximación tiene margen de mejora. En concreto dos mAbs como el #7 (aun sin inmunoensayo publicado) y el otro con inmunoensayo ya publicado, en concreto el mAb 1G12(133) con una sensibilidad mejorada (0.002 $\mu\text{g/L}$). Estos mAbs también han sido caracterizados en nuestro laboratorio aunque no se comentan ahora los resultados ya que no es uno de los objetivos de esta tesis.

4.2.2 Análisis de variantes de hGH en muestras del segundo ensayo clínico.

Tres años después del primer ensayo clínico se pudo realizar un segundo ensayo clínico más completo que el anterior, con siete sujetos en tratamiento y dos sujetos actuando como control o blanco, con 7 días de duración en el tratamiento con rhGH y con un periodo de lavado de 15 días una vez finalizado el tratamiento. Se planteo si al incluir dos sujetos blanco o control seria mejor incluirlos como sujetos placebo sin que los sujetos voluntarios participantes supiesen si se les inyectaba o no rhGH. Finalmente se

elimino esta posibilidad, dado que no reflejaba el escenario real en el escenario del deporte, ya que en este ámbito existen deportistas que utilizan rhGH como dopaje y deportistas que no la utilizan como agente dopante pero tampoco en su sustitución ingieren placebo alguno.

Con este nuevo modelo se pudieron obtener más datos para llevar a cabo pruebas de comparación de resultados tanto en su concentración como con las ratios obtenidas. En este segundo ensayo se pudieron también analizar las muestras por un método similar a ELISA (en el caso del método 22/20) desarrollado más recientemente (132), con los mismos mAbs pero analizados en una nueva plataforma de análisis por citometría de flujo, FCMIA, en el instrumento analizador Luminex®. Los resultados individuales para cada sujeto tanto con el método ELISA, Luminex y los inmunoensayos diferenciales de isoformas hGH (ILMA) tanto con el kit 1 como con el kit 2, se detallan en el apartado de resultados anexo A.

4.2.2.1 Resultados.

La administración de rhGH resulto dar los resultados predecibles según los aumentos observados de hGH en todos los sujetos tratados. Se encontró un único valor totalmente disonante, ya que en el voluntario nº 9 se alcanzaron valores completamente fuera del rango lineal para los ensayos “rec y pit” de ambos kits 1 y 2 (valores > 45 µg/L), para el ensayo Immulite (valor > 40 µg/L), y ensayos ELISA y Luminex® (valores > 50 µg/L) en el punto de las

4 horas posteriores a la administración de rhGH en el segundo día (28 horas). Se evidencio en esta muestra mediante un rango de distintas diluciones con resultados discordantes la existencia de una interferencia. Como ya se ha explicado en el apartado de la sección 3, material y métodos, cuando alguna muestra daba en cualquiera de los métodos utilizados valores superiores al rango de análisis, se volvía a analizar la muestra pero con dilución previa. En este caso también si hizo así de esta manera, pero los resultados después de las diferentes diluciones practicadas, carecían de una absoluta linealidad, es decir diluciones de 1:10 se compararon con diluciones 1:20 y 1:50 de la misma muestra y los resultados que se obtenían no concordaban en absoluto no guardando linealidad respecto a las diluciones realizadas. No se realizo ningún estudio posterior sobre la interferencia observada y estos valores se eliminaron para cualquier procesamiento de datos, cálculos y evaluaciones posteriores.

La concentración promedio de la variante de 20 kDa hGH encontrada dentro del conjunto de muestras en las que solamente se podía encontrar hGH endógena fue de $0.021 \pm 0.015 \mu\text{g/L}$, se encontraba dentro de los márgenes esperables similares a intervalos de valores ya previamente informados en otros trabajos publicados de farmacocinética del medicamento rhGH (84), dando ahora aquí en este trabajo un valor promedio de la parte representativa de variante de 20 kDa como parte del total en suero de $10.7 \% \pm 4.2$.

Además del resultado anómalo mencionado anteriormente (voluntario 9) distintas muestras dieron valores muy elevados de

concentración de la variante de 20 kDa hGH. En el punto de tiempo de 28 horas, del ensayo clínico (2° día) algunas muestras mostraron concentraciones desproporcionadamente elevadas de 20 kDa (valores en los distintos casos entre $\sim 0.86 - 6.8 \mu\text{g/L}$), independientemente de la administración de rhGH y de los valores para la variante de 22 kDa, y estos valores fueron corroborados tanto en los ELISA realizados en Barcelona como en Tokio y también en el caso del análisis de las muestras por Luminex®, todos ellos métodos específicos con un Ab específico contra la variante de 20 kDa hGH. Este fenómeno observado no se confirmó en los resultados obtenidos en los inmunoensayos rec y pit del kit 1 y del kit 2, seguramente debido a que el mAb secundario de estos ensayos era específico para la variante de 22 kDa hGH (tal como se ha visto anteriormente en el capítulo de caracterización por SPR). Todos los resultados obtenidos están detallados en el anexo A de resultados.

Con tal de asegurar la correcta ejecución de la administración subcutánea se estudio el perfil farmacocinético para todos los voluntarios en el transcurso del 7° día con muestras obtenidas cada 2 horas y hasta las 12 horas para pasar en un salto a a las 24 horas. Con estas muestras una vez analizadas por distintos métodos sus concentraciones dieron el perfil expuesto en la figura 25. Tanto el inmunoensayo convencional muy utilizado en hospitales (Immulite-1000, figura 25, A) como con el ELISA específico para 22 kDa (figura 25, B) se muestran perfiles muy similares para todos los individuos, con una concentración máxima (C_{max}) a las $\sim 4-6$ horas después de la administración y cerca de los niveles basales 24 horas después de la administración. En valor promedio, los valores

medidos para la variante de 22 kDa en inmunoensayos específicos fueron 21.3 % inferiores que las correspondientes a las mediciones efectuadas con Immulite-1000 indicando una diferencia potencial en la capacidad de la superficie para ambos inmunoensayos, aunque en el caso del ELISA específico la reacción cruzada para la variante de 20 kDa es prácticamente inexistente mientras que en Immulite-1000 la casa comercial fabricante de los reactivos utilizados (Siemens-DPC) informa de una reacción cruzada de ~ 63 % hacia esta variante.

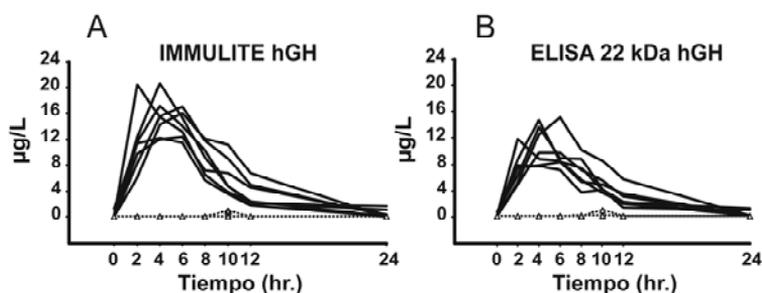


Figura 25.- Perfiles farmacocinéticos obtenidos para todos los sujetos por un método convencional de quimioluminiscencia (Immulite-1000, A en el gráfico) y un método específico por ELISA que solamente mide variante de 22 kDa hGH (B en el gráfico) utilizados para la cuantificación de hGH y de variante de 22 kDa hGH respectivamente en el 7° del ensayo clínico, desde 0 h a 24 h. Los triángulos abiertos con línea discontinua representan los niveles medidos en los 2 sujetos blancos o controles sin administración de rhGH.

No obstante con los valores fisiológicos presentes en circulación sanguínea de la variante de 20 kDa no explicarían en si mismo las diferencias únicamente debidas a esta causa.

La misma serie también se midió utilizando el método de Luminex® (datos expuestos en el anexo A de resultados) ofreciendo resultados similares a los obtenidos por ELISA y posteriormente confirmados con las demás muestras recogidas que eran representativas de un modelo “OFF-ON-OFF”, es decir modelo que se da en las situaciones de dopaje con rhGH. Los datos de farmacocinética se exponen en la tabla 19. Los datos de farmacocinética se ajustaron a los ya conocidos y publicados previamente (85).

Respecto a los datos obtenidos en el primer ensayo clínico si bien existían ligeras diferencias, la diferencia más importante se dio en las mediciones realizadas por Immulite-1000 en el denominado parámetro “area bajo la curva” (AUC) debido sin duda a la diferencia de concentración máxima alcanzada en este 7º día que es cuando se calculó (Cmaxc 7). En el primer ensayo clínico los 3 voluntarios alcanzaron concentraciones de ~ 30 µg/L (Immulite-1000) con cierta facilidad en el tercer día del ensayo (Cmax 3) y los tres además de forma muy homogénea (SD 3.02) mientras que ahora las concentraciones eran inferiores aunque más homogéneas en los tres métodos medidos que en el primer ensayo clínico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 19.- Valores promedio de farmacocinética (media \pm DS) obtenidos con diferentes métodos. AUC: área bajo la curva desde 0 a 24 horas. REC: constante de velocidad de eliminación. Cmax (T): concentración máxima durante los 7 días de administración con rhGH. Cmax (7): concentración máxima en el día 7° de tratamiento. Tmax (7): tiempo estimado de concentración máxima en el día 7°. Media $\frac{1}{2}$: vida-media. MRT: Tiempo medio de residencia (mean residence time).

Métodos	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{hr}\cdot\text{L}^{-1}$)	REC k	Cmax (T) ($\mu\text{g/L}$)	Cmax (7) ($\mu\text{g/L}$)
IMMULITE	116.39 \pm 14.69	0.284 \pm 0.045	23.600 \pm 4.671	16.557 \pm 3.376
ELISA	107.15 \pm 9.90	0.253 \pm 0.025	21.578 \pm 3.985	15.388 \pm 2.962
LUMINEX®	96.50 \pm 21.88	0.272 \pm 0.038	17.782 \pm 3.293	13.815 \pm 4.763
Métodos	Tmax (7) (hr)	Half 1/2 (hr)	MRT (hr)	
IMMULITE	4.57 \pm 1.51	2.50 \pm 0.46	5.58 \pm 0.64	
ELISA	4.57 \pm 1.51	2.76 \pm 0.29	5.56 \pm 0.59	
LUMINEX®	4.57 \pm 1.51	2.58 \pm 0.34	5.58 \pm 0.61	

4.2.2.2 Inmunoensayos específicos de variantes: Ratios 22 vs 20 kDa hGH.

Las concentraciones individuales para 22 y 20 kDa hGH se establecieron utilizando los dos métodos ELISA ya mencionados, el específico para la variante de 22 kDa hGH (mAb A36) y el específico para la variante de 20 kDa hGH (mAb D05). Posteriormente los datos obtenidos fueron corroborados por el método de FCMIA con el instrumento Luminex® con los mismos mAbs específicos A36 y D05 unidos a microesferas. Los resultados completos e individualizados se muestran en el anexo A de resultados.

Las concentraciones de 22 kDa hGH por debajo de 0.050 µg/L (el 5.4 % de resultados) no fueron considerados en ninguno de los cálculos ni en los gráficos, solamente en las tablas de resultados del anexo A se extrapoló el cálculo de la ratio con el valor de 0.050. Para los valores de 20 kDa hGH por debajo de 0.005 µg/L (30 %), igual que en el caso anterior, tampoco se tuvieron en cuenta a la hora de los cálculos o gráficos. Igualmente solo en las tablas de resultados del anexo A se extrapoló el cálculo de la ratio con el valor de 0.005.

Las ratios entre las variantes de 22 y 20 kDa hGH se representan en la figura 26. Como valor de corte o “cut-off” se utilizó el valor ya comentado anteriormente de 29.82 (ver apartado del primer ensayo clínico) obtenido a partir de los datos publicados por Irie *et al.*(132). Con este valor de corte se obtenía aplicando 3.7 SD un riesgo potencial con una tasa de 1 en 10000 de falsos positivos. Este valor está indicado en la figura como una línea horizontal negra en el

gráfico de la figura 26. Todas las ratios de los sujetos blanco o control dieron por debajo del valor de corte, y no se observaron alteraciones a lo largo de la fase del estudio. En dos casos se dieron valores de 20 kDa $< 0.005 \mu\text{g/L}$ que iban acompañados por valores de 22 kDa (0.144 y 0.135) cercanos al valor de $0.150 \mu\text{g/L}$, valor que sería el teórico para el cual un valor de 20 kDa en el límite de $0.005 \mu\text{g/L}$ daría una ratio comprometida por encima del valor de corte. No obstante en estos casos y ante una prueba o test de detección no podría darse un falso-positivo ya que no es posible cuantificar una ratio con valores inferiores a el LOQ del método(305). En todos los voluntarios (excepto el voluntario 8) se presentaron en el punto de obtención de muestra de 28 horas valores anormalmente elevados de la variante de 20 kDa hGH (valores entre ~ 0.170 y $6.8 \mu\text{g/L}$) sin ninguna relación con la administración de rhGH. Estos datos solo afectaban a los inmunoensayos realizados con el mAb D05. No se pudo encontrar ninguna anomalía ocurrida durante el ensayo clínico ya que este estuvo controlado por personal sanitario especializado y por lo tanto cualquier incidencia ocurrida quedaba registrada y/o monitorizada, por lo que una vez revisado el libro de incidencias no se pudo encontrar ninguna explicación sólida a este fenómeno observado. Como era de esperar, estos valores elevados en el denominador del cociente de la ratio hacían que esta disminuyese su valor, por lo que en estos casos únicamente se obtenían resultados falso-negativos en los voluntarios a los que les había administrado rhGH ya que estos casos correspondían a las 4 horas post-administración.

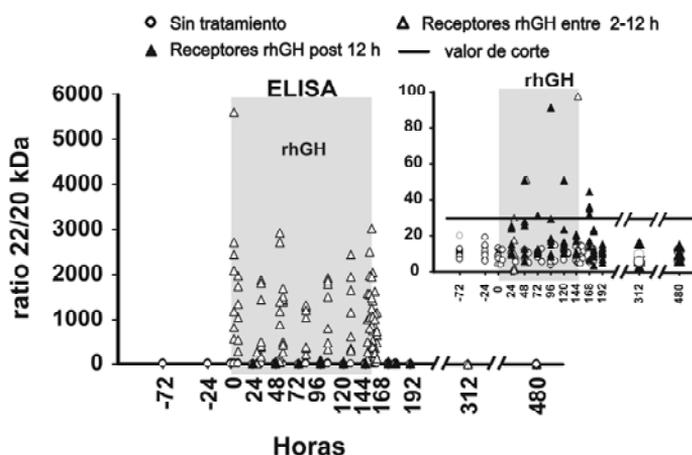


Figura 26.- Las ratios obtenidas con el método de ELISA específico. Los triángulos abiertos representan los puntos de 2 a 12 horas post-administración de rhGH, los triángulos negros representan los puntos correspondientes a las 24 horas post-administración de rhGH y también a los 2, 7 y 14 días después de finalizar el tratamiento, los círculos abiertos representan a los puntos de los sujetos control o blancos sin administración de rhGH y de los sujetos receptores de tratamiento con rhGH pero antes de iniciar el tratamiento. La línea horizontal negra muestra el valor de corte o “cut-off” de 29.82. Los trozos insertados en la parte derecha corresponden a la zona ampliada con ratios por debajo de 100.

En todos los voluntarios del ensayo clínico, siguiendo a la administración de rhGH, todas las ratios estaban notablemente alteradas, alcanzando valores de las ratios muy por encima de 1000 y en muchos casos con ratios máximas a las 4 h después de la administración de rhGH. En general, las ratios estaban completamente restablecidas a sus valores iniciales después de las 24 horas, aunque en algunos casos estos estaban todavía algo por encima del valor de corte.

Tal como ya se ha comentado en el primer ensayo clínico en esta aproximación por la ratio 22/20 kDa la enorme amplitud observada en los valores de la ratio entre 2 y 12 horas tras la administración de rhGH (en el rango de entre ~ 51 y 5600 para el inmunoensayo de ELISA y entre ~ 35 y 2360 para el de Luminex®) debería al menos (frente a la otra aproximación) favorecer su posible potencial discriminatorio. Con el método de la segunda aproximación (ILMA) estos valores de la ratio se deberían encontrar dentro un margen de amplitud mucho más reducido.

Calculando en valores promedio la presencia de si existía “feed-back” negativo en las concentraciones de la variante de 20 kDa hGH ante la administración de rhGH se apreciaba ligeramente su existencia aunque la dosis administrada no producía un efecto claro en todos los voluntarios del ensayo clínico. La presencia o no de este efecto no debería causar en si en el método de detección del abuso de hGH ningún defecto en cuanto a la aparición de posibles falso-negativos o falso-positivos. Se trataría en todo caso más de un problema de sensibilidad del método y no de que este efecto afectara directamente a la ratio.

4.2.2.3 Inmunoensayos diferenciales de variantes: ratio rec/pit hGH.

No todas las muestras recogidas se pudieron analizar con los inmunoensayos rec/pit y por ello las muestras a analizar se seleccionaron para cubrir los puntos de tiempo más relevantes, es decir principalmente aquellos tiempos donde se esperaban

concentraciones que estuvieran por encima o cerca del LOQ para cada método. Estos puntos se consideraron en su momento que fueran a las 4 horas después de la administración de rhGH en el 2° día, a las 6 y 12 horas después de la administración de rhGH en el día 7°, y en las muestras correspondientes a las 24 después de cada dosis administrada diariamente y a las 48 horas (2° día) del periodo de lavado después de haber finalizado el tratamiento con rhGH. También se incluyeron los puntos del día antes de iniciarse el ensayo clínico y los puntos del día 14° después de haber finalizado el tratamiento con rhGH. Las ratios calculadas se muestran en las figuras 27 para el kit 1 y 28 para el kit 2, y todos los datos se incluyen en el anexo A de resultados.

Los valores de corte de la ratio rec/pit para sujetos varones de 1.81 para el kit 1 y 1.68 para el kit 2, corresponden a los establecidos por la WADA(305), actualmente aplicados en los laboratorios antidopaje en todo el mundo e indicada en las figuras 27 para el kit 1 y 28 para el kit 2. El punto correspondiente a las 28 horas para el individuo 9 que ya ha sido comentado anteriormente fue descartado debido a que las lecturas eran muy superiores al rango lineal del método y se descartaron para cualquier tipo de cálculo y no se representan en ningún gráfico.

Todas las muestras pertenecientes a sujetos tratados con rhGH correspondientes a las 4, 6 y 12 horas post administración dieron ratios claramente por encima del nivel de corte establecido. En el caso de 24 horas post-administración diferentes puntos dieron por encima del valor de corte (3 valores para el kit 1 y 14 valores para el kit 2). Sin embargo cuando la interpretación de la ratio se

combinó conjuntamente con las obtenidas por ambos kits para una valoración conjunta, solo 6 valores de los 49 puntos posibles post-24 horas se podían considerar como positivos en su interpretación. Con las dos ratios combinadas, no se encontraron resultados positivos a las 48 horas después de haber finalizado la última administración. La WOO para este método estaba descrita de entre 24 y 36 horas(281) pero posteriormente fue matizada y en dependencia de la dosis suministrada y del sexo, podía variar y estar en varones con dosis de 0.033 mg/kg/día aproximadamente alrededor de 18 horas (en este trabajo 0.026 mg/kg/día)(98). Parece bastante claro que en la combinación de ambos kits, el kit 1 ofrecía ratios más conservadoras, pero también daba el contrapeso apropiado a las ratios dadas como falsos-positivos por parte del kit 2, como se puede observar en las figuras 27 y 28.

Así pues, el kit 1 (ver figura 27) no dio ningún falso-positivo pero también dio menos ratios positivas 24 horas después de la administración de rhGH. Con el kit 2 tres valores pertenecientes a voluntarios antes de que iniciasen el tratamiento (sujetos 1, 5 y 6) resultaron por encima del valor de corte con ratios de 2.48, 1.93, y 2.40. Una vez más se ponía de manifiesto la menor discriminación del kit 2 (tal como ya se ha comentado en el apartado de caracterización de Abs). En este caso sin la valoración conjunta de los dos kits se hubiera podido incurrir en la peor de las situaciones en el ámbito deportivo, dar un resultado falso-positivo y con ello acusar a un deportista inocente.

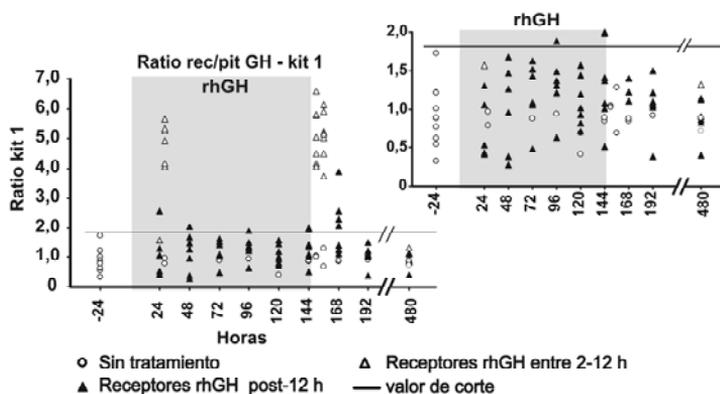


Figura 27.- Ratios obtenidas con el kit 1 ILMA del inmunoensayo diferencial de isoformas de hGH. Los triángulos abiertos corresponden a puntos desde las 4 horas (días 2 y 6) hasta 12 horas (día 7) post- administración de rhGH, los triángulos sólidos de color negro corresponden a puntos de 24 horas post-administración de rhGH y a los 2 y 14 días después de finalizar el tratamiento, los puntos abiertos corresponden a sujetos que no han recibido rhGH, es decir sujetos blancos y también receptores de rhGH pero antes de iniciar el tratamiento de 7 días con rhGH. La línea horizontal muestra los valores de corte de 1.81 para el kit 1. La zona derecha de la imagen incluye una ampliación con las ratios de hasta 2.0.

Con el kit 1 estas ratios fueron contrarrestadas con ratios de 0.88, 1.01, y 1.21, respectivamente, salvándose la situación que en el ámbito deportivo de haberse producido hubiera sido dramática. También con el kit 2 cinco valores de ratio correspondientes todos ellas al periodo de lavado del voluntario 6 (a los 2 y 14 días de haber finalizado el tratamiento con rhGH) y del voluntario 8 (a los 2 y 14 días de haber finalizado el tratamiento con rhGH) y una del voluntario 9 (al 2º día) también resultaron con valores de ratio por encima del valor de corte. No obstante, las ratios obtenidas del kit 1 impidieron dar una evaluación positiva.

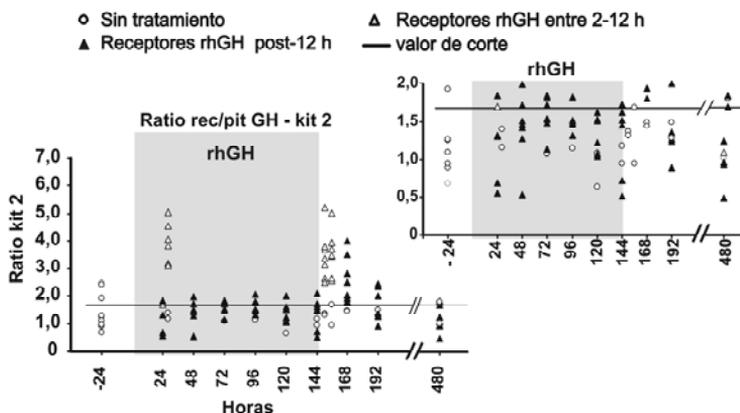


Figura 28.- Ratios obtenidas con el kit 2 ILMA del inmunoensayo diferencial de isoformas de hGH. Los triángulos abiertos corresponden a puntos desde las 4 horas (días 2 y 6) hasta 12 horas (día 7) post-administración de rhGH, los triángulos sólidos de color negro corresponden a puntos de 24 horas post-administración de rhGH y a los 2 y 14 días después de finalizar el tratamiento, los puntos abiertos corresponden a sujetos que no han recibido rhGH, es decir sujetos blancos y también receptores de rhGH pero antes de iniciar el tratamiento de 7 días con rhGH. La línea horizontal muestra los valores de corte de 1.68 para el kit 2. La zona derecha de la imagen incluye una ampliación con las ratios de hasta 2.0.

También por último con el kit 2 (ver figura 28), dos ratios aisladas pertenecientes a dos voluntarios blanco o control que no habían recibido rhGH (voluntarios 4 y 7) dieron 1.69 y 1.79 respectivamente, justo por encima del valor de corte, pero fueron contrarrestadas por las correspondientes ratios del kit 1 (1.28 y 0.88).

En general, de forma consistente no aparecieron muestras como falso-positivos al utilizar conjuntamente la valoración de las ratios con los dos kits.

Tal como ya se ha visto en la caracterización por SPR la respuesta absoluta del mAb AK566 (kit 1, “diferencial rec”) frente a 22 kDa hGH era más elevada que la del otro mAb AK568 (kit 2, “diferencial rec”). En los otros dos inmunoensayos “diferenciales pit”, los mAbs de captura daban en cambio respuestas de la misma magnitud para el phGH y para la variante de 22 kDa hGH. La diferente avidéz y afinidad sería la que determinaría la cantidad de 22 kDa hGH a capturar. Todo ello hace que las características acerca del comportamiento del kit 1 sean de mayor poder conservador o mayor poder discriminante. A partir de estos datos, la suma de la selección previa efectuada por los distintos mAbs de captura y la característica del mAb secundario sería determinante en condiciones fisiológicas, pero en condiciones de abuso de hGH, un exceso de la variante de 22 kDa hGH haría que el par de mAbs del kit 1 (AK566/AK565) presentara un poder de selección más fuerte.

4.2.2.4 Discrepancias entre las dos distintas aproximaciones.

Cuando los resultados del kit 1 y del kit 2 se compararon teniendo en cuenta sus respectivos valores de corte, se obtuvo una concordancia de aproximadamente ~ 75 % (83 de un total de 110 resultados) en la interpretación del test. De las veintisiete ratios discordantes, diez correspondían a aquellas descritas anteriormente en el apartado anterior (tres antes de iniciar el tratamiento, cinco correspondientes al periodo de lavado y dos pertenecientes a voluntarios blanco o control) y las otras 17 correspondían a puntos

24 horas post-administración de rhGH, siendo esto último equivalente a que en muchos de estos puntos los valores medidos correspondían a valores cercanos al LOQ para los dos kits. En los mismos puntos de tiempo, es decir a las 24 h, 6 ratios estaban por encima del valor de corte respectivo para ambos kits y 26 ratios fueron negativas en ambos inmunoensayos. La decisión combinada (con el kit 1 y el kit 2) se comparó con los resultados obtenidos de la otra aproximación a partir de las ratios de 22/20 kDa dando concordancias de aproximadamente ~ 92 % (101 casos sobre los 110 totales comparables). Se debe enfatizar que de los 9 resultados discrepantes, 5 correspondían a las muestras del punto de tiempo de 28 horas que presentaron resultados para la variante de 20 kDa hGH desproporcionadamente elevados como ya se ha comentado anteriormente y los 4 restantes correspondían a puntos de tiempo de 24 horas después de la administración diaria de rhGH. Como tal, en todos los inmunoensayos que han sido ahora probados, el punto de tiempo de 24 horas después de la administración de rhGH era el que ofrecía las mayores discrepancias, siendo este punto de 24 horas post administración crítico en las dos aproximaciones con ratios distintos.

4.2.2.5 Comparación de los diferentes métodos de inmunoensayo utilizados.

Con tal de conseguir una mayor comprensión se evaluó la similitud de los resultados obtenidos con los diferentes inmunoensayos, para poder conocer si estos median estructuras similares. La

concordancia de datos (concentraciones) entre los valores obtenidos de concentración a partir de los inmunoensayos ILMA rec y pit de los kits 1 y 2, y también de los valores obtenidos con Immulite, así como también de los resultados obtenidos por los inmunoensayos específicos para las variantes de 22 kDa hGH y 20 kDa hGH (ELISA y Luminex®) se evaluó mediante B.A., y también como dato complementario se analizó la dependencia lineal entre cada par de métodos por medio del test de correlación P.r.

Las concentraciones medidas de la variante de 20 kDa hGH con ELISA y Luminex® presentaban un valor de correlación P.r. de 0.989 y un bias B.A. de -8.6% , no obstante esto parecía ser algo esperable dado que en ambas metodologías se utilizaban exactamente los mismos mAbs específicos de captura y el mismo mAb secundario de lectura. Las correlaciones entre las concentraciones de la variante de 20 kDa con los dos inmunoensayos pit (kit 1 y kit 2) mostraban valores muy bajos con P.r. en el rango desde 0.275 a 0.330 y valores de bias para B.A. desde -34.9 a $+49.8\%$. Estos resultados eran también del todo esperados teniendo en cuenta las características por SPR del mAb secundario que se utiliza en los inmunoensayos pit que hace que en la lectura final solo se tengan en cuenta las variantes de 22 kDa hGH capturadas.

Se observaron correlaciones altas entre los dos inmunoensayos rec, la variante de 22 kDa hGH por ELISA y Luminex® y también Immulite, con correlaciones P.r. entre 0.927 y 0.998 y valores de bias de B.A. entre -9.5 y $+3.5\%$. Los dos inmunoensayos pit correlacionaron bien entre ellos con valores P.r. de 0.902 y valores

B.A. de + 4.2 %. Sin embargo, cuando ambos inmunoensayos pit se compararon con los inmunoensayos que median específicamente la variante de 22 kDa hGH, los valores P.r. daban rangos más pobres desde 0.776 a 0.818 y valores de B.A. desde - 13.2 a + 4.8 % para el inmunoensayo pit 1, y valores P.r. desde 0.944 a 0.962 con valores de B.A. desde - 17.9 a + 9.0 % para el inmunoensayo pit 2. Tal como parecía anticipado, según los datos obtenidos de la evaluación de los Abs por SPR, los inmunoensayos pit, debido a sus características cinéticas distintas (k_a y k_d) podrían estar midiendo también de forma distinta en función de la composición de la muestra y este efecto era más pronunciado para el kit 1. Dada esta premisa, las muestras pertenecientes a los voluntarios que recibieron durante 7 días rhGH se podían dividir claramente en dos poblaciones distintas; una en la cual solamente hubiera variantes de hGH endógenas presentes y otra población en la cual las muestras contendrían sobre todo una importante cantidad de hGH con pico exógeno de rhGH recién administrada. Solamente aquellas muestras con valores superiores al LOQ fueron evaluadas y los resultados de B.A. y P.r. más relevantes se exponen en la tabla 20.

Habiendo fraccionado el conjunto de muestras en estas dos poblaciones, todos los valores de P.r. dieron correlaciones entre aceptables a excelentes (ver tabla 20). Con estas dos poblaciones la hipótesis (ver el apartado de resultados de caracterización por SPR) se confirmaba. Los dos inmunoensayos pit, del kit 1 y kit 2 unían distintas variantes de hGH resultando de ello cantidades diferentes de 22 kDa hGH capturada.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 20.-- Comparación entre inmunoensayos rec y pit (kit 1 y kit 2), ELISA e Immulite-1000. N son el nº de pares de procesados. El test B.A. describe el % de bias de diferencias encontradas del ensayo 1 *versus* el ensayo 2. IC corresponde al intervalo de confianza.

Ensayo 1	Ensayo 2	B.A. Bias (%) (IC 95 %)	Pearson (r) (IC 95 %)	N
Puntos de tiempo con hGH endógena				
<i>Pit</i> kit 1	<i>Pit</i> kit 2	+ 8.0 (- 6.6 to + 22.5)	0.992 (0.986-0.996)	41
<i>Rec</i> 1 kit	<i>Pit</i> kit 1	- 2.9 (- 18.2 to + 12.3)	0.945 (0.899-0.971)	41
<i>Rec</i> 2 kit	<i>Pit</i> kit 1	- 2.0 (- 18.1 to + 14.0)	0.956 (0.918-0.976)	41
ELISA 22 kDa	<i>Pit</i> kit 1	+ 11.6 (- 12.3 to + 35.5)	0.938 (0.884-0.968)	38
Immulite (GH)	<i>Pit</i> kit 1	- 4.6 (- 22.8 to + 13.7)	0.966 (0.886-0.990)	13
<i>Rec</i> 1 kit	<i>Pit</i> kit 2	+ 5.0 (- 11.5 to + 21.5)	0.966 (0.937-0.982)	41
<i>Rec</i> 2 kit	<i>Pit</i> kit 2	+ 5.9 (- 11.2 to + 23.0)	0.968 (0.940-0.983)	41
ELISA 22 kDa	<i>Pit</i> kit 2	+ 20.6 (- 5.5 to + 46.8)	0.960 (0.924-0.979)	38
Immulite (GH)	<i>Pit</i> kit 2	+ 4.8 (- 13.2 to + 22.7)	0.986 (0.953-0.996)	13
Puntos de tiempo con hGH endógena + exógena (Entre 4 y12 horas después de administrar rhGH)				
<i>Pit</i> kit 1	<i>Pit</i> kit 2	- 6.8 (- 11.7 to - 2.0)	0.947 (0.869-0.979)	20
<i>Rec</i> kit 1	<i>Pit</i> kit 1	+ 20.2 (+ 13.9 to + 26.5)	0.961 (0.902-0.985)	20
<i>Rec</i> kit 2	<i>Pit</i> kit 1	+ 22.0 (+ 15.7 to + 28.4)	0.954 (0.884-0.982)	20
ELISA 22 kDa	<i>Pit</i> kit 1	+ 19.7 (+ 10.7 to + 28.6)	0.870 (0.696-0.948)	20
Immulite (GH)	<i>Pit</i> kit 1	+ 22.6 (+ 16.3 to + 28.8)	0.944 (0.862-0.978)	20
<i>Rec</i> 1 kit	<i>Pit</i> kit 2	+ 13.4 (+ 7.6 to + 19.3)	0.914 (0.793-0.966)	20
<i>Rec</i> 2 kit	<i>Pit</i> kit 2	+ 15.3 (+ 9.3 to + 21.2)	0.919 (0.803-0.968)	20
ELISA 22 kDa	<i>Pit</i> kit 2	+ 12.9 (+ 5.9 to + 19.8)	0.901 (0.762-0.960)	20
Immulite (GH)	<i>Pit</i> kit 2	+ 15.8 (+ 11.5 to + 20.2)	0.961 (0.901-0.985)	20

Cuando las dos poblaciones ya comentadas se compararon (ver tabla 20), solo para los inmunoensayos pit, se observó por el test B.A. una cuantificación intercambiada.

Bajo circunstancias solo endógenas de hGH el inmunoensayo pit 1 capturaba aproximadamente un + 8 % más (bias de B.A.) que pit 2, y esta situación se invertía completamente con un - 6.8 % (bias de B.A.) bajo condiciones en las que solamente la variante de 22 kDa hGH (rhGH) exógena prevalecía. Los otros datos de correlación P.r. para pit 1 no parecían mostrar ninguna tendencia en particular bajo condiciones endógenas mientras que para pit 2 ya se observaba un promedio de bias negativo de manera consistente en el análisis B.A. de alrededor de ~ 10.2 %. Este fenómeno fue posteriormente magnificado bajo condiciones de administración de rhGH en concentraciones pico de 22 kDa.

Para el inmunoensayo de pit 2 la diferencia se incrementó hacia un promedio de bias B.A. de - 14.3 % y para el inmunoensayo pit 1 el promedio de bias B.A. resultó ser de - 21.1 %. Estos datos se expresan en el gráfico en la figura 29 donde se visualiza una separación de corte clara entre estas poblaciones de datos (figura 29, línea A: hGH endógena y línea B: rhGH exógena entre 4-12 horas post-administración rhGH).

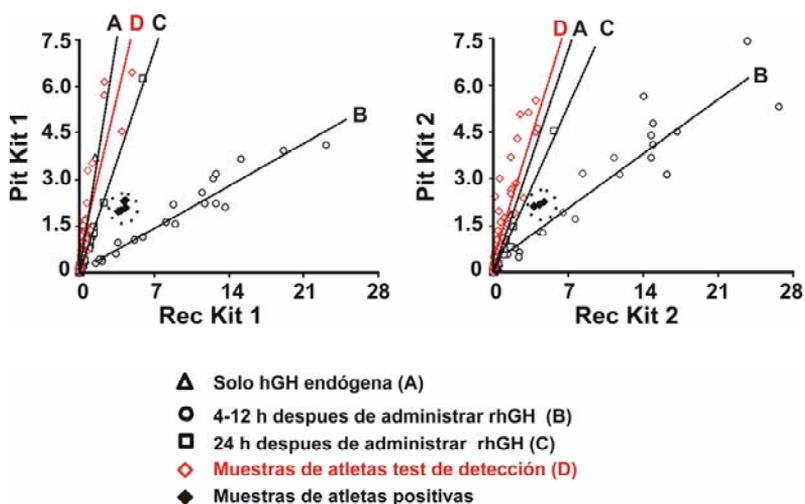


Figura 29.- Diferentes series de muestras separadas según: presencia de solamente variantes endógenas de hGH (triángulos abiertos: línea A), presencia de hGH endógena más picos de hGH exógena entre 4 y 12 horas después de la administración de rhGH (círculos abiertos: línea B), presencia de hGH endógena más picos de hGH exógena 24 horas después de la administración de rhGH (círculos abiertos: línea C). La línea D corresponde a puntos de pruebas de detección realizadas en atletas. Los puntos de rombos color negro enmarcados en un círculo corresponden a resultados evaluados como positivos en atletas. Las líneas representan la tendencia de las respectivas concentraciones en cada serie sub-dividida.

Los puntos de tiempo pertenecientes a las 24 horas después de la administración diaria de rhGH también fueron evaluados y la tendencia observada se movía en la dirección de la correlación de puntos de hGH endógena (figura 29 línea C *versus* línea A).

Los datos también fueron contrastados frente a otras muestras analizadas bajo condiciones oficiales de control anti-dopaje no pertenecientes a este ensayo clínico con resultados que resultaron evaluados como negativos, incluso con algunas muestras con

valores de rec y pit tan elevados como de 13-15 $\mu\text{g/L}$ pero siempre con ratios < 1.00 . Estos datos (figura 29, línea D) tenían una dependencia lineal muy cercana a la que expresaba la situación solamente endógena (figura 29, línea A) y la tendencia de los dos grupos era muy similar. Las respectivas tendencias se podían expresar también con coeficiente de correlación r^2 y su correspondiente ecuación en formato $y = ax + b$ (ver tabla 21). El factor de la pendiente (ver tabla 21) de las diferentes líneas representadas en la figura 29 (A, B, C y D) era un factor determinante con el cual también se podían clasificar los diferentes grupos.

Tabla 21.- Correlaciones lineales (r^2) y sus respectivas ecuaciones (expresadas como $y = ax + b$) y que corresponden a: valores de atletas de élite, muestras endógenas en las que solo están presentes variantes de hGH fisiológicas, muestras con rhGH administrada entre 4 y 12 horas antes y finalmente muestras con rhGH administrada 24 horas antes.

KIT 1		
Tipo de muestra	r^2	Ecuación $y = ax + b$
Atletas	0.866	$y = 1.454x + 0.510$
Endógenas	0.894	$y = 2.271x - 0.097$
rhGH 4-12 h	0.924	$y = 0.195x + 0.071$
rhGH 24 h	0.988	$y = 1.024x - 0.025$
KIT 2		
Tipo de muestra	r^2	Ecuación $y = ax + b$
Atletas	0.951	$y = 1.106x + 0.389$
Endógenas	0.937	$y = 1.023x - 0.024$
rhGH 4-12 h	0.844	$y = 0.250x + 0.308$
rhGH 24 h	0.978	$y = 0.758x - 0.021$

En estos dos últimos años en nuestro laboratorio se ha dado un resultado positivo de abuso de hGH, resultado que se recomprobó mediante varias repeticiones, tanto con el kit 1 como con el kit 2, y

estas y todas estas repeticiones se incluyen como puntos en la figura 29 enmarcados en un círculo (rombos negros).

Estos valores aislados (sin representación de línea de tendencia) se encontraban entre las respectivas líneas de tendencia de los valores del grupo de 4-12 horas post-administración de rhGH (línea B) y de los valores del grupo de 24 horas post-administración de rhGH (línea C), aunque estos valores dados como positivo estaban mucho más cercanos a la línea de tendencia del grupo de 24 horas post-administración (ver figura 29, líneas B y C). Evidentemente, esta separación de poblaciones se debería poder aplicar para fortalecer como prueba en una situación verdadera de delito de abuso de hGH en el ámbito deportivo como un nuevo componente complementario. En suma para la ratio que debería indicar esta infracción, ya la propia correlación en sí de las concentraciones respectivas de rec y pit deberían estar además contribuyendo como una auténtica prueba de cargo que constituiría ya inicialmente en si misma la ratio rec/pit.

4.2.2.6 Discusión.

En esta parte del trabajo se han comparado los distintos inmunoensayos disponibles hasta ahora, desarrollados específicamente para detectar el uso ilícito de hGH en el ámbito del deporte, utilizando una serie de datos consecutivos y obtenidos por medio de ensayos clínicos autorizados. Es la primera vez que todas las herramientas disponibles actualmente para la detección directa

del abuso de hGH se comparan lo cual debería ser de gran valor para permitir un punto de vista uniforme con respecto al resultado del test de detección de hGH. El perfil farmacocinético obtenido sobre la administración de rhGH era similar en su conjunto a los ya previamente publicados que indicaron que la administración al menos en el día 7^o era correcta para todos los voluntarios participantes en el ensayo clínico(85;304;306) y por lo tanto garantizando la validez de esta serie de datos.

En la aproximación mediante el uso de la ratio 22/20 kDa quedaba en evidencia que el punto débil estaba en la evaluación de la variante de 20 kDa de hGH. Esta variante en si misma es difícil de detectar ya que se encuentra solamente presente de un 3 a un 15 %(31) bajo circunstancias fisiológicas con respecto a la variante de 22 kDa hGH, la variante de hGH más abundante

Evidentemente, la química de acoplamiento por grupos amina, que se utilizo para generar los chips de SPR con Abs inmovilizados en las superficies para atraer moléculas concretas no era equivalente a la estrategia de inmovilización pasiva utilizada en la producción de muchas placas de ELISA. No obstante, ambas preparaciones compartían el elemento de aleatoriedad en la inmovilización para lo cual el comportamiento observado durante los experimentos de SPR podía bien explicar las cerca del 31 % de mediciones de la variante de 20 kDa hGH por debajo del LOQ. No hay duda respecto que la mejora en la aproximación por la ratio de 22/20 kDa deberá venir dada obligatoriamente en mejorar y mucho las condiciones de orientación de este mAb utilizando o bien este mismo mAb o si no mediante otros mAbs con mejores propiedades de superficie.

Habiendo ya comentado este punto, con la baja concentración de la variante de 20 kDa en condiciones fisiológicas también reside una de las fortalezas de esta aproximación. Con la ratio endógena de 22/20 kDa condicionada fuertemente por la proporción de 20 kDa como parte de la cuantificación total en suero, que parece ser lo suficientemente constante para todas las condiciones estudiadas hasta ahora (31), cualquier aumento sutil en la variante de 22 kDa debería convertirse en si mismo en un cambio muy claro de la ratio para el valor de corte. Ciertamente, incluso con un valor de ratio en el valor de corte riguroso como el umbral de detección de 29.82, los valores de 12 horas después de la administración estaban todavía en el rango entre varios cientos y varios miles. Este rango amplio en la ratio ciertamente favorecería el potencial discriminatorio de esta aproximación. Solamente en el caso de valores de concentración de la variante de 20 kDa hGH por debajo del valor LOQ (0.005 µg/L), acompañado por un valor endógeno de 22 kDa de hasta 0.150 µg/L o superior, podría acabar resultando un valor de falso-positivo. Aun así este falso-positivo no saldría sin más a la luz para el caso de esta aproximación. Se requeriría además otra prueba posterior de confirmación del resultado, punto obligado por la WADA, y en la que además deberán intervenir otros mAbs distintos y/o otra metodología. No obstante, acerca de este último punto en relación a un valor por debajo del LOQ, los resultados siempre deberían ser evaluados como resultados negativos sin tener en cuenta la ratio obtenida a partir de una extrapolación, tal como se ya se viene haciendo actualmente con la otra aproximación (método oficial) siguiendo las normas de la WADA(305). Se encontraron valores

elevados de 22 kDa hGH después de la administración de rhGH tal como era de esperar. Un valor, sin embargo, 4 horas después de la segunda administración (tiempo de 28 horas) dio concentraciones de esta variante de hGH claramente muy por encima del rango linear de medición para todos los métodos realizados que median esta variante. Este valor indicaba claramente, por la falta de linearidad en las diferentes diluciones llevadas a cabo, que era debido a una interferencia. También valores similares con picos de hGH-endógenos se han observado cuando se han administrado secretagogos de hGH (307). Los valores de la variante de 20 kDa hGH que acompañaban también resultaron ser muy elevados (aproximadamente de 1 $\mu\text{g/L}$) existiendo la posibilidad de un aumento repentino a modo de ráfaga endógena pero esto no pudo posteriormente verificarse como un punto de tiempo coincidente con el pico de concentración después de la administración exógena antes citado. Sorprendentemente, en este punto de tiempo se observaron otros valores disonantes anormalmente elevados en este caso para la variante de 20 kDa hGH en distintos voluntarios, valores independientes de la administración de rhGH del día. Una observación posterior aislada de un valor elevado de 20 kDa hGH en un punto (2 horas después de la administración de hGH en el séptimo día en un solo voluntario) coincidía también con el pico que correspondía a la administración exógena de rhGH. Estas anomalías se corroboraron en los dos inmunoensayos específicos para 20 kDa, pero no estaban presentes en cambio, lógicamente, en los inmunoensayos que median solamente la variante de 22 kDa hGH (los inmunoensayos específicos para 22 kDa ELISA y

Luminex® y los inmunoensayos diferenciales de isoformas de hGH, rec y pit) ya que todos ellos, como se vio en la caracterización por SPR, no median la variante de 20 kDa hGH. No ha sido posible proporcionar explicaciones sólidas a estos hechos basadas o fundamentadas en hechos demostrables con pruebas empíricas. Se revisaron por parte del personal especializado que había llevado a término el ensayo clínico todas las anotaciones del libro de monitorización, medicación comidas bebidas, actividades, entre otras sin que se encontrara motivo alguno que explicara los hechos. Por otra parte en el caso de estas anomalías en los análisis de la variante de 20 kDa hGH nada hacia pensar al ocurrir en la mayoría de voluntarios (no como en la anteriormente citada de 22 kDa solamente ocurrida en uno solo) que hubiera una causa en la administración subcutánea de Genotonorm®. Solamente por eliminación quedaba el pensar que la causa pudiera estar en una contaminación “*in vitro*” en los tubos de extracción de muestra aunque este punto nunca se ha podido demostrar. Parece claro que estos valores elevados de la variante de 20 kDa hGH nunca podrían ir en contra del atleta ya que en todos los casos posibles este valor solamente incrementaría el valor endógeno propio y por lo tanto decrecería el valor de la ratio. Ciertamente, cuando las ratios de 22/20 kDa se compararon con aquellas procedentes de los inmunoensayos rec y pit, cuatro de las discrepancias observadas se debieron a la elevada concentración de 20 kDa hGH. Un aspecto relacionado que merece ser mencionado es la existencia de un esperable “*feed-back*” negativo en conjunto, en la secreción endógena de la variante de 20 kDa hGH ante el aumento de 22 kDa

hGH debido a la administración exógena. Esta observación fue muy suave o sutil lo cual podría relacionarse también con la dosis utilizada de rhGH. En un estudio publicado en el que se realizó un estudio sobre la farmacocinética de la rhGH (85) ya se informó también acerca de un “feed-back” parecido pero en este caso se observó solo en mujeres con dosis de rhGH (0.033 mg/kg/día) ligeramente superiores a las utilizadas en este trabajo (0.026 mg/kg/día). En otro trabajo previo al ya citado(84) se observó un descenso significativo en las concentraciones de la variante de 20 kDa hGH, aunque en este caso se utilizaron dosis de rhGH mucho más elevadas.

Cuando los diferentes datos se enfrentaron a comparación con los de los inmunoensayos diferenciales de isoformas de hGH (“diferencial rec” y “diferencial pit”) solamente los valores para la variante de 22 kDa correlacionaron satisfactoriamente con los inmunoensayos que median “diferencial rec” y en menor extensión con los inmunoensayos que median “diferencial pit”.

Inicialmente parecía que los resultados de los inmunoensayos rec y pit deberían tener una interpretación teórica sencilla, el ensayo rec mediría la variante de 22 kDa y el ensayo pit mediría además otras variantes hipofisarias. En realidad las ratios calculadas para los sujetos blanco sin terapia de rhGH y para la mayoría de valores pertenecientes a la fase de pre-administración de los otros sujetos estaban en ratios de entre ~ 0.9 (kit 1) y ~ 1.2 (kit 2), es decir que en los dos casos la ratio estaría alrededor de 1.00. Pero en los análisis efectuados como pruebas de detección en atletas de élite, los ratios tanto del kit 1 como del kit 2 se mueven normalmente cerca de 0.5.

El hecho de que ambos inmunoensayos tengan como objetivo la variante más abundante (ya que ambos comparten el mAb secundario específico para la variante de 22 kDa) es beneficioso desde la perspectiva de la sensibilidad. Efectivamente, todas las muestras se pudieron analizar y medir (excepto una) aunque teniendo en cuenta que las actuales recomendaciones de la WADA (305) los distintos valores de rec, tanto de un kit como de otro, por debajo de 0.100 $\mu\text{g/L}$ obtenidos con los inmunoensayos diferenciales rec deben ser informados como negativos independientemente del valor de la ratio obtenida. La ratio como valor de corte está colocada entre $\sim 1.6-1.8$ para los sujetos varones (valores de corte ligeramente inferiores para mujeres) y la ratio máxima encontrada en los valores máximos de 22 kDa hGH alcanzaron valores de hasta 6.59 en este ensayo clínico con el régimen de administración de rhGH de este estudio. Este estrecho margen de cuatro unidades (de $\sim 1.6-1.8$ a 6.59) debería ser siempre favorable al deportista ya que pequeños cambios en la concentración no deberían alterar suficientemente la ratio para que exceda el valor de corte. Cuando los Abs fueron caracterizados por SPR la observación más importante resultó ser que el mAb secundario (AK569) era la clave ya que se empleaba en todos los inmunoensayos como mAb secundario y al ser absolutamente específico para la variante de 22 kDa de hGH, confería a los cuatro inmunoensayos una característica común. Como tal, en última instancia los cuatro inmunoensayos rec y pit proporcionaban una concentración para la variante de 22 kDa que solo era dependiente del perfil de unión, es decir de las características de afinidad y

avidez de cada mAb de captura para esta variante de hGH. Efectivamente los cuatro mAbs de captura reconocían distintas variantes de hGH en diferente amplitud y con diferencias en las cinéticas de velocidad. Se podía establecer que los mAbs de los inmunoensayos rec tenían interacciones fuertes y más estables que la parte homóloga hipofisaria y conforme a que los dos mAbs pit no reaccionaban de forma distinta, las diferencias observadas en los mAbs rec no podían ser debidas solamente a diferencias en las concentraciones. Ambas preparaciones (variante de 22 kDa y phGH) deberían diferenciarse, bien estructural o bien espacialmente para poder justificar estas diferencias. Cuando los mAbs de captura rec se compararon la respuesta para el AK566 era cerca de cuatro veces más alta que la del AK568. En contraste los mAbs de los inmunoensayos pit parecían tener capacidades de la superficie similares para ambos preparados (variante de 22 kDa y phGH) ya que las respuestas de ambos dieron respuestas por SPR de la misma magnitud. Para estos mAbs sin embargo, la mayor discrepancia parecía residir en las constantes cinéticas.

En general, las correlaciones para las concentraciones de los inmunoensayos fueron excelentes con valores P.r. positivos y cercanos a 1.00 en el caso máximo de los dos inmunoensayos diferenciales rec. También cuando estos fueron comparados y correlacionados con los datos obtenidos para la otra aproximación de la que se obtenía la ratio 22/20 kDa las correlaciones resultaron con una interpretación al menos comprensiva. No obstante las correlaciones de los inmunoensayos diferenciales pit fueron muy inferiores, especialmente para el inmunoensayo pit del kit 1.

En una primera evaluación se cogieron las muestras de voluntarios blanco o voluntarios receptores del fármaco pero antes de iniciar el tratamiento, es decir todos ellos sin la presencia de hGH exógena como una serie representativa (condiciones endógenas) y en otra serie distinta, muestras que correspondían a puntos de picos máximos de entre 4 y 12 horas post-administración. Haciendo simplemente esta partición los valores de correlación P.r. mejoraban espectacularmente ofreciendo valores de P.r. al mismo nivel > 95 %. El dato más interesante hallado resultó ser el de los valores obtenidos de B.A.. Bajo condiciones solamente de hGH endógena los inmunoensayos pit del kit 1 dieron mediciones en valor promedio de bias (B.A.) un ~ 8 % superiores que los obtenidos en su conjunto para los inmunoensayos pit del kit 2 (ver tabla 20). Sin embargo, después de la administración de rhGH ocurría un cambio sustancial dándose el hecho contrario, los inmunoensayos del kit 2 pit dieron mediciones en valor promedio de bias (B.A.) un ~ 7 % superiores que en el inmunoensayo pit del kit 1 (ver tabla 20). Estas discrepancias fueron corroboradas por el análisis de B.A. con todos los demás inmunoensayos y podían ser explicadas solamente por las diferencias en la avidéz y la afinidad en combinación con la capacidad de la superficie para la variante de 22 kDa. A nivel práctico la distinta correlación en función de la distribución de las variantes de hGH en la muestra (ver figura 29), se podría aprovechar para posteriores corroboraciones de la negatividad o positividad de una muestra.

Cuando ambas aproximaciones, la de la ratio 22/20 kDa y la de la ratio rec/pit, se compararon se hizo evidente que ambas

aproximaciones eran totalmente complementarias. De un total de 110 valores de ratio, 101 dieron directamente la misma respuesta y 5 ratios adicionales no concordaban pero se podían explicar debido a la interferencia observada para las mediciones obtenidas en la variante de 20 kDa. En global hasta más de un 95 % de resultados eran completamente coherentes para las dos aproximaciones independientes mientras que los resultados discrepantes se podían situar como muestras en el límite de 24 horas (border-line) después de la administración de rhGH, que con estas dosis utilizadas estarían en el límite de la WOO para ambas aproximaciones. La WOO para ambas dependería en una amplia extensión de la dosis administrada. Es bastante evidente que para la aproximación de la ratio 22/20 kDa se debería obtener una mejora ostensible en la medición de la variante de 20 kDa, tanto en la mejora del nivel de la capacidad de la superficie como en la mejora del mAb en si mismo. Es decir que si esta aproximación de la ratio 22/20 kDa contará con un mAb con mejores características seguramente no sería muy atrevido decir que esta aproximación contaría con ventaja sobre la aproximación de la ratio rec/pit. Recientemente, Wu y *col.*(133) han publicado un procedimiento para la medición de esta ratio a partir de un inmunoensayo para 22 kDa hGH y otro para 20 kDa hGH. Esta última medición (para 20 kDa hGH) está basada en un mAb anti-20 kDa, el mAb 1G12, evaluado por SPR en nuestro laboratorio y con el cual la sensibilidad alcanzada en este inmunoensayos publicado es de 0.002 µg/L indicando con ello que la mejora es posible.

De las caracterizaciones realizadas en nuestro laboratorio al margen de este mAb 1G12 ya comentado, se han caracterizado entre otros el mAb 5C4 (obtenido en Alemania y con mejores propiedades de superficie aun que el ya citado 1G12) y el mAb #7 (obtenido en China) que también mostraron unas excelentes propiedades de superficie. Con cualquiera de estos mAbs aplicados a un análisis de la variante de 20 kDa hGH por medio de inmunoensayos, seguramente se obtendría el empuje necesario para que la aproximación por la ratio de 22/20 kDa diera un salto cualitativo muy grande. Evidentemente, esta aproximación podría contar también con el soporte o utilización de la otra aproximación aquí estudiada, aproximación por la ratio rec/pit. No obstante las expectativas de poder establecer mAbs específicos para la variante de 20 kDa hGH con distinta especificidad selectiva a los ya conocidos parece muy baja. En nuestro laboratorio se han caracterizado en estos últimos años al menos 18 mAbs diferentes dirigidos hacia la variante de 20 kDa hGH y todos los que fueron realmente específicos compartían el mismo epitomo.

4.3 Marcadores biológicos.

Una segunda estrategia se ha venido desarrollando en esta última década como parte inicial de un estudio que se denominó GH-2000 que tal como ya ha sido explicado (ver apartado de Introducción) esta estrategia no utiliza la medición directa de variantes de hGH sino que se miden marcadores biológicos previamente elegidos en el estudio GH-2000 y que en presencia de hGH reflejan su actividad

ya que son alterados en función de la concentración y actividad de la hGH. A esta estrategia se la denominó en su momento como método indirecto ya que buscaba indirectamente la presencia de cantidades elevadas de bio-marcadores concretos que pudieran reflejar un abuso de hGH con una retrospectividad o WOO mayor que la del método directo. Otros diferentes bio-marcadores se postularon también en su momento, como fue con la utilización de la ratio entre las proteínas de unión de la hGH, IGFBP-2, IGFBP-3 y también ALS (263;266;277;308). También se han estudiado marcadores del colágeno y óseos (Wallace J.D., 4, 2000; Longobardi S., 1197, 2000). Se han propuesto también posibles contribuciones de nuevos marcadores como el telopéptido cross-linked carboxiterminal del colágeno tipo I (ICTP), añadido a los marcadores ya estudiados(309;310) y también más recientemente, el Consorcio Australiano-Japonés corroboraba los datos evaluados de IGF-I y P-III-P, sugiriendo además como alternativa el marcador óseo ICTP, que según este grupo proporcionaba una mayor discriminación durante la fase de eliminación del fármaco durante el periodo de lavado (311). Todas estas propuestas de bio-marcadores posteriormente se han ido quedando en el camino. Otras aproximaciones con cambios en marcadores bajo la influencia de la hGH también han sido propuestas. Los cambios en el transcriptoma de leucocitos (312), también aproximaciones en proteómica utilizando la electroforesis en 2 dimensiones combinada con la espectroscopia de masas (MS)(313-318). También se han estudiado cambios en proteínas en sangre que se comportan como reactantes de fases agudas. También por último se ha descrito en concreto los

cambios que produce la hGH sobre la proteína denominada “mannan-binding lectin”, proteína del sistema inmune que participa en la fase alternativa del complemento (319).

En esta parte de este trabajo se tratará este tema del método indirecto solamente como un estudio complementario al del método directo ya expuesto, ya que respecto a esta estrategia de bio-marcadores ya existe un amplio estudio reflejado en la publicación de numerosos trabajos relacionados con este ya citado grupo relacionado con el estudio GH-2000(262). La novedad de este trabajo es haber estudiado las dos estrategias existentes hasta la fecha sobre las mismas muestras.

Inicialmente se presentaran resultados obtenidos en el primer ensayo clínico, aunque con un corto tiempo de lavado que posteriormente se vio que limitaba mucho el hipotético alcance real de esta aproximación. Esto último fue debido a que en su inicio este primer ensayo clínico no se diseñó para observar la dinámica de bio-marcadores sino más bien para realizar únicamente una evaluación de la aproximación de la ratio 22/20 kDa por ELISA que en aquel momento ya estaba desarrollada.

En segundo lugar se presentaran los resultados de bio-marcadores analizados pertenecientes al segundo ensayo clínico. En este segundo ensayo clínico inicialmente se aplicó solamente la fórmula discriminante desarrollada en su momento por el grupo GH-2000(262) y sorprendentemente se apreciaba una considerable falta de sensibilidad de la prueba. Dados estos primeros resultados se consideró realizar un segundo análisis discriminante y para ello se

utilizaron por una parte las propias muestras de este segundo ensayo clínico que constituían en si mismas un bloque muy homogéneo (por esto no se mezclaron los resultados del primer ensayo clínico, con menor tamaño de muestra) y además para este fin se utilizó una muestra poblacional de sujetos varones muy parecida en características demográficas a la muestra de este segundo ensayo clínico, todo ello para poder utilizarla para la estandarización de los valores discriminan.

4.3.1 Primer ensayo clínico.

En este primer ensayo se utilizaron solamente tres sujetos que recibieron durante tres días una dosis aproximada en promedio de 0.026 mg/kg/día. El periodo de lavado fue solo de 24 horas, y los resultados individuales de los marcadores biológicos analizados se exponen en el anexo A de resultados.

4.3.1.1 Resultados.

Inicialmente se analizaron todos los puntos de tiempo del ensayo clínico para obtener valores de IGF-I mediante el instrumento Immulite-1000. Posteriormente dados los antecedentes conocidos acerca de la evolución de bio-marcadores con la administración de rhGH(262;265-267;272) se seleccionaron puntos de tiempo concretos para realizar solamente el análisis en estos puntos de los bio-marcadores P-III-NP e IGF BP-3.

De los bio-marcadores indirectos, la IGF-I fue seleccionada inicialmente debido a que en la mayoría de estudios previos

publicados se había demostrado como el bio-marcador más sensible y por lo tanto el que más rápidamente aumentaba por efecto de la administración de rhGH(265;320). Este bio-marcador al ser analizado mostraba de forma clara una tendencia más rápida a incrementarse que los otros dos después de la administración de rhGH (ver figura 30). A partir de un valor basal inicial (valor promedio) entre los tres voluntarios de 185 $\mu\text{g/L}$ pasaba a incrementarse a 329 $\mu\text{g/L}$ tras 24 horas y aun más a las 48 horas del inicio del tratamiento con la tercera dosis de rhGH (434 $\mu\text{g/mL}$). Transcurridas ya las primeras 24 horas de haber finalizado la administración de rhGH (72 horas) los niveles de IGF-I se encontraron todavía incrementados (493 $\mu\text{g/L}$) con respecto al valor basal. El marcador P-III-NP se incrementaba aunque más lentamente que la IGF-I (ver figura 30). A partir de un valor promedio inicial de 3.89 $\mu\text{g/L}$ pasaba a 5.15 $\mu\text{g/L}$ tras 48 horas y transcurridas las primeras 24 horas después de haber finalizado la administración de rhGH (72 horas) los niveles permanecían en un valor promedio de 6.00 $\mu\text{g/L}$.

En el caso del bio-marcador IGF BP-3 (ver figura 30), a partir de un valor promedio inicial de 3.62 mg/L se iba incrementando más lentamente que los anteriores hasta un valor de 4.25 mg/L (48 horas) y ya tras 24 horas de haber finalizado la administración de rhGH, los niveles se encontraron en un valor promedio de 4.55 mg/L (72 horas).

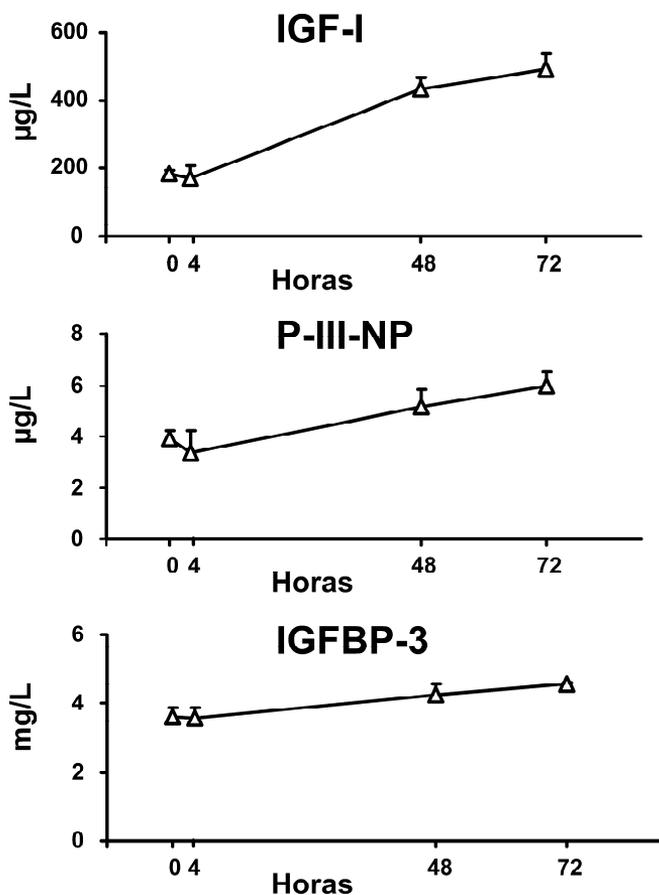


Figura 30.- Concentración de los bio-marcadores IGF-I, P-III-NP e IGF BP-3 en función del tiempo en horas después de la administración periódica de rhGH durante 3 días.

Los resultados para ser comparados de una forma más homogénea con valores de la misma magnitud (conjuntamente) también se podían expresar en términos de incrementos en porcentaje sobre su propio valor basal, en cada uno de los tres sujetos. Los resultados de

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

los marcadores IGF-I, P-III-NP e IGF BP-3 expresados en este porcentaje se exponen en la tabla 22.

Tabla 22.- Valores de IGF-I, P-III-NP e IGF BP-3 expresados en porcentaje de los valores aumentados respecto a sus valores basales expresados como valor promedio \pm SD de los tres sujetos en función del tiempo en horas. Los tiempos en los cuales la rhGH (0.026 mg/kg/día) fue administrada pertenecen a los tiempos de 0, 24 y 48 h.

Tiempo	IGF-I	P-III-NP	IGF BP-3
0 horas	0 %	0 %	0 %
4 horas	- 8.3 \pm 23.5 %	- 13.9 \pm 23.2 %	- 1.7 \pm 2.8 %
48 horas	134.7 \pm 18.5 %	32.3 \pm 9.7 %	17.7 \pm 6.4 %
52 horas	144.5 \pm 58.0 %	7.5 \pm 8.0 %	31.4 \pm 4.1 %
56 horas	137.4 \pm 17.5 %	27.5 \pm 22.8 %	27.1 \pm 1.9 %
72 horas	166.5 \pm 18.0 %	54.4 \pm 7.7 %	26.2 \pm 7.6 %

Estas diferencias se sometieron a la prueba de Wilcoxon, aunque el valor p de una prueba no-paramétrica como es en este caso, con solamente una serie de tres valores para cada modo no puede ser inferior a 0.125, por lo que el nivel aquí aplicado de significación estadística es de $p=0.125$ y no como sería habitual el valor $p < 0.05$ si se dispusiera de un mayor número de muestras. El test de Wilcoxon se aplicó a cada uno de los incrementos para cada tiempo y por cada sujeto por separado, aunque en la tabla 22 los incrementos se expresan en valor promedio \pm SD para los tres sujetos.

Para el bio-marcador IGF-I (ver tabla 22) a las 4 horas las diferencias observadas no eran estadísticamente significativas (NS) ($p 0.75$). Antes de la segunda administración de rhGH los niveles de IGF-I ya subían alrededor del 135 % de su valor basal inicial previo (48 horas, $p 0.125$, estadísticamente significativo). Así, la IGF-I seguía aumentando hasta cerca del 145 % a las 4 horas después de

la tercera dosis (52 horas, p 0.125), el 137 % a las 8 horas después de la tercera dosis (56 horas, p 0.125) para acabar finalmente con un incremento de alrededor de 166 % del propio valor basal en las 24 horas posteriores a la finalización de la administración de rhGH (72 horas, p 0.125).

Con el bio-marcador P-III-NP (ver tabla 22) a las 4 horas las diferencias observadas eran NS (p 0.87). Antes de la segunda administración de rhGH los niveles de P-III-NP ya subían alrededor del 32 % de su valor basal inicial previo (48 horas, p 0.125). Después sufrían un descenso de hasta alrededor del 7 % a las 4 horas después de la tercera dosis aunque respecto al valor basal inicial seguían incrementados significativamente (52 horas, p 0.125) siguiendo a continuación incrementados otra vez hasta llegar alrededor del 27 % respecto al basal 8 horas después de la tercera dosis (56 horas, p 0.125) y acabar finalmente con un incremento de alrededor del 54 % (máximo incremento) sobre el valor basal en las 24 horas posteriores a la finalización de la administración de rhGH (72 horas, p 0.125).

Para el caso del bio-marcador IGF BP-3 (ver tabla 22), la tendencia fue similar a las de IGF-I y P-III-NP. A las 4 horas las diferencias observadas de alrededor de - 1.7 % eran NS (p 0.875). Posteriormente los niveles de IGF BP-3 si subían hasta un incremento del 18 % de su valor basal inicial (48 horas, p 0.125). Después continuaban aumentando hasta un 31 % a las 4 horas después de la tercera dosis (52 horas, p 0.125), descendían levemente hasta llegar todavía a un 27 % de incremento a las 8 horas después de la tercera dosis (56 horas, p 0.125) y acababan

finalmente con un ligerísimo descenso respecto al anterior, siguiendo incrementados respecto al valor basal en un 26 % en las 24 horas posteriores a la finalización de la administración de rhGH (72 horas, p 0.125). Los incrementos observados fueron más suaves que en el caso de los otros dos bio-marcadores.

Era evidente y conocido de antemano que el periodo de lavado según descripciones ya realizadas en los trabajos publicados en el marco del grupo GH-2000(262;265-267;272) era muy corto y que en, solo 24 horas no se observarían los descensos en los valores de concentración para los distintos bio-marcadores, aunque como ya se ha comentado el diseño inicial no estuvo pensado para evaluar esta estrategia como si ocurrió posteriormente con el diseño del segundo ensayo clínico. No obstante la corta fase de lavado no se impedía ver las tendencias e incrementos de los distintos bio-marcadores. En resumen tal como ya se había descrito previamente (262;265-267;272) se observaron incrementos más rápidos (24 horas) con IGF-I y posteriormente de forma más gradual con el bio-marcador P-III-NP (tabla 22).

4.3.1.2 Aplicación de la formula discriminante del estudio GH-2000.

Como ya ha sido comentado en el apartado de introducción, en el proyecto denominado GH-2000 proponía la utilización de los marcadores IGF-I y P-III-NP mediante una formula discriminante sexo-especifica que aportaba un valor discriminante denominado “D-score” ajustado para la edad para cada individuo. Con este valor

de “D-score” se pretendía clasificar a cada individuo como dopado o no dopado por el abuso de hGH. La fórmula se definía como previamente estandarizada, es decir calibrada frente a un grupo de atletas de elite para cada sexo, como valor promedio de 0 y SD de 1(321). La fórmula aplicada solo a varones y ajustada con la edad de cada individuo se aplicó a los valores analizados de este primer ensayo clínico, valores que previamente habían sido transformados mediante fórmulas de correlación previamente publicadas para IGF-I(294) y para P-III-NP(291) para ajustarlos a las mismas metodologías y unidades equivalentes utilizadas por el grupo del proyecto GH-2000. Los “D-score” obtenidos se muestran en la figura 31.

D-Score normalizado con muestras del estudio GH-2000

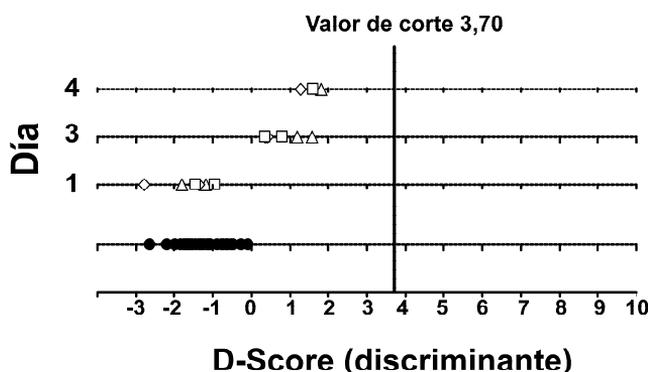


Figura 31.- “D-score” de los puntos de tiempo individualizados para los sujetos del primer ensayo clínico según la fórmula del grupo GH-2000 después de la administración de una dosis de rhGH durante tres días. Los sujetos se representan como triángulos abiertos (voluntario 12), círculos abiertos (voluntario 13) y cuadrados abiertos (voluntario 14). En círculos negros están representados valores poblacionales (varones) sin administración de rhGH. En el eje vertical se representan los días del ensayo clínico. La línea vertical negra corresponde al valor de corte de 3.7 SD.

El valor de corte o “cut-off” de 3.7 SD (línea negra vertical mostrada en la figura 2) por encima del cual se consideraba como “D-score” positivo fue el valor utilizado en artículos posteriores de miembros de este grupo GH-2000 (3;265-267;271;272;309) como un valor con riesgo de error de 1-en-10000 como tasa de falsos positivos.

Con esta fórmula, todas las muestras esperadas como negativas resultaron negativas, pero sorprendentemente también todas las muestras esperadas como positivas resultaban con un “D-score” inferior al valor de corte de 3.7. Resultó evidente que según la fórmula discriminante del proyecto GH-2000, la sensibilidad que se obtenía era elevada. Ante esta inesperada situación y debido al número escaso de datos, la explicación debía venir dada más adelante cuando se pudo probar de nuevo con un segundo ensayo clínico y un tamaño de muestra mayor. Este tema será comentado más adelante en el apartado del segundo ensayo clínico con nuevos datos.

4.3.1.3 Discusión.

Las variaciones circadianas de IGF-I y también otras variables, como sueño, fatiga, ejercicio físico, ingesta de alimentos, aparte de lo que es en sí mismo la influencia de la administración de hGH exógena (rhGH) tienen una influencia capital en los niveles de concentración de IGF-I en sangre periférica.

Se ha descrito que incrementos marcados y significativos de concentración de IGF-I, así como con otros bio-marcadores como

P-III-NP(322;323) pueden estar causados por administración de rhGH, así como también incrementos muy claros de otras proteínas de unión de las IGF como las IGFbps (265). La IGF-I libre aumenta más que la IGF-I total (324). En mujeres, en relación a varones, se ha detectado una mayor resistencia a la hGH en términos de generación de IGF-I (266). Una diferencia similar de género se ha mostrado respecto a la respuesta lipolítica aguda al “bolus” fisiológico de hGH (325). La efectividad se debe a la sensibilidad periférica que presenta la hGH, superior esta en hombres (204). Este hecho se ha postulado que podría estar relacionado con diferencias en los niveles de estrógenos (326). Alternativamente, otra posibilidad podría ser la de que los andrógenos jugasen un papel permisivo para la producción de IGF-I debido a la estimulación de la hGH (327). Las diferencias de género son también extensibles a otros bio-marcadores como es el caso del P-III-NP y el ICTP tipo I(276;309), bio-marcadores con una sensibilidad inferior que la IGF-I.

Tanto el estudio GH-2000 (262) como también otros grupos de estudio (263) ya han utilizado diferentes combinaciones de bio-marcadores, desarrollando distintos análisis y funciones discriminantes para distinguir entre sujetos tratados con rhGH y sujetos no tratados. Las mediciones de los marcadores elegidos como más óptimos por el estudio GH-2000 (IGF-I y P-III-NP)(262) se realizaron con métodos de RIA para IGF-I (Nichols Institute, San Juan Capistrano, CA, USA) y P-III-NP (CIS Biointernational, Oris Industries, Gif-sur-Yvette, France) respectivamente, diferentes a los métodos analíticos utilizados en estas muestras (ver apartado de

Material y Métodos). Aun así, las correlaciones entre los métodos utilizados en este ensayo clínico y en el proyecto GH-2000 han sido ya descritas para IGF-I (294) y para P-III-NP (291). Estas correlaciones eran necesarias ya que el método de IGF-I fue retirado hace años del mercado por el fabricante, y el método de P-III-NP de CIS-Biointernational presentaba importantes disparidades acerca del apartado del material de calibración (291) en el que se utilizaban unidades arbitrarias. De forma similar que en este trabajo, otros grupos de trabajo también han informado acerca de la utilización de distintas metodologías, para IGF-I y P-III-NP, y las unidades han sido convertidas utilizando distintas correlaciones (274;291;321).

La armonización de métodos utilizados tendría que ser estricta de manera que los requerimientos para aplicar el análisis discriminante deberían ser convincentes. Aunque las conversiones de las distintas mediciones puedan parecer apropiadas, es evidente que la utilización de métodos únicos evitaría posibles errores de interpretación. Tomando esto en cuenta, los resultados obtenidos en este primer ensayo clínico, una vez aplicada la fórmula discriminante del proyecto GH-2000 presentaban una falta de sensibilidad como se hizo evidente con la ausencia total de resultados interpretables como positivos.

Aunque la elección de bio-marcadores sea la correcta para detectar el abuso de hGH, la presencia de correlaciones podría hacer mella en la aplicación de la fórmula discriminante y por otra parte la utilización de una población para ayudar a estandarizar los valores “D-score” podría resentirse de esta falta de armonización de métodos.

En resumen, esta estrategia mostró en este primer ensayo clínico una respuesta no esperada en función de la administración de rhGH. Parecía que el problema surgido de sensibilidad debería estudiarse con un mayor número de muestras ya que el “D-score” utilizado aquí, ajustado tanto por edad como para sexo, podría no ser el adecuado para aplicarlo a los sujetos de este ensayo clínico. Una inapropiada adecuación de la pseudo-harmonización de métodos utilizados así como una población de referencia inadecuada para la estandarización, podría derivar en el problema aparecido con nuestros datos. Para estudiar esta hipótesis se generaron nuevos datos en un segundo ensayo clínico.

4.3.2 Segundo ensayo clínico.

En un segundo ensayo clínico, realizado con mayor número de voluntarios (7) e incluyendo 2 voluntarios como controles o blancos y un periodo de lavado más largo que incluía los 14 días posteriores a la finalización de la administración de rhGH.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en este segundo ensayo clínico. En este segundo ensayo los 7 voluntarios recibieron durante siete días una dosis aproximada en promedio de 0.026 mg/kg/día. Los resultados individualizados se exponen en el anexo A de resultados.

4.3.2.1 Resultados.

Los perfiles de los marcadores analizados IGF-I, P-III-NP e IGF-BP 3 a través de los 21 días del estudio se muestran en la figura 32. Los valores tomados en porcentaje eran el valor promedio del aumento

observado para cada grupo de voluntarios (blancos sin tratamiento y tratados siete días con rhGH) respecto al propio valor basal, tomando este valor como referencia para cada individuo. El marcador IGF-I fue el marcador más sensible en incrementarse de forma clara con respecto a sus valores basales alcanzando un pico máximo de 135 % en el día 8 (168 h, $p < 0.05$). Posteriormente, los niveles decrecían lentamente hasta llegar casi a los valores basales (~ 6 %) a las dos semanas (480 h, p NS) de que el tratamiento con rhGH hubiera finalizado.

Los incrementos observados para el marcador P-III-NP fueron inferiores a los de IGF-I pero permanecieron incrementados durante más tiempo. El pico máximo se alcanzó en el día 8 (168 h) con un valor de 57 % ($p < 0.05$) y posteriormente los valores permanecían incrementados todavía en el día 21 (dos semanas después de finalizar el tratamiento) en un ~ 21 % (480 h, p NS). La cinética del bio-marcador IGF BP-3 fue similar a lo observado para el bio-marcador P-III-NP aunque con incrementos relativamente inferiores.

En el día 8 (168 h) se alcanzaba el pico máximo con un incremento de casi ~ 38 % ($p < 0.05$) y después una vez ya finalizado el tratamiento con rhGH los valores decrecían lentamente hasta llegar casi a un ~ 11 % a los 7 días de haber finalizado el tratamiento con rhGH (día 14, 312 h, $p < 0.05$).

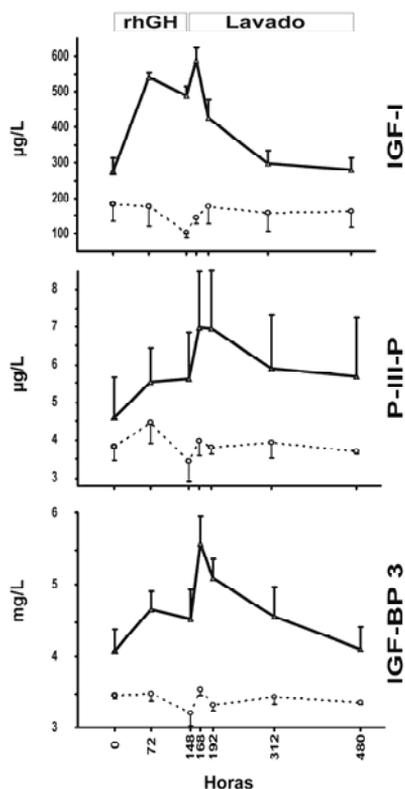


Figura 32.- Perfil de los marcadores IGF-I, P-III-NP e IGF BP-3 a través de los 21 días del ensayo clínico. Las barras verticales representan el valor ± 1 SEM (Standard Error Mean). En la línea a trazos el perfil de los sujetos blancos y la línea en negro continúa el perfil de los receptores de rhGH.

Los valores basales se alcanzaron de nuevo a los 14 días de haber finalizado el tratamiento con rhGH (día 21, 480 h, p NS). Para los tres marcadores, los valores observados en los dos voluntarios control o blancos permanecieron prácticamente inalterados y fueron

en todo momento del ensayo clínico con valores estadísticos del test de Wilcoxon como NS.

Los niveles basales de los marcadores IGF-I y P-III-NP en los sujetos tratados con rhGH estaban según los valores poblacionales esperables, teniendo en cuenta los valores de referencia de la población, según el mismo sexo y el rango de edad. Es de destacar que dos valores discrepantes fueron observados en voluntarios distintos. En el primero el valor basal del bio-marcador IGF-I en uno de los voluntarios que posteriormente recibió rhGH alcanzaba 463 $\mu\text{g/L}$ (factor 1.9, 463 *versus* 242.8) cerca de prácticamente del doble del valor promedio observado en el resto de voluntarios receptores de rhGH. Este voluntario evolucionaba durante el estudio con este bio-marcador similarmente a lo observado en los otros sujetos receptores, aunque con incrementos menores comparados con el valor promedio del grupo. Este valor no correspondía a una influencia de la hGH ya que en las mediciones realizadas por distintos métodos su valor entraba dentro de los límites fisiológicos, 0.295 $\mu\text{g/L}$ por ELISA, 0.308 $\mu\text{g/L}$ por kit 1 rec y 0.386 $\mu\text{g/L}$ por kit 2 rec (ver anexo de resultados A).

En el segundo otro voluntario distinto y también receptor de rhGH dio un valor basal del bio-marcador P-III-NP de 10.86 $\mu\text{g/L}$ (factor 3.0, 10.86 *versus* 3.57) el triple comparado con el resto de voluntarios receptores de rhGH. En este caso, las concentraciones después de la administración de rhGH también igual que el caso anterior continuaron la misma tendencia observada en el resto del grupo pero con incrementos inferiores al valor promedio del grupo.

Este valor tampoco correspondía a una influencia de la hGH ya que en las mediciones realizadas por distintos métodos su valor entraba dentro de los límites fisiológicos, 0.059 µg/L por ELISA, 0.038 µg/L por kit 1 rec y 0.040 µg/L por kit 2 rec (ver anexo de resultados A). La historia clínica de estos dos voluntarios no explicó de forma intrínseca las razones de estos valores elevados. Estas concentraciones inusuales fueron incluidas junto al resto de valores obtenidos en los cálculos posteriores que se expondrán a continuación, pero se debe mencionar que si se hubieran descartado estos dos valores, el promedio del resto de concentraciones basales de los dos bio-marcadores en los sujetos tratados con rhGH hubiera sido muy similar al de los sujetos control o blancos y también al valor promedio de los 39 sujetos varones que se tomaron como muestras de referencia poblacional.

Los “D-score” obtenidos a partir de los datos de IGF-I y P-III-NP, mediante la fórmula original expuesta a continuación(262):

$$D = -6.586 + 2.905 \times \log P\text{-III-P} + 2.100 \times \log \text{IGF-I} - 101.737/\text{edad},$$

se muestran en la figura 33.

El valor de corte está fijado en 3.7 SD (línea negra vertical mostrada en la figura) por encima del cual se consideraba como “D-score” positivo. Con esta fórmula se continuó con la misma tónica del primer ensayo clínico y todas las muestras realmente negativas resultaron como negativas-verdaderas pero también la amplia

mayoría de muestras realmente positivas dieron un “D-score” inferior a este valor de corte. Los valores basales del “D-score”, en su valor promedio, en los sujetos blanco o control y puntos de tiempo de los receptores de rhGH previos al inicio de la administración era de $-0.72 \pm \text{SEM de } 0.22$ (ajustado a la edad) y presentaba una mayor dispersión de datos.

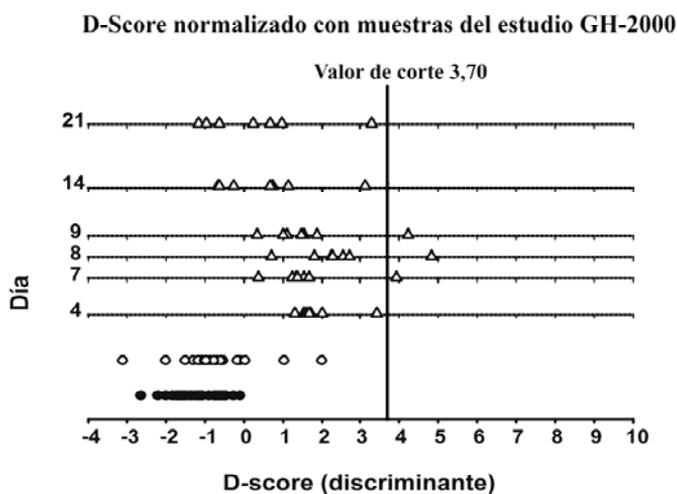


Figura 33.- “D-score” de los puntos de tiempo individualizados para los voluntarios del ensayo clínico obtenidos aplicando la fórmula del grupo GH-2000, después de la administración de rhGH durante siete días (triángulos) comparado con los que no recibieron rhGH (círculos abiertos) y valores poblacionales (círculos negros). En el eje vertical se muestran los días del ensayo clínico en que se recogieron las muestras (días 4 y 7 en el periodo de administración de rhGH), y los días 8, 9, 14 y 21 que correspondían al periodo de lavado. La línea vertical negra corresponde al valor de corte de 3.7 SD, a partir del cual se consideraba como “D-score” positivo y con el cual el riesgo de error de un falso-positivo estaba en una probabilidad de 1:10000.

Resultaba evidente que aplicando esta estrategia de marcadores en la detección del abuso de hGH, según la fórmula discriminante del

proyecto GH-2000, la sensibilidad que se obtenía era baja. No se dieron falsos positivos pero también la mayoría de resultados esperados como positivos no lo fueron. En concreto solo se obtuvieron tres “D-score” positivos, uno en el día 7, otro el día 8 y el tercero el día 9.

En vista de esta situación que prácticamente se volvía a repetir (ver primer ensayo clínico) y esta vez con un tamaño de muestra más elevado se decidió efectuar un nuevo análisis discriminante con todos los datos de este ensayo clínico. Los datos fueron re-evaluados desde su inicio para proporcionar una función discriminante mejor.

Se examinaron diferentes poblaciones de referencia para poder utilizarlas en el proceso de estandarización de los “D-score” ajustados con la edad. Se probaron los valores para cada marcador de los sujetos blancos del ensayo clínico, también los valores basales correspondientes a los receptores de rhGH previos al inicio de la administración, y también ambos conjuntamente (referidos como sujetos no tratados). Finalmente se probó y se eligió un grupo de datos pertenecientes a 39 varones obtenidos de estudios realizados previamente en nuestro laboratorio (291). Se eligió dadas sus características demográficas (peso, altura, edad y BMI) muy similares a las de los voluntarios de este ensayo clínico, así como también del primer ensayo (ver apartado de Material y Métodos) y también porque este grupo en su conjunto era totalmente independiente del grupo de voluntarios de este ensayo clínico. Para llevar a cabo este cometido solamente fue necesario transformar los valores de P-III-NP para pasarlos del kit utilizado para obtener los

resultados (Orion Diagnostica, igual que en este trabajo) a resultados del kit de Cis Biointernational utilizado en el proyecto GH-2000. Los resultados del otro marcador IGF-I fueron obtenidos mediante el kit de Nichols Institute utilizado en el proyecto GH-2000 y posteriormente retirado del mercado por el fabricante. Inicialmente se sometieron los datos a un nuevo análisis discriminante (sin contar con los datos del grupo poblacional) y de nuevo al igual que los resultados obtenidos en el proyecto GH-2000, la mayor discriminación se obtuvo también con los marcadores IGF-I y P-III-NP, siendo el papel del marcador IGF-BP 3 con una influencia nula en la fórmula discriminante siendo por ello descartado. Así pues, los “D-score” obtenidos se calibraron estandarizándolos frente al grupo de valores poblacionales (n=39) y una vez corregida por la edad la fórmula resultante para sujetos varones fue:

$$D = -14.330 + 2.484 \times \log P\text{-III-P} + 4.321 \times \log IGF\text{-I} - 175.317/\text{edad}.$$

Cuando se aplicó esta fórmula a los resultados obtenidos en este ensayo clínico, los valores de “D-score” daban una distribución como la que se muestra en la figura 34 y la sensibilidad mejoró ostensiblemente.

Con este nuevo ajuste se detectaron aproximadamente el ~ 64 % de todos los posibles positivos, la gran mayoría entre los días 4 y 9 del ensayo (~ 82 %), mientras que en los días 14 y 21, una y dos semanas respectivamente después de que el tratamiento con rhGH hubiese finalizado muchos “D-score” ya resultaron negativos,

siendo solo positivos el ~ 29 % a los 14 días y el mismo porcentaje a los 21 días. Como tal, el rendimiento de detección de resultados positivos (es decir la concordancia entre el valor esperado y el obtenido) durante solamente el periodo de tratamiento (hasta el día 7) fue de aproximadamente ~ 93 %, siendo de aproximadamente ~ 86 % 24 horas después de haber finalizado la administración de rhGH, y de aproximadamente ~ 57 % a las 48 horas de haber finalizado la administración

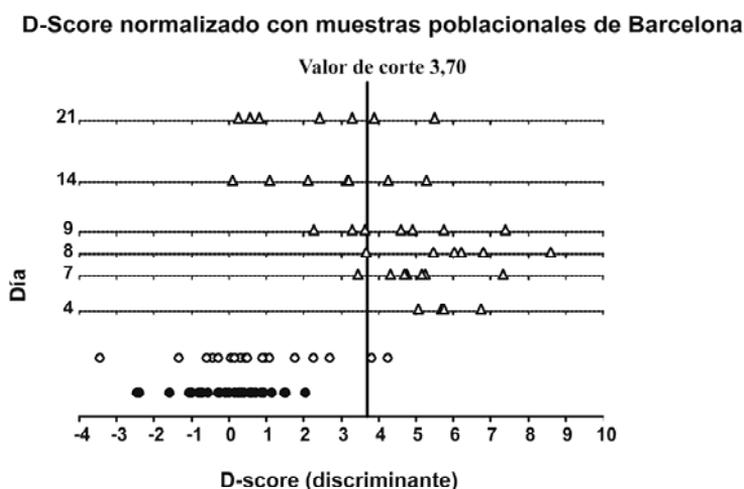


Figura 34.-- “D-scores” de los puntos de tiempo individualizados para los voluntarios del ensayo clínico obtenidos aplicando un nuevo análisis discriminante después de la administración de rhGH durante siete días (triángulos) comparado con los que no recibieron rhGH (círculos abiertos) y valores poblacionales (círculos negros). En el eje vertical se muestran los días del ensayo clínico en que se recogieron las muestras (días 4 y 7 en el periodo de administración de rhGH), y los días 8, 9, 14 y 21 que correspondían al periodo de lavado. La línea vertical negra corresponde al valor de corte de 3.7 SD, a partir del cual se consideraba como “D-score” positivo y con el cual el riesgo de error de un falso-positivo estaba en una probabilidad de 1:10000.

Los puntos de tiempo de los voluntarios sin tratamiento eran claramente negativos excepto para los dos puntos comentados anteriormente con valores basales anormalmente elevados para IGF-I en un caso y para P-III-NP en el otro caso, los cuales se presentaban con resultado falso-positivo.

De todos estos datos se desprende que por lo menos con la estrategia de bio-marcadores era posible detectar más allá de las 24 horas de WOO. Incluso a las 48 horas post-administración de rhGH todavía se detectaban casos positivos de forma notoria y después de 7 y 14 días (28.6 % de detección en cada caso) de haber finalizado la administración. En el caso de la estrategia por métodos directos, vista anteriormente, el punto de 24 horas era un punto crítico para la WOO con bajos porcentajes de detección para las diferentes aproximaciones estudiadas y comparadas (< 10 % de casos en los días de tratamiento con rhGH) si no se tenían en cuenta las ratios extrapoladas con valores < a LOQ en la aproximación de la ratio 22/20 kDa. Tanto a las 48 horas como a los 7 y 14 días de haber finalizado la administración de rhGH, ninguna de las aproximaciones de la estrategia directa era capaz de detectar casos positivos. Era pues evidente que con la estrategia de bio-marcadores la WOO para la detección de abuso de hGH se alargaba de forma considerable más allá de las 24 horas.

Ante la nueva perspectiva abierta de aplicar un nuevo análisis discriminante que mejoraba la sensibilidad en la evaluación, se obtuvieron también nuevos “D-score” para cada muestra del primer ensayo clínico para ver si mejoraban también su sensibilidad. Los resultados se muestran en la figura 35.

Aplicando este nuevo ajuste, se detectaron, ahora si, casos positivos como era de esperar. En el primer día lo lógico era que los 6 resultados (2 por cada voluntario) dieran valores inferiores al valor de corte ya que tres valores correspondían a condiciones basales pre-inicio de la administración de rhGH y los tres siguientes valores correspondían a cuando solo habían transcurrido 4 horas después de la primera administración de rhGH. Con las muestras ya correspondientes al tercer (9 valores) y cuarto día (3 valores) valores todos ellos teóricamente positivos, el 58.3 % dieron valores por encima del valor de corte.



Figura 35.- “D-scores” de los puntos de tiempo individualizados para los voluntarios del primer ensayo clínico obtenidos aplicando la nueva fórmula discriminante distinta de la del grupo GH-2000, después de la administración de rhGH durante tres días. Los voluntarios están representados con triángulos abiertos (voluntario 12), círculos abiertos (voluntario 13) y cuadrados abiertos (voluntario 14). En círculos negros están representados valores poblacionales de individuos varones sin tratamiento con rhGH. En el eje vertical se representan los días del ensayo clínico. La línea vertical negra corresponde al valor de corte de 3.7 SD.

Con estos resultados tras el nuevo ajuste aplicado se consideró que el rendimiento era similar al obtenido con el segundo ensayo clínico, solo comparable en los días de administración de rhGH. El periodo muy corto de lavado (24 horas) y el inferior plazo de administración de rhGH en relación con el segundo ensayo clínico podían suponer tal vez que el potencial de esta estrategia parecía teóricamente inferior, aunque con lo observado en el segundo ensayo esta suposición no se confirmaba.

4.3.2.3 Discusión.

El grupo de trabajo GH-2000(262) y posteriormente el grupo del laboratorio de Kreischa en Alemania (263) utilizaron diferentes combinaciones de bio-marcadores, desarrollando distintas funciones discriminantes para detectar mediante esta estrategia el abuso de hGH en el deporte. Las series independientes de datos de ambos grupos, posteriormente a su publicación por separado, fueron correlacionadas (273) debido a que los métodos analíticos utilizados fueron distintos. En esta tesis las correlaciones entre los métodos utilizados de bio-marcadores han sido publicadas previamente para IGF-I(294) y P-III-NP(291). También de forma similar otros grupos han utilizado también distintas metodologías y con ello diferentes correlaciones (274;291;321), por lo que lo que se ha llevado a cabo en materia de correlaciones en este trabajo no se puede considerar como algo extraordinario.

Es evidente que dados los resultados obtenidos y la necesidad de re-analizarlos es debido en parte a que en esta estrategia es más

necesaria que nunca una armonización de métodos a utilizar. La necesidad de utilizar imperiosamente correlaciones para obtener una concordancia de unidades para cada bio-marcador necesitaría alcanzar un orden muy estricto para luego poder aplicar la función discriminante con ciertas garantías y que los “D-score” también fueran convincentes de acuerdo a los datos utilizados para su estandarización. De esta forma las ecuaciones obtenidas deberían ser más robustas. Aunque las conversiones de las distintas mediciones pudieran parecer apropiadas, es evidente que la utilización de métodos iguales para cada bio-marcador en todos los laboratorios anti-dopaje podría también evitar errores de interpretación.

El resultado obtenido en su conjunto aplicando directamente la función discriminante del grupo GH-2000(262) resultó ser insuficiente para las muestras de este trabajo. Cuando se realizó el nuevo análisis discriminante y se hizo una nueva estandarización frente a un grupo poblacional homogéneo respecto a los voluntarios del ensayo clínico la sensibilidad mejoro ostensiblemente.

Las dosis diarias subcutáneas fueron inferiores a las utilizadas en el proyecto GH-2000 (0.033 mg/kg/día en un grupo que denominaron “low dose” y 0.066 mg/kg/día que denominaron “high dose”)(272) pero no parecía que este hecho en si mismo pudiera explicar por si solo las diferencias. En cambio, la disparidad de resultados no resultaba tan sorprendente si se consideraba que el promedio de “D-score” obtenido de la población de referencia local con la formula GH-2000 ($- 1.19 \pm \text{SEM } 0.19$) estaba en concordancia con los valores de “D-score” informados en algunos otros estudios(321).

Así, los diferentes ajustes realizados y la elección de un grupo de valores para obtener una estandarización, utilizando para ello bien atletas de elite (como sería el caso del proyecto GH-2000), atletas aficionados o bien deportistas recreacionales (como sería el caso de este trabajo), parecía que podía ser de una importancia capital. Este factor en si mismo parecía muy relevante y se podía someter a consideración. Como tal, la elección en si misma de bio-marcadores adecuados deberían ser validados por medio de la utilización de poblaciones adecuadas (311). A este problema se podrían sumar otros factores no analizados en este trabajo. El grupo GH-2000 solo consideró en su momento establecer diferencias por la edad del deportista y por su género a través de las propias formulas discriminantes (262), aunque también el grupo satélite GH-2004 estudió la influencia de otros factores (274;275;321;328). De que manera determinados factores podían influir en la concentración de diversos bio-marcadores (entre ellos IGF-I, P-III-NP además de otros), factores como el género, la edad, la etnia, el tipo de deporte practicado y el BMI, se estudió con mucha posterioridad al estudio del grupo GH-2000(270) en una amplísima muestra (1103 atletas de élite) y muy homogénea (edad 22.2 ± 5.2 años). La influencia del tipo de deporte si bien no era capital si tenía una influencia no muy inferior al género aunque sin discusión la máxima influencia era la edad del deportista fuera hombre o mujer. Sin duda parece que aunque la formula discriminante del grupo GH-2000 tuviera en cuenta la corrección según la edad del deportista, se realizó la estandarización con una población según el género (en este caso varones) mucho más amplia que la de este trabajo (537 varones)

que si bien incluían hasta 15 tipos de deporte distintos, los rangos de edad eran muy amplios(195). Con estas consideraciones, lo que podía haber ocurrido, causando errores de cálculo en la obtención del “D-score”, era que una estandarización generalizada, diera a la formula distintas sensibilidades del método. La diferencia palpable con este trabajo es que aquí la población utilizada para la estandarización, a pesar del tamaño de muestra mucho más reducido (39 varones), tenía unas características demográficas muy parecidas a los voluntarios de los dos ensayos clínicos realizados en este trabajo: deportistas recreacionales con horas de práctica a la semana casi idénticas, edad y BMI muy similares. Estos factores tan importantes eran los que en un principio podrían ser la causa más fundamental de las diferencias observadas.

Más recientemente, miembros que participaron en el estudio del proyecto GH-2000 y también en su continuación el proyecto GH-2004, siguiendo con los intentos de estos últimos años de mejorar esta metodología, prueba sin duda de que la problemática de esta estrategia era la falta de solidez metodológica, han desarrollado unos nuevos límites de decisión, utilizando ahora con una amplia base de muestras de atletas de élite nuevos métodos analíticos, dos para IGF-I y utilizando también a la par dos métodos analíticos para P-III-NP. Estos métodos son comerciales todos ellos(280) con metodologías, para IGF-I de quimioluminiscencia por Immulite de Siemens-DPC e IRMA de Immunotech y para P-III-NP RIA de Cisbio y de Orion Diagnostica.

En este ensayo clínico, los valores basales extremadamente o anormalmente elevados sin justificación médica alguna (para IGF-I y P-III-NP) resultaron dar un resultado que se clasificó como falso-positivo en el re-análisis con la nueva fórmula discriminante. No se encontraron razones lógicas para explicar estos dos resultados, ni a nivel fisiológico ni a nivel de condición patológica, como sería en el caso de lesiones crónicas en tejido conectivo o en tejido muscular. Obviamente, la aparición de algún resultado clasificado como falso-positivo constituiría un problema muy grave para cualquier método de detección de abusos en el deporte. De ello se derivarían consecuencias muy graves para el atleta implicado y posiblemente para el laboratorio. Incidiendo en este problema, solo recientemente se puede considerar que existe un método de confirmación para esta estrategia indirecta (280) con la combinación de 4 diferentes inmunoensayos que pueden ser utilizados un par como cribaje y el otro como confirmación. No obstante al ser muy reciente, cuando estos datos se evaluaban la confirmación aun no estaba totalmente desarrollada y ello impidió que para estos casos no hubiera una segunda opción de evaluación que los exonerara. Alternativamente, este posible hecho delictivo podría estar bien direccionado por medio de la utilización complementaria, del ya visto y estudiado también en este trabajo, método directo de proporción relativa de variantes (98;132) y en cuyo caso estos dos sujetos siendo evaluados con esta metodología directa de proporción relativa de variantes de hGH si que hubieran quedado exonerados dado que dieron ratios por debajo del valor de corte. No obstante la resolución de estas anomalías no sería totalmente satisfactoria ya que en estos casos la

decisión a tomar mezclaría una estrategia más bien definida para un plazo corto con otra estrategia definida para un plazo algo más largo.

Respecto a esto último habría que añadir que en el trabajo que se han establecido unos nuevos límites de decisión para esta estrategia basada en bio-marcadores(280) también se encontraron valores fuera de lugar (“outliers”) con mediciones elevadas respecto a valores fisiológicos poblacionales tal como ha sucedido en este trabajo. Mientras que hubo casos en los que se encontraba cierta explicación, en cambio en uno ellos se dio el caso de un valor anormal de P-III-NP (14.3 $\mu\text{g/L}$ para el kit de Orion y 1.21 U/mL para el kit de Cisbio) con valores de IGF-I dentro del rango normal. No se encontró explicación médica alguna a este valor anormalmente elevado, y se le hubiera evaluado como resultado positivo (falso-positivo) con los nuevos límites de decisión teniendo en cuenta la evaluación llevada a cabo con uno de los dos pares de kits. La situación no obstante se salvaba gracias a que con las mediciones efectuadas en el otro par de kits, aunque el “score” estaba muy cercano al límite de decisión, esta evaluación se dio como negativa. Este caso viene a demostrar de forma clara que en algunos casos concretos la exoneración de culpa se podría dar en caso de haber tenido un método para confirmar el resultado.

En general, cuando los resultados de la estrategia por el método indirecto utilizando bio-marcadores se compararon con la estrategia por los métodos directos de proporción de variantes de hGH, estos últimos mostraron una WOO muy segura (100 %) para 12 horas

aunque el límite de las 24 horas fue algo más crítico, aunque con una WOO solo en el octavo día con más ventaja para la aproximación de la ratio rec/pit frente a la de la ratio 22/20 kDa. En límite de tiempo algo mas largo, como seria el caso de las 48 horas, la capacidad para detectar la administración de rhGH a través de las aproximaciones directas resultaba completamente nula mientras que por la estrategia indirecta de bio-marcadores estaba todavía cerca del 60 % de sensibilidad para casos positivos. Cuando ambas estrategias se combinaban no se observaban resultados falsos-positivos, incluyendo los dos casos de valores anormalmente elevados de la estrategia indirecta anteriormente comentados. Ambas estrategias, la directa y la indirecta, podrían ser perfectamente complementarias de acuerdo con su respectivas WOO. Sin embargo, mientras que en la estrategia directa una de las dos aproximaciones está actualmente desarrollada por completo hasta el punto de que ya ha sido implementada por la WADA, la estrategia indirecta podría ganar posibilidades para su implementación por la WADA siempre y cuando se aclaren dudas sobre la utilización de bases de datos más homogéneas para los diferentes ajustes a realizar, como estandarización de “D-scores” y de mayor armonización de método analíticos implicados.

No obstante la problemática descrita esta en vías de poderse solucionar debido al desarrollo reciente de estos nuevos límites de decisión para poder implementar esta estrategia con nuevos kits comerciales(280) que al ser una combinación de 2 pares de inmunoensayos, se incorpora un método de confirmación.

Recientemente en los Juegos Olímpicos de Londres ya se ha probado esta estrategia indirecta (comunicación personal del Dr. David Cowan director del laboratorio anti-dopaje de Londres) aunque hasta el momento se desconozca el resultado de la experiencia. También la WADA esta actualmente desarrollando en sus inicios su implementación y de momento la prueba esta instaurada como prueba piloto aparte del laboratorio anti-dopaje de Londres, también en Roma y Lausanne.

También por último es interesante remarcar que ya se ha probado en los Juegos Olímpicos recientemente finalizados en Londres (comunicación personal) la detección y cuantificación de IGF-I por métodos de cromatografía líquida/espectrometría de masas en tándem (329;330). Esta cuantificación por otra metodología podría en un futuro ser también más eficaz que las mediciones realizadas por inmunoensayos.

Capitulo 5: CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES.

En el ámbito del deporte la detección de la hGH ha supuesto uno de los mayores retos analíticos para la comunidad dedicada al control anti-dopaje. Al comienzo de esta tesis doctoral no existía método oficial y en este espacio temporal se han desarrollado dos aproximaciones, denominados método directo y método indirecto, en las que nuestro laboratorio ha participado en cierto grado. Dentro del marco de esta tesis doctoral se han comparado por primera vez ambas estrategias utilizando estudios de excreción expresos resultando en una mejor comprensión de los datos analíticos y las sinergias entre ambas estrategias para el control analítico deportivo en el abuso de hGH.

Sobre la estrategia por métodos directos, en la primera aproximación con el método para obtener la ratio rec/pit se puede concluir que:

- En el estudio exhaustivo realizado por medio de SPR de los mAbs permite concluir:
 - El mAb secundario AK569 de lectura, común para los 4 mAbs de captura, es exclusivo en especificidad con la variante de 22 kDa hGH. Este mAb muestra únicamente una leve respuesta para la variante de 17 kDa en la interacción simple aunque su existencia en circulación sanguínea no está demostrada.
 - La diferenciación de los mAbs de captura para obtener la ratio rec/pit se basa por lo tanto en la afinidad y avidéz

de cada anticuerpo por la variante de 22 kDa frente a las demás variantes.

- La nomenclatura dada a cada inmunoensayo que utiliza estos mAbs es apropiada teniendo en cuenta los Ags sobre los que actúan los diferentes mAbs de captura ya que al evaluar las variantes moleculares por separado en SPR:
 - Los mAbs AK566 y AK568 reconocen mejor la variante recombinante de 22 kDa hGH que el preparado hipofisario phGH. El mAb AK566 da una respuesta 4 veces superior que el mAb AK568 para la variante de 22 kDa hGH.
 - Tanto el mAb AK567 como el mAb AK565 reconocen distintas variantes de forma similar aunque el mAb AK567 muestra de dos-tres veces respuestas superiores que el mAb AK565.
 - En resumen la menor discriminación del mAb AK568 sobre la variante recombinante de 22 kD, comparado con el mAb AK566, va en detrimento de la ratio obtenida para el kit 2 y con ello un menor poder discriminatorio.
- Las diferentes constantes cinéticas para las distintas variantes de los anticuerpos AK 565 y AK 567 (sobre todo AK 565) presentan diferencias lo que permite concluir que captaran en dependencia de la composición de cada muestra, presencia solo endógena de hGH o masiva exógena de rhGH. Esta característica se ha

podido corroborar en el estudio comparativo entre rec y pit para el kit 1 y el kit 2.

- Esta última característica de diferenciación entre poblaciones aporta una nueva herramienta muy importante en la evaluación del posible abuso de hGH. Un caso real con evaluación final positiva es un dato más aportado en la propia clasificación de muestras.
- En la segunda aproximación de estrategia por métodos directos, en la que se obtiene la ratio 22/20 kDa como alternativa a la anterior aproximación:
- Se demuestra la absoluta especificidad de los dos inmunoensayos utilizados.
 - El denominador de la ratio, es decir la concentración de la variante de 20 kDa hGH, es limitante dada su propiedades en superficie por lo que su aplicación está más limitada.
 - No obstante la escala de amplitud de las ratios 22/20 obtenidas (de cientos a miles) al ser muy superior en rango que la de la primera aproximación hace que la resolución sea mejor al estar las ratios positivas muchísimo más elevadas.
 - Identificamos alternativas de mAbs anti-20 kDa hGH con mejores propiedades de superficie que mejorarían la sensibilidad. En nuestro laboratorio se han caracterizado por SPR en estos últimos años (al margen de esta tesis) otros mAbs y de todos ellos el mAb #7 producido en

Beijing , el mAb 5C4 y el mAb 1G12 producidos en Alemania, tienen unas buenas propiedades de superficie, especificidad, capacidad, afinidad y estabilidad, y reconocen el mismo epítipo estructural de la variante de 20 kDa hGH.

- En la comparación conjunta de ambas aproximaciones se deduce que:
 - Ambas aproximaciones son complementarias.
 - La WOO se ve limitada a las 12 horas post-administración aunque se detectan casos 24 horas post-administración en ambas aproximaciones en un bajo porcentaje de casos.

Acerca de la estrategia por métodos indirectos con la medición de bio-marcadores que da una perspectiva de una WOO más extensa:

- La medición en este trabajo se ha realizado mediante dos de los inmunoensayos comerciales disponibles.
- Con estos inmunoensayos se ha monitorizado su respuesta a largo plazo, con la administración exógena de rhGH mediante ensayo clínico autorizado.

A través de los resultados obtenidos con estas muestras de ensayo clínico se puede concluir que:

- El grupo utilizado para estandarizar la fórmula discriminante que se utilice condiciona su utilización según el grupo de sujetos sobre los que se aplica, en parte debido a:
 - Rango de edad.
 - Tipo de deporte, es decir actividad física.
 - Falta de armonización de los inmunoensayos utilizados hasta la fecha.
- Si bien la función discriminante está bien ajustada según la anterior premisa, esta estrategia ofrece la posibilidad de obtener una WOO más larga y exactamente justo a partir de cuando ya no se puede utilizar la estrategia por métodos directos.
- Por último ante la observación en este trabajo de dos casos de evaluación falso-positivo, debido a valores basales anormalmente elevados de IGF-I y P-III-NP se deduce que:
 - Se deben establecer mejor la influencia de variaciones intra o inter-biológicas.
 - Se debe tener en cuenta la posibilidad de valorar los bio-marcadores por medio del perfil propio de cada atleta obteniendo con ello un perfil longitudinal a modo de “pasaporte biológico”. Sería de gran interés para contrarrestar los inconvenientes de valores anómalos.

Capitulo 6: BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA.

1. Kent M. (1997) Food and Fitness: A Dictionary of Diet and Exercise, Oxford University Press.
2. Yesalis C.E. and Bahrke M.S. (2002) in Performance-Enhancing Substances in Sport and Exercise (first ed.) (Bahrke M.S. and Yesalis C.E., Eds.), pp. 1-20, Champaign, IL.
3. McHugh, C. M., Park, R. T., Sonksen, P. H., and Holt, R. I. (2005) Clin.Chem. 1587-1593.
4. Csaky, T. Z. (1972) J.Sports Med.Phys.Fitness 117-123.
5. Voy R.O. and Deeter K.D. (1991) Drugs, Sport and Politics, Champaign, IL.
6. Holt, R. I., Erotokritou-Mulligan, I., and Sonksen, P. H. (2009) Growth Horm.IGF.Res. 320-326.
7. Franke, W. W. and Berendonk, B. (1997) Clin.Chem. 1262-1279.
8. Abt S. Tour de France Steadfast in Ouster of Festina Team. New York Times . 19-7-1998. Ref Type: Newspaper
9. World Anti-Doping Agency (2012) World Anti-Doping Code WADA:
http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-Prohibited-list/2012/WADA_Prohibited_List_2012_EN.pdf
10. Rennie, M. J. (2003) Br.J.Sports Med. 100-105.
11. Graham, M. R., Baker, J. S., Evans, P., Kicman, A., Cowan, D., Hullin, D., Thomas, N., and Davies, B. (2008) Horm.Res. 343-354.

12. Meinhardt, U., Nelson, A. E., Hansen, J. L., Birzniece, V., Clifford, D., Leung, K. C., Graham, K., and Ho, K. K. (2010) *Ann.Intern.Med.* 568-577.
13. Widdowson, W. M., Healy, M. L., Sonksen, P. H., and Gibney, J. (2009) *Growth Horm.IGF.Res.* 308-319.
14. LI, C. H. and PAPKOFF, H. (1956) *Science* 1293-1294.
15. Raben MS (1958) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 901-903.
16. Miller, W. L. (1979) *Adv.Exp.Med.Biol.* 153-174.
17. Miller, W. L. and Baxter, J. D. (1980) *Diabetologia* 431-436.
18. Chang, C. N., Rey, M., Bochner, B., Heyneker, H., and Gray, G. (1987) *Gene* 189-196.
19. Moore, J. A., Rudman, C. G., MacLachlan, N. J., Fuller, G. B., Burnett, B., and Frane, J. W. (1988) *Endocrinology* 2920-2926.
20. Duchaine D. (1982) *Underground Steroid Handbook*, Santa Monica, CA.
21. Giannoulis, M. G., Sonksen, P. H., Umpleby, M., Breen, L., Pentecost, C., Whyte, M., McMillan, C. V., Bradley, C., and Martin, F. C. (2006) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 477-484.
22. Mackay. How HGH cheats hit the end of the line. *Guardian* . 28-7-2004. Ref Type: Newspaper
23. Buzzini, S. R. (2007) *Pediatr.Clin.North Am.* 823-43, xiii.
24. Dubin C.J. *Commission of Inquiry into the Use of Drugs and Banned Practices Intended to Increase Athletic Performance.* 1990. Ottawa, ON., Canadian Publishing Center. Ref Type: Report

25. Williams L. and Fainaru-Wada M. (2006) *Game of Shadows: Barry Bonds, Balco, and the Steroids Scandal That Rocked Professional Sports*, Gotham Books, New York.
26. Mitchell G.J. Report to the Commissioner of Baseball of an Independent Investigation into The Illegal Use of Steroids and Other Performance Enhancing Substances by Players in Major League Baseball, 2007. 2007. Ref Type: Report
27. Hoberman J.M. (2001) *Mortal Engines: The Science of Performance and the Dehumanization of Sport* (first ed.), The Blackthorn Press, Pickering.
28. Johnson, V. and Maack, T. (1977) *Am.J.Physiol* F185-F196.
29. Baumann, G. (1991) *Endocr.Rev.* 424-449.
30. Popii, V. and Baumann, G. (2004) *Clin.Chim.Acta* 1-16.
31. Baumann, G. P. (2009) *Growth Horm.IGF.Res.* 333-340.
32. Baumann, G. P. (2012) *Endocr.Rev.* 155-186.
33. Chen, E. Y., Liao, Y. C., Smith, D. H., Barrera-Saldana, H. A., Gelinas, R. E., and Seeburg, P. H. (1989) *Genomics* 479-497.
34. Hattori, N., Shimatsu, A., Sugita, M., Kumagai, S., and Imura, H. (1990) *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 396-401.
35. Hattori, N. (2009) *Growth Horm.IGF.Res.* 187-197.
36. Walker, W. H., Fitzpatrick, S. L., Barrera-Saldana, H. A., Resendez-Perez, D., and Saunders, G. F. (1991) *Endocr.Rev.* 316-328.
37. Misra-Press, A., Cooke, N. E., and Liebhaber, S. A. (1994) *J.Biol.Chem.* 23220-23229.

38. DeNoto, F. M., Moore, D. D., and Goodman, H. M. (1981) *Nucleic Acids Res.* 3719-3730.
39. Lecomte, C. M., Renard, A., and Martial, J. A. (1987) *Nucleic Acids Res.* 6331-6348.
40. Giorgianni, F., Beranova-Giorgianni, S., and Desiderio, D. M. (2004) *Proteomics.* 587-598.
41. Zhan, X., Giorgianni, F., and Desiderio, D. M. (2005) *Proteomics.* 1228-1241.
42. Lewis, U. J., Singh, R. N., Bonewald, L. F., and Seavey, B. K. (1981) *J Biol.Chem.* 11645-11650.
43. Diaz, M. J., Dominguez, F., Haro, L. S., Ling, N., and Devesa, J. (1993) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 134-138.
44. Haro, L. S., Lewis, U. J., Garcia, M., Bustamante, J., Martinez, A. O., and Ling, N. C. (1996) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 549-556.
45. Garcia-Barros, M., Costoya, J. A., Rios, R., Arce, V., and Devesa, J. (2000) *Horm.Res.* 40-45.
46. Bustamante, J. J., Gonzalez, L., Carroll, C. A., Weintraub, S. T., Aguilar, R. M., Munoz, J., Martinez, A. O., and Haro, L. S. (2009) *Proteomics.* 3474-3488.
47. Kohler, M., Thomas, A., Puschel, K., Schanzer, W., and Thevis, M. (2009) *J.Proteome.Res.* 1071-1076.
48. Singh, R. N. P., Seavey, B. K., Lewis, L. J., and Lewis, U. J. (1983) *J.Protein Chem* 425-436.
49. Lopez-Guajardo, C. C., Armstrong, L. S., Jordan, L., Staten, N. R., Krivi, G. G., Martinez, A. O., and Haro, L. S. (1998) *J Immunol.Methods* 179-185.

50. Such-Sanmartín, G., Bosch, J., Segura, J., Wu, M., Du, H., Chen, G., Wang, S., Vila-Perello, M., Andreu, D., and Gutiérrez-Gallego, R. (2008) *Growth Factors* 152-162.
51. De Palo, E. F., De, F., V, Gatti, R., and Spinella, P. (2006) *Clin.Chim.Acta* 67-76.
52. Such-Sanmartín, G., Bosch, J., Segura, J., and Gutiérrez-Gallego, R. (2009) *Growth Factors* 255-264.
53. Sinha, Y. N., Jacobsen, B. P., and Lewis, U. J. (1989) *Biochem.Biophys.Res.Commun* 386-393.
54. Sinha, Y. N. and Jacobsen, B. P. (1994) *J.Clin.Endocrinol Metab* 1411-1418.
55. Hettiarachchi, M., Watkinson, A., Leung, K. C., Sinha, Y. N., Ho, K. K., and Kraegen, E. W. (1997) *Endocrine*. 47-52.
56. Struman, I., Bentzien, F., Lee, H., Mainfroid, V., D'Angelo, G., Goffin, V., Weiner, R. I., and Martial, J. A. (1999) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1246-1251.
57. Ng, F. M., Jiang, W. J., Gianello, R., Pitt, S., and Roupas, P. (2000) *J.Mol.Endocrinol*. 287-298.
58. Spolaore, B., Polverino, d. L., Zambonin, M., and Fontana, A. (2004) *Biochemistry* 6576-6586.
59. Lewis, U. J., Peterson, S. M., Bonewald, L. F., Seavey, B. K., and VanderLaan, W. P. (1977) *J.Biol.Chem*. 3697-3702.
60. Chapman, G. E., Rogers, K. M., Brittain, T., Bradshaw, R. A., Bates, O. J., Turner, C., Cary, P. D., and Crane-Robinson, C. (1981) *J.Biol.Chem*. 2395-2401.
61. Stolar, M. W., Amburn, K., and Baumann, G. (1984) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 212-218.

62. Brostedt, P. and Roos, P. (1989) *Prep.Biochem.* 217-229.
63. Grigorian, A. L., Bustamante, J. J., Hernandez, P., Martinez, A. O., and Haro, L. S. (2005) *Protein Sci.* 902-913.
64. Cooke, N. E., Ray, J., Watson, M. A., Estes, P. A., Kuo, B. A., and Liebhaber, S. A. (1988) *J.Clin.Invest* 270-275.
65. Palmetshofer, A., Zechner, D., Luger, T. A., and Barta, A. (1995) *Mol.Cell Endocrinol.* 225-234.
66. Niall, H. D. (1971) *Nat.New Biol.* 90-91.
67. Lewis, U. J., Dunn, J. T., Bonewald, L. F., Seavey, B. K., and VanderLaan, W. P. (1978) *J Biol.Chem.* 2679-2687.
68. Uchida, H., Naito, N., Asada, N., Wada, M., Ikeda, M., Kobayashi, H., Asanagi, M., Mori, K., Fujita, Y., Konda, K., Kusuhara, N., Kamioka, T., Nakashima, K., and Honjo, M. (1997) *J.Biotechnol.* 101-112.
69. Canova-Davis, E., Baldonado, I. P., Moore, J. A., Rudman, C. G., Bennett, W. F., and Hancock, W. S. (1990) *Int.J.Pept.Protein Res.* 17-24.
70. Gellerfors, P., Pavlu, B., Axelsson, K., Nyhlen, C., and Johansson, S. (1990) *Acta Paediatr.Scand.Suppl* 93-100.
71. Ultsch, M. H., Somers, W., Kossiakoff, A. A., and de Vos, A. M. (1994) *J.Mol.Biol.* 286-299.
72. Kostyo, J. L., Cameron, C. M., Olson, K. C., Jones, A. J., and Pai, R. C. (1985) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 4250-4253.
73. Ader, M., Agajanian, T., Finegood, D. T., and Bergman, R. N. (1987) *Endocrinology* 725-731.
74. Takahashi, S., Shiga, Y., Satozawa, N., and Hayakawa, M. (2001) *Growth Horm.IGF.Res.* 110-116.

75. Hayakawa, M., Shimazaki, Y., Tsushima, T., Kato, Y., Takano, K., Chihara, K., Shimatsu, A., and Irie, M. (2004) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1562-1571.
76. Ishikawa, M., Tachibana, T., Kamioka, T., Horikawa, R., Katsumata, N., and Tanaka, T. (2000) *Growth Horm.IGF.Res.* 199-206.
77. Wada, M., Ikeda, M., Takahashi, Y., Asada, N., Chang, K. T., Takahashi, M., and Honjo, M. (1997) *Mol.Cell Endocrinol.* 99-107.
78. Tsunekawa, B., Wada, M., Ikeda, M., Uchida, H., Naito, N., and Honjo, M. (1999) *Endocrinology* 3909-3918.
79. Asada, N., Takahashi, Y., Wada, M., Naito, N., Uchida, H., Ikeda, M., and Honjo, M. (2000) *Mol.Cell Endocrinol.* 121-129.
80. Solomon, G., Reicher, S., Gussakovsky, E. E., Jomain, J. B., and Gertler, A. (2006) *Growth Horm.IGF.Res.* 297-307.
81. Hashimoto, Y., Kamioka, T., Hosaka, M., Mabuchi, K., Mizuchi, A., Shimazaki, Y., Tsunoo, M., and Tanaka, T. (2000) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 601-606.
82. Momomura, S., Hashimoto, Y., Shimazaki, Y., and Irie, M. (2000) *Endocr.J.* 97-101.
83. Wallace, J. D., Cuneo, R. C., Bidlingmaier, M., Lundberg, P. A., Carlsson, L., Boguszewski, C. L., Hay, J., Boroujerdi, M., Cittadini, A., Dall, R., Rosen, T., and Strasburger, C. J. (2001) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1731-1737.

84. Leung, K. C., Howe, C., Gui, L. Y., Trout, G., Veldhuis, J. D., and Ho, K. K. (2002) *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* E836-E843.
85. Keller, A., Wu, Z., Kratzsch, J., Keller, E., Blum, W. F., Knies, A., Preiss, R., Teichert, J., Strasburger, C. J., and Bidlingmaier, M. (2007) *Eur.J.Endocrinol.* 647-653.
86. Bazan, J. F. (1989) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 788-795.
87. Brooks, A. J. and Waters, M. J. (2010) *Nat.Rev.Endocrinol.* 515-525.
88. Leung, D. W., Spencer, S. A., Cachianes, G., Hammonds, R. G., Collins, C., Henzel, W. J., Barnard, R., Waters, M. J., and Wood, W. I. (1987) *Nature* 537-543.
89. Postel-Vinay, M. C. and Finidori, J. (1995) *Eur.J.Endocrinol.* 654-659.
90. Baumann, G. and Frank, S. J. (2002) *J.Endocrinol.* 361-368.
91. Herrington, J. and Carter-Su, C. (2001) *Trends Endocrinol.Metab* 252-257.
92. Frank, S. J. (2001) *Growth Horm.IGF.Res.* 201-212.
93. Cunningham, B. C., Bass, S., Fuh, G., and Wells, J. A. (1990) *Science* 1709-1712.
94. Baumann, G. (2001) *J Pediatr.Endocrinol.Metab* 355-375.
95. Kratzsch, J., Selisko, T., and Birkenmeier, G. (1995) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 585-590.
96. Baumann, G., Lowman, H. B., Mercado, M., and Wells, J. A. (1994) *J Clin.Endocrinol.Metab* 1113-1118.

97. Baumann, G., Amburn, K., and Shaw, M. A. (1988) *Endocrinology* 976-984.
98. Bidlingmaier, M., Suhr, J., Ernst, A., Wu, Z., Keller, A., Strasburger, C. J., and Bergmann, A. (2009) *Clin.Chem* 445-453.
99. Veldhuis, J. D., Johnson, M. L., Faunt, L. M., Mercado, M., and Baumann, G. (1993) *J.Clin.Invest* 629-641.
100. Lewis, U. J., Singh, R. N., Bonewald, L. F., Lewis, L. J., and VanderLaan, W. P. (1979) *Endocrinology* 1256-1265.
101. Skottner, A., Forsman, A., Skoog, B., Kostyo, J. L., Cameron, C. M., Adamafio, N. A., Thorngren, K. G., and Hagerman, M. (1988) *Acta Endocrinol.(Copenh)* 14-21.
102. Ikeda, M., Wada, M., Fujita, Y., Takahashi, S., Maekawa, K., and Honjo, M. (2000) *Growth Horm.IGF.Res.* 248-255.
103. MacLeod, J. N., Worsley, I., Ray, J., Friesen, H. G., Liebhaber, S. A., and Cooke, N. E. (1991) *Endocrinology* 1298-1302.
104. Igout, A., Frankenne, F., L'Hermite-Baleriaux, M., Martin, A., and Hennen, G. (1995) *Growth Regul.* 60-65.
105. Goodman, H. M., Tai, L. R., Ray, J., Cooke, N. E., and Liebhaber, S. A. (1991) *Endocrinology* 1779-1783.
106. Ray, J., Okamura, H., Kelly, P. A., Cooke, N. E., and Liebhaber, S. A. (1990) *J.Biol.Chem.* 7939-7944.
107. Baumann, G., Davila, N., Shaw, M. A., Ray, J., Liebhaber, S. A., and Cooke, N. E. (1991) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1175-1179.
108. Moore, W. V. (1978) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 20-27.

109. Gorden, P., Lesniak, M. A., Hendricks, C. M., and Roth, J. (1973) *Science* 829-831.
110. Wright, D. R., Goodman, A. D., and Trimble, K. D. (1974) *J.Clin.Invest* 1064-1073.
111. Nagatomi, Y., Ikeda, M., Uchida, H., Wada, M., Kobayashi, H., Hashimoto, Y., Mabuchi, K., Hayakawa, M., Kusuhara, N., and Honjo, M. (2000) *Growth Horm.IGF.Res.* 207-214.
112. Frohman, L. A., Burek, L., and Stachura, M. A. (1972) *Endocrinology* 262-269.
113. Talamantes, F., Lopez, J., Lewis, U. J., and Wilson, C. B. (1981) *Acta Endocrinol.(Copenh)* 8-13.
114. Baumann, G. and MacCart, J. G. (1982) *J Clin.Endocrinol.Metab* 611-618.
115. Markoff, E., Lee, D. W., Culler, F. L., Jones, K. L., and Lewis, U. J. (1986) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 664-669.
116. Murakami, Y., Mori, T., Koshimura, K., Kurosaki, M., Takenobu, A., Hashimoto, Y., and Kato, Y. (2000) *Endocr.J.* 563-568.
117. Baumann, G. and Stolar, M. W. (1986) *J Clin.Endocrinol.Metab* 789-790.
118. Tsushima, T., Katoh, Y., Miyachi, Y., Chihara, K., Teramoto, A., Irie, M., Hashimoto, Y., and and study group of 20K hGH (1999) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 317-322.
119. Wallace, J. D., Cuneo, R. C., Bidlingmaier, M., Lundberg, P. A., Carlsson, L., Boguszewski, C. L., Hay, J., Healy, M. L., Napoli, R., Dall, R., Rosen, T., and Strasburger, C. J. (2001) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 200-206.

120. Eriksson, L., Frankenne, F., Eden, S., Hennen, G., and Von Schoultz, B. (1989) *Br.J.Obstet.Gynaecol.* 949-953.
121. Frankenne, F., Closset, J., Gomez, F., Scippo, M. L., Smal, J., and Hennen, G. (1988) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1171-1180.
122. Lonberg, U., Damm, P., Andersson, A. M., Main, K. M., Chellakooty, M., Lauenborg, J., Skakkebaek, N. E., and Juul, A. (2003) *Am.J.Obstet.Gynecol.* 247-251.
123. Chellakooty, M., Vangsgaard, K., Larsen, T., Scheike, T., Falck-Larsen, J., Legarth, J., Andersson, A. M., Main, K. M., Skakkebaek, N. E., and Juul, A. (2004) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 384-391.
124. Wu, Z., Bidlingmaier, M., Friess, S. C., Kirk, S. E., Buchinger, P., Schiessl, B., and Strasburger, C. J. (2003) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 804-811.
125. Hennen, G., Frankenne, F., Closset, J., Gomez, F., Pirens, G., and el Khayat, N. (1985) *Int.J.Fertil.* 27-33.
126. Bidlingmaier, M. and Strasburger, C. J. (2007) *Pituitary.* 115-119.
127. Bala, R. M., Ferguson, K. A., and Beck, J. C. (1970) *Endocrinology* 506-516.
128. Goodman, A. D., Tanenbaum, R., and Rabinowitz, D. (1972) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 868-878.
129. Baumann, G., MacCart, J. G., and Amburn, K. (1983) *J Clin.Endocrinol.Metab* 946-952.
130. Stolar, M. W., Baumann, G., Vance, M. L., and Thorner, M. O. (1984) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 235-239.

131. Baumann, G., Stolar, M. W., and Amburn, K. (1985) *J Clin.Endocrinol.Metab* 1216-1220.
132. Irie, M., Ueki, M., Kishikawa, Y., Nishii, M., and Kawahara, T. (2009) *Growth Horm.IGF.Res.* 352-356.
133. Wu, Z., Devany, E., Balarini, G., Junnila, R., Bidlingmaier, M., and Strasburger, C. J. (2010) *Growth Horm.IGF.Res.* 239-244.
134. Hashimoto, Y., Ikeda, I., Ikeda, M., Takahashi, Y., Hosaka, M., Uchida, H., Kono, N., Fukui, H., Makino, T., and Honjo, M. (1998) *J.Immunol.Methods* 77-85.
135. Ishikawa, M., Yokoya, S., Tachibana, K., Hasegawa, Y., Yasuda, T., Tokuhira, E., Hashimoto, Y., and Tanaka, T. (1999) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 98-104.
136. Svensson, J., Boguszewski, C. L., Shibata, F., Carlsson, B., Carlsson, L. M., and Bengtsson, B. A. (2003) *Growth Horm.IGF.Res.* 1-7.
137. Mellado, M., Rodriguez-Frade, J. M., Kremer, L., and Martinez-Alonso, C. (1996) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1613-1618.
138. Boguszewski, C. L., Hynsjo, L., Johannsson, G., Bengtsson, B. A., and Carlsson, L. M. (1996) *Eur.J.Endocrinol.* 573-582.
139. Boguszewski, C. L., Jansson, C., Boguszewski, M. C., Rosberg, S., Wikland, K. A., Carlsson, B., and Carlsson, L. M. (1997) *Eur.J.Endocrinol.* 246-253.
140. Boguszewski, C. L., Jansson, C., Boguszewski, M. C., Rosberg, S., Carlsson, B., Albertsson-Wikland, K., and Carlsson, L. M. (1997) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2944-2949.

141. Garcia-Mayor, R. V., Perez, A. J., Gandara, A., Andrade, A., Mallo, F., and Casanueva, F. F. (1993) *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 337-343.
142. Haffner, D., Schaefer, F., Girard, J., Ritz, E., and Mehls, O. (1994) *J.Clin.Invest* 1163-1171.
143. Hanssen, K. F. (1972) *Acta Endocrinol.(Copenh)* 665-676.
144. Baumann, G. and Abramson, E. C. (1983) *J Clin.Endocrinol.Metab* 305-311.
145. Hendricks, C. M., Eastman, R. C., Takeda, S., Asakawa, K., and Gorden, P. (1985) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 864-867.
146. Bosch, J., Ueki, M., Such-Sanmartin, G., Segura, J., and Gutierrez-Gallego, R. (2012) *Anal.Chim.Acta* 56-63.
147. Baumann, G. (1979) *J Clin.Endocrinol.Metab* 495-499.
148. Vahl, N., Moller, N., Lauritzen, T., Christiansen, J. S., and Jorgensen, J. O. (1997) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 3612-3618.
149. Fuglsang, J., Sandager, P., Moller, N., Fisker, S., Orskov, H., and Ovesen, P. (2006) *Eur.J.Endocrinol.* 449-457.
150. Fredolini, C., Meani F, Reeder KA, Rucker S, Patanarut A, Botterell PJ, Bishop B, Longo, C., Espina, V., Petricoin, E. F., III, Liotta, L. A., and Luchini, A. (2008) *Nano Res* 502-518.
151. Fredolini, C., Tamburro, D., Gambara, G., Lepene, B. S., Espina, V., Petricoin, E. F., III, Liotta, L. A., and Luchini, A. (2009) *Drug Test.Anal.* 447-454.
152. Winer, L. M., Shaw, M. A., and Baumann, G. (1989) *J.Endocrinol.Invest* 461-467.

153. Gill, M. S., Toogood, A. A., O'Neill, P. A., Thorner, M. O., Shalet, S. M., and Clayton, P. E. (1998) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2562-2565.
154. Le Roith, D., Bondy, C., Yakar, S., Liu, J. L., and Butler, A. (2001) *Endocr.Rev.* 53-74.
155. Zofkova, I. (2003) *Physiol Res.* 657-679.
156. Wabitsch, M., Heinze, E., Debatin, K. M., and Blum, W. F. (2000) *Horm.Metab Res.* 555-559.
157. Le Roith, D., Scavo, L., and Butler, A. (2001) *Trends Endocrinol.Metab* 48-52.
158. Rotwein, P., Bichell, D. P., and Kikuchi, K. (1993) *Mol.Reprod.Dev.* 358-363.
159. Yang, S., Alnaqeeb, M., Simpson, H., and Goldspink, G. (1996) *J.Muscle Res.Cell Motil.* 487-495.
160. Goldspink, G. and Yang, S. Y. (2004) *Adv.Genet.* 23-49.
161. Hameed, M., Lange, K. H., Andersen, J. L., Schjerling, P., Kjaer, M., Harridge, S. D., and Goldspink, G. (2004) *J.Physiol* 231-240.
162. Barton, E. R. (2006) *J.Appl.Physiol* 1778-1784.
163. Goldspink, G., Wessner, B., and Bachl, N. (2008) *Curr.Opin.Pharmacol.* 352-357.
164. Le Roith, D. (1996) *Baillieres Clin.Endocrinol.Metab* 49-73.
165. Clemmons, D. R. (1997) *Cytokine Growth Factor Rev.* 45-62.
166. Holman, S. R. and Baxter, R. C. (1996) *Growth Regul.* 42-47.

167. Boisclair, Y. R., Rhoads, R. P., Ueki, I., Wang, J., and Ooi, G. T. (2001) *J.Endocrinol.* 63-70.
168. Baxter, R. C. (1994) *Horm.Res.* 140-144.
169. Dall, R., Lange, K. H., Kjaer, M., Jorgensen, J. O., Christiansen, J. S., Orskov, H., and Flyvbjerg, A. (2001) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 669-674.
170. Jones, J. I. and Clemmons, D. R. (1995) *Endocr.Rev.* 3-34.
171. Ranke, M. B. and Elmlinger, M. (1997) *Horm.Res.* 9-15.
172. Camacho-Hubner, C., Rose, S., Preece, M. A., Sleevi, M., Storr, H. L., Miraki-Moud, F., Minuto, F., Frystyk, J., Rogol, A., Allan, G., Sommer, A., and Savage, M. O. (2006) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1246-1253.
173. Ohlsson, C., Bengtsson, B. A., Isaksson, O. G., Andreassen, T. T., and Słotweg, M. C. (1998) *Endocr.Rev.* 55-79.
174. Clemmons, D. R., Smith-Banks, A., and Underwood, L. E. (1992) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 234-238.
175. Kupfer, S. R., Underwood, L. E., Baxter, R. C., and Clemmons, D. R. (1993) *J.Clin.Invest* 391-396.
176. Thissen, J. P., Ketelslegers, J. M., and Underwood, L. E. (1994) *Endocr.Rev.* 80-101.
177. Hotta, M., Fukuda, I., Sato, K., Hizuka, N., Shibasaki, T., and Takano, K. (2000) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 200-206.
178. Musey, V. C., Goldstein, S., Farmer, P. K., Moore, P. B., and Phillips, L. S. (1993) *Am.J.Med.Sci.* 131-138.
179. Bermon, S., Ferrari, P., Bernard, P., Altare, S., and Dolisi, C. (1999) *Acta Physiol Scand.* 51-56.

180. Felsing, N. E., Brasel, J. A., and Cooper, D. M. (1992) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 157-162.
181. Kraemer, W. J., Aguilera, B. A., Terada, M., Newton, R. U., Lynch, J. M., Rosendaal, G., McBride, J. M., Gordon, S. E., and Hakkinen, K. (1995) *J.Appl.Physiol* 1310-1315.
182. Jahreis, G., Hesse, V., Schmidt, H. E., and Scheibe, J. (1989) *Exp.Clin.Endocrinol.* 89-96.
183. Suikkari, A. M., Sane, T., Seppala, M., Yki-Jarvinen, H., Karonen, S. L., and Koivisto, V. A. (1989) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 141-144.
184. Kraemer, W. J., Gordon, S. E., Fleck, S. J., Marchitelli, L. J., Mello, R., Dziados, J. E., Friedl, K., Harman, E., Maresh, C., and Fry, A. C. (1991) *Int.J.Sports Med.* 228-235.
185. Koistinen, H., Koistinen, R., Selenius, L., Ylikorkala, Q., and Seppala, M. (1996) *J.Appl.Physiol* 760-764.
186. Nindl, B. C., Kraemer, W. J., Marx, J. O., Arciero, P. J., Dohi, K., Kellogg, M. D., and Loomis, G. A. (2001) *J.Appl.Physiol* 1319-1326.
187. Ehrnborg, C., Lange, K. H., Dall, R., Christiansen, J. S., Lundberg, P. A., Baxter, R. C., Boroujerdi, M. A., Bengtsson, B. A., Healey, M. L., Pentecost, C., Longobardi, S., Napoli, R., and Rosen, T. (2003) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 394-401.
188. Bang, P., Brandt, J., Degerblad, M., Enberg, G., Kaijser, L., Thoren, M., and Hall, K. (1990) *Eur.J.Clin.Invest* 285-292.
189. Cappon, J., Brasel, J. A., Mohan, S., and Cooper, D. M. (1994) *J.Appl.Physiol* 2490-2496.

190. Schwarz, A. J., Brasel, J. A., Hintz, R. L., Mohan, S., and Cooper, D. M. (1996) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 3492-3497.
191. Nguyen, U. N., Mouglin, F., Simon-Rigaud, M. L., Rouillon, J. D., Marguet, P., and Regnard, J. (1998) *Eur.J.Appl.Physiol Occup.Physiol* 533-537.
192. Berg, U. and Bang, P. (2004) *Horm.Res.* 50-58.
193. Sartorio, A., Marazzi, N., Agosti, F., Faglia, G., Corradini, C., De Palo, E., Cella, S., Rigamonti, A., and Muller, E. E. (2004) *J.Endocrinol.Invest* 410-415.
194. Snow, C. M., Rosen, C. J., and Robinson, T. L. (2000) *Med.Sci.Sports Exerc.* 1902-1907.
195. Healy, M. L., Dall, R., Gibney, J., Bassett, E., Ehrnborg, C., Pentecost, C., Rosen, T., Cittadini, A., Baxter, R. C., and Sonksen, P. H. (2005) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 641-649.
196. Binoux, M. (1995) *Diabete Metab* 330-337.
197. Tonshoff, B., Blum, W. F., Vickers, M., Kurilenko, S., Mehls, O., and Ritz, E. (1995) *Eur.J.Endocrinol.* 433-437.
198. Skjaerbaek, C., Frystyk, J., Kaal, A., Laursen, T., Moller, J., Weeke, J., Jorgensen, J. O., Sandahl, C. J., and Orskov, H. (2000) *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 25-33.
199. Hesse, V., Jahreis, G., Schambach, H., Vogel, H., Vilser, C., Seewald, H. J., Borner, A., and Deichl, A. (1994) *Exp.Clin.Endocrinol.* 289-298.
200. Juul, A., Bang, P., Hertel, N. T., Main, K., Dalgaard, P., Jorgensen, K., Muller, J., Hall, K., and Skakkebaek, N. E. (1994) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 744-752.

201. Lofqvist, C., Andersson, E., Gelander, L., Rosberg, S., Blum, W. F., and Albertsson, W. K. (2001) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 5870-5876.
202. Corpas, E., Harman, S. M., and Blackman, M. R. (1993) *Endocr.Rev.* 20-39.
203. Juul, A., Main, K., Blum, W. F., Lindholm, J., Ranke, M. B., and Skakkebaek, N. E. (1994) *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 85-93.
204. Ghigo, E., Aimaretti, G., Maccario, M., Fanciulli, G., Arvat, E., Minuto, F., Giordano, G., Delitala, G., and Camanni, F. (1999) *Am.J.Physiol* E1009-E1013.
205. De Palo, E. F., Gatti, R., Lancerin, F., Cappellin, E., and Spinella, P. (2001) *Clin.Chim.Acta* 1-17.
206. Strasburger, C. J., Bidlingmaier, M., Wu, Z., and Morrison, K. M. (2001) *Horm.Res.* 100-105.
207. Clayton, K. L., Holly, J. M., Carlsson, L. M., Jones, J., Cheetham, T. D., Taylor, A. M., and Dunger, D. B. (1994) *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 517-524.
208. Jorgensen, J. O., Vahl, N., Hansen, T. B., Skjaerbaek, C., Fisker, S., Orskov, H., Hagen, C., and Christiansen, J. S. (1998) *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 479-486.
209. Thissen, J. P., Ketelslegers, J. M., and Maiter, D. (1996) *Growth Regul.* 222-229.
210. Brabant, G. (2003) *Eur.J.Endocrinol.* S15-S20.
211. Lee, W. L., Chen, J. W., Ting, C. T., Ishiwata, T., Lin, S. J., Korc, M., and Wang, P. H. (1999) *Endocrinology* 4831-4840.

212. Lee, W. L., Chen, J. W., Ting, C. T., Lin, S. J., and Wang, P. H. (1999) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1575-1581.
213. Volterrani, M., Giustina, A., Manelli, F., Cicoira, M. A., Lorusso, R., and Giordano, A. (2000) *Ital.Heart J.* 732-738.
214. Jorgensen, J. O. (1991) *Endocr.Rev.* 189-207.
215. Bosch, J., Such-Sanmartin, G., Segura, J., and Gutierrez-Gallego, R. (2012) *Anal.Chim.Acta* 118-123.
216. Elloumi, M., El Elj, N., Zaouali, M., Maso, F., Filaire, E., Tabka, Z., and Lac, G. (2005) *Br.J.Sports Med.* 604-610.
217. Cohen, K. L. and Nissley, S. P. (1976) *Acta Endocrinol.(Copenh)* 243-258.
218. Janssen, J. A., Stolk, R. P., Pols, H. A., Grobbee, D. E., de Jong, F. H., and Lamberts, S. W. (1998) *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 471-478.
219. Cuneo, R. C., Hickman, P. E., Wallace, J. D., Teh, B. T., Ward, G., Veldhuis, J. D., and Waters, M. J. (1995) *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 265-275.
220. Holt, R. I., Jones, J. S., Stone, N. M., Baker, A. J., and Miell, J. P. (1996) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 160-168.
221. Poehlman, E. T. and Copeland, K. C. (1990) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1468-1473.
222. Koziris, L. P., Hickson, R. C., Chatterton, R. T., Jr., Groseth, R. T., Christie, J. M., Goldflies, D. G., and Unterman, T. G. (1999) *J.Appl.Physiol* 1436-1442.
223. Filaire, E., Jouanel, P., Colombier, M., Begue, R. J., and Lac, G. (2003) *J.Pediatr.Endocrinol.Metab* 741-750.

224. Eliakim, A., Brasel, J. A., Mohan, S., Wong, W. L., and Cooper, D. M. (1998) *Am.J.Physiol* R308-R314.
225. Chicharro, J. L., Lopez-Calderon, A., Hoyos, J., Martin-Velasco, A. I., Villa, G., Villanua, M. A., and Lucia, A. (2001) *Br.J.Sports Med.* 303-307.
226. Laursen, T., Jorgensen, J. O., Jakobsen, G., Hansen, B. L., and Christiansen, J. S. (1995) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2410-2418.
227. Johansson, J. O., Oscarsson, J., Bjarnason, R., and Bengtsson, B. A. (1996) *Metabolism* 362-369.
228. Smith, R. G., Leonard, R., Bailey, A. R., Palyha, O., Feighner, S., Tan, C., McKee, K. K., Pong, S. S., Griffin, P., and Howard, A. (2001) *Endocrine.* 9-14.
229. Broglio, F., Arvat, E., Benso, A., Gottero, C., Prodam, F., Granata, R., Papotti, M., Muccioli, G., Deghenghi, R., and Ghigo, E. (2002) *Isr.Med.Assoc.J* 607-613.
230. Howard, A. D., Feighner, S. D., Cully, D. F., Arena, J. P., Liberator, P. A., Rosenblum, C. I., Hamelin, M., Hreniuk, D. L., Palyha, O. C., Anderson, J., Paress, P. S., Diaz, C., Chou, M., Liu, K. K., McKee, K. K., Pong, S. S., Chung, L. Y., Elbrecht, A., Dashkevicz, M., Heavens, R., Rigby, M., Sirinathsinghji, D. J., Dean, D. C., Melillo, D. G., Patchett, A. A., Nargund, R., Griffin, P. R., DeMartino, J. A., Gupta, S. K., Schaeffer, J. M., Smith, R. G., and Van der Ploeg, L. H. (1996) *Science* 974-977.
231. Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazato, M., Matsuo, H., and Kangawa, K. (1999) *Nature* 656-660.

232. Root, A. W. and Root, M. J. (2002) *Curr. Drug Targets. Immune. Endocr. Metabol. Disord.* 27-52.
233. Nam, S. Y. and Lobie, P. E. (2000) *Obes. Rev* 73-86.
234. Prockop, D. J., Kivirikko, K. I., Tuderman, L., and Guzman, N. A. (1979) *N. Engl. J. Med.* 13-23.
235. Prockop, D. J., Kivirikko, K. I., Tuderman, L., and Guzman, N. A. (1979) *N. Engl. J. Med.* 77-85.
236. Kuhn, K. (1982) *Connect. Tissue Res.* 5-10.
237. Prockop, D. J. and Kivirikko, K. I. (1995) *Annu. Rev. Biochem.* 403-434.
238. Halila, R. and Peltonen, L. (1984) *Biochemistry* 1251-1256.
239. Fujimoto, D. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1124-1129.
240. Fujimoto, D. and Moriguchi, T. (1978) *J. Biochem.* 863-867.
241. Everts, V., van der, Z. E., Creemers, L., and Beertsen, W. (1996) *Histochem. J.* 229-245.
242. Bruckner, P., Bachinger, H. P., Timpl, R., and Engel, J. (1978) *Eur. J. Biochem.* 595-603.
243. Saggese, G., Baroncelli, G. I., Federico, G., and Bertelloni, S. (1995) *Horm. Res.* 55-63.
244. Niemela, O. (1994) *Alcohol Alcohol Suppl* 345-352.
245. Saggese, G., Baroncelli, G. I., Bertelloni, S., Cinquanta, L., and DiNero, G. (1994) *Pediatr. Res.* 409-415.
246. Wolthers, O. D., Heuck, C., and Heickendorff, L. (2001) *Clin. Chem.* 1721-1722.
247. Risteli, J., Niemi, S., Trivedi, P., Maentausta, O., Mowat, A. P., and Risteli, L. (1988) *Clin. Chem.* 715-718.

248. Trivedi, P., Hindmarsh, P., Risteli, J., Risteli, L., Mowat, A. P., and Brook, C. G. (1989) *J.Pediatr.* 225-230.
249. Boffa, M. J., Smith, A., Chalmers, R. J., Mitchell, D. M., Rowan, B., Warnes, T. W., Shomaf, M., and Haboubi, N. Y. (1996) *Br.J.Dermatol.* 538-544.
250. Zachariae, H., Heickendorff, L., and Sogaard, H. (2001) *Br.J.Dermatol.* 100-103.
251. Trivedi, P., Risteli, J., Risteli, L., Hindmarsh, P. C., Brook, C. G., and Mowat, A. P. (1991) *Pediatr.Res.* 276-280.
252. Bollerslev, J., Moller, J., Thomas, S., Djoseand, O., and Christiansen, J. S. (1996) *Eur.J.Endocrinol.* 666-671.
253. Verde, G. G., Santi, I., Chiodini, P., Cozzi, R., Dallabonzana, D., Oppizzi, G., and Liuzzi, A. (1986) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1406-1410.
254. Satta, J., Juvonen, T., Haukipuro, K., Juvonen, M., and Kairaluoma, M. I. (1995) *J.Vasc.Surg.* 155-160.
255. Uusimaa, P., Risteli, J., Niemela, M., Lumme, J., Ikaheimo, M., Jounela, A., and Peuhkurinen, K. (1997) *Circulation* 2565-2572.
256. Ulrich, D., Noah, E. M., Burchardt, E. R., Atkins, D., and Pallua, N. (2002) *Burns* 766-771.
257. Kurdy, N. M., Bowles, S., Marsh, D. R., Davies, A., and France, M. (1998) *J.Orthop.Trauma* 122-126.
258. Kurdy NM (2000) *J Orthop Trauma* 48-53.
259. Meduri, G. U., Tolley, E. A., Chinn, A., Stentz, F., and Postlethwaite, A. (1998) *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1432-1441.

260. Gaddnas, F., Koskela, M., Koivukangas, V., Risteli, J., Oikarinen, A., Laurila, J., Saarnio, J., and Ala-Kokko, T. (2009) *Crit Care* R53.
261. Kicman, A. T., Miell, J. P., Teale, J. D., Powrie, J., Wood, P. J., Laidler, P., Milligan, P. J., and Cowan, D. A. (1997) *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 43-50.
262. Sonksen, P. H. and et al. (1999) GH-2000 project 1-22. <http://www.gh2004.soton.ac.uk/GH-2000%20Final%20Report.pdf>.
263. Kniess, A., Ziegler, E., Kratzsch, J., Thieme, D., and Muller, R. K. (2003) *Anal.Bioanal.Chem.* 696-700.
264. Holt, R. I. (2007) *Pediatr.Endocrinol.Rev.* 228-232.
265. Wallace, J. D., Cuneo, R. C., Baxter, R., Orskov, H., Keay, N., Pentecost, C., Dall, R., Rosen, T., Jorgensen, J. O., Cittadini, A., Longobardi, S., Sacca, L., Christiansen, J. S., Bengtsson, B. A., and Sonksen, P. H. (1999) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 3591-3601.
266. Dall, R., Longobardi, S., Ehrnborg, C., Keay, N., Rosen, T., Jorgensen, J. O., Cuneo, R. C., Boroujerdi, M. A., Cittadini, A., Napoli, R., Christiansen, J. S., Bengtsson, B. A., Sacca, L., Baxter, R. C., Basset, E. E., and Sonksen, P. H. (2000) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 4193-4200.
267. Wallace, J. D., Cuneo, R. C., Lundberg, P. A., Rosen, T., Jorgensen, J. O., Longobardi, S., Keay, N., Sacca, L., Christiansen, J. S., Bengtsson, B. A., and Sonksen, P. H. (2000) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 124-133.

268. Healy, M. L., Gibney, J., Russell-Jones, D. L., Pentecost, C., Croos, P., Sonksen, P. H., and Umpleby, A. M. (2003) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 5221-5226.
269. Sartorio, A., Agosti, F., Marazzi, N., Trecate, L., Silvestri, G., Lafortuna, C., Cappa, M., De Palo, E., Faglia, G., Corradini, C., Cella, S., Rigamonti, A., and Muller, E. E. (2004) *J.Endocrinol.Invest* 121-129.
270. Nelson, A. E., Howe, C. J., Nguyen, T. V., Leung, K. C., Trout, G. J., Seibel, M. J., Baxter, R. C., Handelsman, D. J., Kazlauskas, R., and Ho, K. K. (2006) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 4424-4432.
271. Sartorio, A., Jubeau, M., Agosti, F., Marazzi, N., Rigamonti, A., Muller, E. E., and Maffiuletti, N. A. (2006) *J.Endocrinol.Invest* 237-243.
272. Powrie, J. K., Bassett, E. E., Rosen, T., Jorgensen, J. O., Napoli, R., Sacca, L., Christiansen, J. S., Bengtsson, B. A., and Sonksen, P. H. (2007) *Growth Horm.IGF.Res.* 220-226.
273. Erotokritou-Mulligan, I., Bassett, E. E., Kniess, A., Sonksen, P. H., and Holt, R. I. (2007) *Growth Horm.IGF.Res.* 416-423.
274. Erotokritou-Mulligan, I., Bassett, E. E., Bartlett, C., Cowan, D., McHugh, C., Seah, R., Curtis, B., Wells, V., Harrison, K., Sonksen, P. H., and Holt, R. I. (2008) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2760-2763.
275. Erotokritou-Mulligan, I., Bassett, E. E., Cowan, D. A., Bartlett, C., McHugh, C., Sonksen, P. H., and Holt, R. I. (2009) *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 161-168.

276. Longobardi, S., Keay, N., Ehrnborg, C., Cittadini, A., Rosen, T., Dall, R., Boroujerdi, M. A., Bassett, E. E., Healy, M. L., Pentecost, C., Wallace, J. D., Powrie, J., Jorgensen, J. O., and Sacca, L. (2000) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1505-1512.
277. Nelson, A. E., Meinhardt, U., Hansen, J. L., Walker, I. H., Stone, G., Howe, C. J., Leung, K. C., Seibel, M. J., Baxter, R. C., Handelsman, D. J., Kazlauskas, R., and Ho, K. K. (2008) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 2213-2222.
278. Nelson, A. E. and Ho K.K.Y. (2011) in *Hormone Use and Abuse by Athletes* (Ghigo E., Lanfranco F., and Strasburger C.J., Eds.), pp. 139-150.
279. Nelson, A. E. and Ho, K. K. (2009) *Growth Horm.IGF.Res.* 327-332.
280. Erotokritou-Mulligan, I., Guha, N., Stow, M., Bassett, E. E., Bartlett, C., Cowan, D. A., Sonksen, P. H., and Holt, R. I. (2012) *Growth Horm.IGF.Res.*
281. Wu, Z., Bidlingmaier, M., Dall, R., and Strasburger, C. J. (1999) *Lancet* 895.
282. Bidlingmaier, M., Wu, Z., and Strasburger, C. J. (2000) *Baillieres Best.Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab* 99-109.
283. Bidlingmaier, M. and Strasburger, C. J. (2007) *Nat.Clin.Pract.Endocrinol.Metab* 769-777.
284. Bidlingmaier, M., Suhr, J., Ernst, A., Wu, Z., Keller, A., Strasburger, C. J., and Bergmann, A. (2009) *Clin.Chem.*
285. World Anti-Doping Agency (2012) *World Anti-Doping Program.WADA:*

http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/ISL/WADA_Int_Standard_Laboratories_2012_EN.pdf.

286. Ikeda, I., Kono, N., Makino, T., and Hashimoto, Y. Monoclonal antibody specific for 20K human growth hormone and a cell line producing the monoclonal antibody. Mitsui Chemicals, Incorporated. 876042(6,197,938), 1-12. 13-6-1997. United States. Ref Type: Patent
287. Nelson, A. E., Ueki M., Nguyen T.V., Leung K.C., Howe C.J., Trout G.J., Irie, M., Baxter, R. C., Handelsman D.J., Kazlauskas R., and Ho K.Y. The influence of demographic factors on the ratio of 20-kDa and 22-kDa GH isoforms and the utility of the ratio for detection of GH doping in sport. Growth Horm.IGF.Res. 16(Supp. 2), -S3. 2006. Ref Type: Abstract
288. Gutiérrez-Gallego, R., Llop, E., Bosch, J., and Segura, J. (2011) Anal.Bioanal.Chem. 389-403.
289. Gutiérrez-Gallego, R., Bosch, J., Such-Sanmartín, G., and Segura, J. (2009) Growth Horm.IGF.Res. 388-398.
290. Merrifield, B. (1997) Methods Enzymol. 3-13.
291. Abellan, R., Ventura, R., Pichini, S., Pascual, J. A., Pacifici, R., Di Carlo, S., Bacosi, A., Segura, J., and Zuccaro, P. (2005) Clin.Chem.Lab Med. 75-85.
292. Sato M., Nozaki J., Shimazaki T., Takao Y., Otsuka Y., and Ueki M. (2005) Proceedings of the Manfred Donike Workshop 23rd Cologne Workshop on Dope Analysis 2005

- Ed.By Schänzer W, Geyer W., Gotzmann A., Mareck U,
(Sportverlag Strausz, Cologne Germany 2006) 327-336.
http://proceedings.live-record.de/proceedings_13_pdf/13_327.pdf.
293. Bland, J. M. and Altman, D. G. (1986) *Lancet* 307-310.
294. Granada, M. L., Ulied, A., Casanueva, F. F., Pico, A., Lucas, T., Torres, E., and Sanmarti, A. (2008) *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 942-950.
295. Catimel, B., Nerrie, M., Lee, F. T., Scott, A. M., Ritter, G., Welt, S., Old, L. J., Burgess, A. W., and Nice, E. C. (1997) *J.Chromatogr.A* 15-30.
296. NIBSC (2007) NIBSC report 1-3.
<http://www.nibsc.ac.uk/documents/ifu/80-505.pdf>.
297. NIBSC (2008) NIBSC report 1-3.
<http://www.nibsc.ac.uk/documents/ifu/98-574.pdf>.
298. Sikavitsas, V., Nitsche, J. M., and Mountziaris, T. J. (2002) *Biotechnol.Prog.* 885-897.
299. Goldstein, B., Coombs, D., He, X., Pineda, A. R., and Wofsy, C. (1999) *J.Mol.Recognit.* 293-299.
300. Kortt, A. A., Oddie, G. W., Iliades, P., Gruen, L. C., and Hudson, P. J. (1997) *Anal.Biochem.* 103-111.
301. Vijayendran, R. A. and Leckband, D. E. (2001) *Anal.Chem.* 471-480.
302. Paynter, S. and Russell, D. A. (2002) *Anal.Biochem.* 85-95.
303. Sesmilo, G., Biller, B. M., Llevadot, J., Hayden, D., Hanson, G., Rifai, N., and Klibanski, A. (2001) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1518-1524.

304. Laursen, T. (2004) *Growth Horm.IGF.Res.* 16-44.
305. World Anti-Doping Agency (2010) *World Anti-Doping Program.WADA:*
http://www.wada-ama.org/Documents/Resources/Guidelines/WADA_Guidelines_hGH%20Differential%20Immunoassays_EN_June10.pdf.
306. Klitgaard, T., Nielsen, J. N., Skettrup, M. P., Harper, A., and Lange, M. (2009) *Growth Horm.IGF.Res.* 463-470.
307. Okano, M., Nishitani, Y., Sato, M., Ikekita, A., and Kageyama, S. (2010) *Drug Test.Anal.* 548-556.
308. Di Luigi, L. and Guidetti, L. (2002) *Med.Sci.Sports Exerc.* 1270-1278.
309. Sartorio, A., Agosti, F., Marazzi, N., Maffiuletti, N. A., Cella, S. G., Rigamonti, A. E., Guidetti, L., Di Luigi, L., and Muller, E. E. (2004) *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 487-493.
310. Di Luigi, L., Rigamonti, A. E., Agosti, F., Mencarelli, M., Sgro, P., Marazzi, N., Cella, S. G., Muller, E. E., and Sartorio, A. (2009) *Eur.J.Endocrinol.* 753-758.
311. Holt, R. I. and Sonksen, P. H. (2008) *Br.J.Pharmacol.* 542-556.
312. Mitchell, C. J., Nelson, A. E., Cowley, M. J., Kaplan, W., Stone, G., Sutton, S. K., Lau, A., Lee, C. M., and Ho, K. K. (2009) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 4703-4709.
313. Chung, L., Clifford, D., Buckley, M., and Baxter, R. C. (2006) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 671-677.

314. Chung, L., Nelson, A. E., Ho, K. K., and Baxter, R. C. (2009) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 3038-3043.
315. Chung, L. and Baxter, R. C. (2009) *Growth Horm.IGF.Res.* 383-387.
316. Ding, J., List, E. O., Okada, S., and Kopchick, J. J. (2009) *Growth Horm.IGF.Res.* 399-407.
317. Sackmann-Sala, L., Ding, J., Frohman, L. A., and Kopchick, J. J. (2009) *Growth Horm.IGF.Res.* 471-477.
318. Ding, J., Okada, S., Jorgensen, J. O., and Kopchick, J. J. (2011) *Proteomics.* 3565-3571.
319. Such-Sanmartín, G., Bosch, J., Segura, J., and Gutiérrez-Gallego, R. (2011) *Clin.J.Sport Med.* 441-443.
320. Lange, K. H., Isaksson, F., Juul, A., Rasmussen, M. H., Bulow, J., and Kjaer, M. (2000) *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* E989-E996.
321. Erotokritou-Mulligan, I., Eryl, B. E., Cowan, D. A., Bartlett, C., Milward, P., Sartorio, A., Sonksen, P. H., and Holt, R. I. (2010) *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 520-526.
322. Arvat, E., Ceda, G., Ramunni, J., Lanfranco, F., Aimaretti, G., Gianotti, L., Broglio, F., and Ghigo, E. (1998) *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 757-763.
323. Lange, K. H., Isaksson, F., Rasmussen, M. H., Juul, A., Bulow, J., and Kjaer, M. (2001) *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 77-86.
324. Skjaerbaek, C., Frystyk, J., Moller, J., Christiansen, J. S., and Orskov, H. (1996) *Eur.J.Endocrinol.* 672-677.

325. Burman, P., Johansson, A. G., Siegbahn, A., Vessby, B., and Karlsson, F. A. (1997) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 550-555.
326. Ovesen, P., Vahl, N., Fisker, S., Veldhuis, J. D., Christiansen, J. S., and Jorgensen, J. O. (1998) *J.Clin.Endocrinol.Metab* 1662-1667.
327. Erfurth, E. M., Hagmar, L. E., Saaf, M., and Hall, K. (1996) *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 659-664.
328. Holt, R. I., Erotokritou-Mulligan, I., Ridley, S. A., McHugh, C. M., Bassett, E. E., Cowan, D. A., Bartlett, C., and Sonksen, P. H. (2009) *Growth Horm.IGF.Res.* 43-50.
329. Bredehoft, M., Schanzer, W., and Thevis, M. (2008) *Rapid Commun.Mass Spectrom.* 477-485.
330. Thevis, M., Bredehoft, M., Kohler, M., and Schanzer, W. (2010) *Handb.Exp.Pharmacol.* 201-207.

ANEXOS

ANEXOS: ANEXO A, RESULTADOS

ANEXO A. RESULTADOS.

Valores de hGH en $\mu\text{g/L}$ para los tres voluntarios del primer ensayo clínico (voluntarios 12, 13 y 14) en función del tiempo en horas, analizados mediante quimioluminiscencia por el instrumento Immulite-1000. Los tiempos en los cuales la rhGH se administró corresponden a 0, 24 y 48 h. En estos puntos la recogida de sangre se realizó antes de inyectar la dosis diaria de rhGH.

Sujeto	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	24 h	28 h
12	0.10	33.70	27.50	23.40	13.80	7.23	0.08	28.70
13	0.11	8.15	9.67	16.30	20.50	15.40	0.50	17.50
14	0.12	12.20	24.90	25.50	19.90	10.10	0.06	15.90
Sujeto	48 h	50 h	52 h	54 h	56 h	58 h	72 h	
12	0.15	21.50	32.90	22.10	14.80	6.86	0.09	
13	0.35	19.90	30.50	18.70	14.00	7.68	0.21	
14	0.32	16.40	26.90	22.00	15.10	5.98	< 0.05	

Resultados individualizados para el voluntario 12 del primer ensayo clínico obtenidos mediante el ELISA específico para isoformas 22 y 20 kDa hGH-N. Los resultados se expresan en $\mu\text{g/L}$.

		22 kDa hGH	20 kDa hGH	22/20 kDa
	Hora	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/L}$	Ratio
Día 1	0	0.077	0.011	7.0
Día 1	4	14.610	0.013	1123.8
Día 2	24	0.033	0.013	2.5
Día 2	28	16.440	0.011	1494.5
Día 3	48	0.103	0.012	8.6
Día 3	52	19.100	0.012	1591.7
Día 4	72	0.054	0.013	4.2

ANEXOS: ANEXO A, RESULTADOS

Resultados individualizados para el voluntario 13 del primer ensayo clínico obtenidos mediante el ELISA específico para isoformas 22 y 20 kDa hGH-N. Los resultados se expresan en $\mu\text{g/L}$. La rhGH se administró en los puntos 0, 24 y 48 horas.

		22 kDa hGH	20 kDa hGH	22/20 kDa
	Hora	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/L}$	Ratio
Día 1	0	0.082	0.022	3.7
Día 1	4	13.080	0.019	688.4
Día 2	24	0.240	0.009	26.7
Día 2	28	10.120	0.009	1124.4
Día 3	48	0.197	0.012	16.4
Día 3	52	17.960	0.012	1496.7
Día 4	72	0.144	0.014	10.3

Resultados individualizados para el voluntario 14 del primer ensayo clínico obtenidos mediante el ELISA específico para isoformas 22 y 20 kDa hGH-N. Los resultados se expresan en $\mu\text{g/L}$. La rhGH se administró en los puntos 0, 24 y 48 horas.

		22 kDa hGH	20 kDa hGH	22/20 kDa
	Hora	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/L}$	Ratio
Día 1	0	0.159	0.032	5.0
Día 1	2	8.520	0.033	258.2
Día 1	4	13.180	0.035	376.6
Día 1	6	15.040	0.027	557.0
Día 1	8	12.360	0.025	494.4
Día 1	10	5.720	0.028	204.3
Día 2	24	0.113	0.027	4.2
Día 2	28	9.920	0.035	283.4
Día 3	48	0.256	0.030	8.5
Día 3	50	10.500	0.032	328.1
Día 3	52	15.940	0.027	590.4
Día 3	54	12.940	0.027	479.3
Día 3	56	8.940	0.027	331.1
Día 3	58	4.440	0.029	153.1
Día 4	72	0.126	0.028	4.5

ANEXOS: ANEXO A, RESULTADOS

Resultados individualizados para el voluntario 12 del primer ensayo clínico obtenidos mediante los inmunoensayos diferenciales de isoformas rec y pit del kit 1 y kit 2 realizados por el método de FIA-TR. Los resultados se expresan en $\mu\text{g/L}$. La rhGH se administró en los puntos 0, 24 y 48 horas. Las ratios marcadas con * están calculadas mediante extrapolación con el valor marcado como inferior.

Horas	KIT 1			KIT 2		
	Rec	Pit	Ratio Rec/Pit	Rec	Pit	Ratio Rec/Pit
	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/L}$		$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/L}$	
0	0.058	< 0.100	0.58*	0.036	< 0.100	0.36*
4	24.920	1.032	24.15	25.394	4.539	5.59
24	0.053	< 0.100	0.53*	0.041	< 0.100	0.41*
28	25.081	1.166	21.51	24.638	3.235	7.62
48	0.103	< 0.100	1.03*	0.103	< 0.100	1.03*
52	29.452	1.178	25.00	28.698	2.914	9.85
72	0.050	< 0.100	0.50*	0.047	< 0.100	0.47*

Resultados individualizados para el voluntario 13 del primer ensayo clínico obtenidos mediante los inmunoensayos diferenciales de isoformas rec y pit del kit 1 y kit 2 realizados por el método de FIA-TR. Los resultados se expresan en $\mu\text{g/L}$. La rhGH se administró en los puntos 0, 24 y 48 horas. Las ratios marcadas con * están calculadas mediante extrapolación con el valor marcado como inferior.

Horas	KIT 1			KIT 2		
	Rec	Pit	Ratio Rec/Pit	Rec	Pit	Ratio Rec/Pit
	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/L}$		$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/L}$	
0	0.067	< 0.100	0.67*	0.046	< 0.100	0.46*
4	15.036	0.104	144.58	15.605	1.868	8.35
24	0.357	< 0.100	3.57*	0.307	< 0.100	3.07*
28	13.002	< 0.100	130.02*	13.205	1.719	7.68
48	0.265	< 0.100	2.65*	0.217	< 0.100	2.17*
52	24.941	1.281	19.47	25.761	4.262	6.04
72	0.160	0.127	1.26	0.121	< 0.100	1.21*

ANEXOS: ANEXO A, RESULTADOS

Resultados individualizados para el voluntario 14 del primer ensayo clínico obtenidos mediante los inmunoensayos diferenciales de isoformas rec y pit del kit 1 y kit 2 realizados por el método de FIA-TR. Los resultados se expresan en $\mu\text{g/L}$. La rhGH se administró en los puntos 0, 24 y 48 horas. Las ratios marcadas con * están calculadas mediante extrapolación con el valor marcado como inferior.

Horas	KIT 1			KIT 2		
	Rec $\mu\text{g/L}$	Pit $\mu\text{g/L}$	Ratio Rec/Pit	Rec $\mu\text{g/L}$	Pit $\mu\text{g/L}$	Ratio Rec/Pit
0	0.063	< 0.100	0.63*	0.056	< 0.100	0.56*
2	10.001	< 0.100	100.01*	10.460	1.004	10.42
4	18.100	0.907	19.96	19.978	4.754	4.20
6	18.773	0.518	36.24	21.460	2.241	9.58
8	13.513	0.232	58.25	16.564	1.675	9.89
10	6.716	< 0.100	67.16*	8.692	0.737	11.79
24	0.031	< 0.100	0.31*	0.030	< 0.100	0.30*
28	10.629	< 0.100	106.29*	13.091	1.113	11.76
48	0.216	< 0.100	2.16*	0.270	< 0.100	2.70*
50	13.560	0.127	106.77	13.413	1.392	9.64
52	20.835	0.671	31.05	22.691	2.955	7.68
54	18.523	0.515	35.97	19.110	1.828	10.45
56	11.960	0.113	105.84	13.734	1.180	11.64
58	4.410	< 0.100	44.10*	4.680	0.465	10.06
72	0.021	< 0.100	0.21*	0.016	< 0.100	0.16*

ANEXOS: ANEXO A, RESULTADOS

Resultados individualizados para el voluntario 12 del primer ensayo clínico obtenidos mediante los inmunoensayos diferenciales de isoformas rec y pit del kit 1 y kit 2 (ILMA). Los resultados se expresan en $\mu\text{g/L}$. La rhGH se administró en los puntos 0, 24 y 48 horas.

Horas	KIT 1			KIT 2		
	Rec	Pit	Ratio Rec/Pit	Rec	Pit	Ratio Rec/Pit
	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/L}$		$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/L}$	
0	0.072	0.249	0.29	0.067	0.198	0.34
2	20.957	6.724	3.12	20.776	11.164	1.86
4	19.659	7.693	2.56	25.816	10.281	2.51
6	11.824	3.758	3.15	15.787	7.072	2.23
8	7.943	2.231	3.56	11.611	3.474	3.34
10	4.378	1.318	3.32	5.580	1.940	2.88
24	0.052	0.107	0.49	0.056	0.109	0.51
28	19.270	6.530	2.95	24.295	9.914	2.45
48	0.079	0.097	0.81	0.092	0.122	0.75
50	12.481	3.863	3.23	19.309	6.885	2.80
52	19.930	5.515	3.61	25.690	14.687	1.75
54	11.623	3.824	3.04	18.536	6.491	2.86
56	7.633	3.019	2.53	12.093	4.423	2.73
58	4.180	1.275	3.28	5.401	1.820	2.97
72	0.044	0.038	1.16	0.055	0.077	0.71

ANEXOS: ANEXO A, RESULTADOS

Resultados individualizados para el voluntario 13 del primer ensayo clínico obtenidos mediante los inmunoensayos diferenciales de isoformas rec y pit del kit 1 y kit 2 (ILMA). Los resultados se expresan en $\mu\text{g/L}$. La rhGH se administró en los puntos 0, 24 y 48 horas.

Horas	KIT 1			KIT 2		
	Rec	Pit	Ratio Rec/Pit	Rec	Pit	Ratio Rec/Pit
	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/L}$		$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/L}$	
0	0.045	0.132	0.34	0.065	0.150	0.43
2	5.336	2.300	2.32	6.719	4.962	1.35
4	7.962	2.704	2.94	10.278	5.446	1.89
6	10.347	4.162	2.49	14.832	6.882	2.16
8	9.402	4.836	1.94	15.070	7.693	1.96
10	7.743	3.602	2.15	11.655	6.004	1.94
24	0.251	0.227	1.11	0.283	0.452	0.63
28	11.070	4.162	2.66	13.391	6.047	2.21
48	0.176	0.188	0.94	0.217	0.400	0.54
50	10.418	3.782	2.75	14.475	6.794	2.13
52	17.432	12.835	1.36	23.545	18.731	1.26
54	10.737	4.778	2.25	14.562	6.637	2.19
56	7.134	2.647	2.70	8.392	4.233	1.98
58	4.021	1.390	2.89	5.113	2.184	2.34
72	0.109	0.080	1.36	0.126	0.169	0.75

ANEXOS: ANEXO A, RESULTADOS

Resultados individualizados para el voluntario 14 del primer ensayo clínico obtenidos mediante los inmunoensayos diferenciales de isoformas rec y pit del kit 1 y kit 2 (ILMA). Los resultados se expresan en $\mu\text{g/L}$. La rhGH se administró en los puntos 0, 24 y 48 horas.

Horas	KIT 1			KIT 2		
	Rec $\mu\text{g/L}$	Pit $\mu\text{g/L}$	Ratio Rec/Pit	Rec $\mu\text{g/L}$	Pit $\mu\text{g/L}$	Ratio Rec/Pit
0	0.064	0.202	0.32	0.067	0.214	0.31
2	8.046	2.143	3.75	9.998	3.990	2.51
4	11.552	5.652	2.04	19.238	16.554	1.16
6	13.640	5.010	2.72	21.796	8.063	2.70
8	11.309	3.728	3.03	12.864	7.166	1.80
10	6.331	1.789	3.54	7.713	3.023	2.55
24	0.029	0.037	0.78	0.036	0.034	1.06
28	11.098	3.066	3.62	12.559	3.919	3.20
48	0.171	0.089	1.92	0.192	0.154	1.25
50	10.334	4.279	2.42	11.857	8.385	1.41
52	17.359	7.962	2.18	21.958	14.005	1.57
54	15.228	4.555	3.34	17.160	8.443	2.03
56	9.004	2.332	3.86	11.924	4.068	2.93
58	3.992	1.017	3.93	4.139	2.585	1.60
72	0.019	0.022	0.86	0.022	0.028	0.79

ANEXOS: ANEXO A, RESULTADOS

Resumen de los datos obtenidos en nuestro laboratorio de la validación para el inmuno-ensayo diferencial de isoformas. Las abreviaturas corresponden a: LOD. límite de detección; LOQ. límite de cuantificación; CV. coeficiente de variación; In. Std. incertidumbre estándar.

	Rec kit 1	Pit kit 1	Ratio kit 1	Rec kit 2	Pit kit 2	Ratio kit 2
LOD µg/L	0.030	0.035	-----	0.023	0.029	-----
LOQ µg/L	0.067	0.067	-----	0.067	0.067	-----
Intra- ensayo CV %	0.9- 5.2	4.7-15.0	-----	3.9-15.7	1.2-11.7	-----
Inter- ensayo CV %	5.6- 6.2	1.5-11.8	6.8- 10.8	2.6-6.4	8.0-12.2	7.4- 16.7
Linealidad %	91.9- 123.9	82.6- 107.7	-----	82.0- 125.0	89.3- 113.0	-----
In. Std. %	5.6- 6.2	1.5-11.8	6.4- 13.1	2.6-6.4	8.0-12.2	8.4- 13.8

ANEXOS: ANEXO A, RESULTADOS

Resultados individualizados para los voluntarios del segundo ensayo clínico obtenidos por ELISA específico de isoformas de 22 y 20 kDa hGH y los inmuno-ensayos diferenciales rec y pit del kit 1 y kit 2. Resultados en µg/L. La rhGH se administró en los puntos 0, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 horas. La recogida de sangre se realizó justo antes de inyectar la dosis diaria de rhGH. Las ratios marcadas con * se han calculado mediante extrapolación con el valor marcado como inferior.

Voluntario 01							
Horas	22 kDa hGH			20 kDa hGH		ratio 22/20 kDa hGH	
	Immulite	ELISA	Luminex®	ELISA	Luminex®	ELISA	Luminex®
	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	ratio	ratio
-72	< 0.050	0.127	< 0.010	0.006	< 0.005	21.2	2.0*
-24	< 0.050	0.171	0.015	0.009	< 0.005	19.0	3.0*
0	< 0.050	0.085	0.022	0.007	< 0.005	12.1	4.4*
4	31.400	31.464	18.198	0.006	0.008	5244.0	2274.8
8	11.900	10.258	7.845	0.005	< 0.005	2051.6	1569.0*
24	< 0.050	< 0.050	0.010	< 0.005	< 0.005	10.0*	2.0*
28	27.500	26.335	18.224	0.888	0.848	29.7	21.5
32	10.900	10.335	8.020	0.005	< 0.005	2067.0	1604.0*
48	< 0.050	0.138	0.062	0.005	< 0.005	27.6	12.4*
52	27.600	25.070	19.498	0.009	0.013	2785.6	1499.8
56	12.500	12.002	8.232	0.009	0.010	1333.6	823.2
72	< 0.050	< 0.050	0.063	< 0.005	< 0.005	10.0*	12.6*
80	11.300	10.895	9.019	0.008	0.006	1361.9	1503.2
96	< 0.050	< 0.050	0.042	< 0.005	< 0.005	10.0*	8.4*
104	9.810	8.769	7.018	0.005	0.008	1753.8	877.3
120	0.069	0.093	0.084	0.009	< 0.005	10.3	16.8*
128	16.700	13.576	11.958	0.007	0.006	1939.4	1993.0
144	< 0.050	0.092	< 0.010	0.005	< 0.005	18.4	2.0*
146	6.210	5.282	4.928	0.005	< 0.005	1056.4	985.6*
148	14.300	12.512	10.180	< 0.005	< 0.005	2502.4*	2036.0*
150	16.000	15.063	10.447	< 0.005	0.008	3012.6*	1305.9
152	12.100	10.187	8.522	< 0.005	< 0.005	2037.4*	1704.4*
154	11.100	8.527	7.505	0.005	< 0.005	1705.4	1501.0*
156	6.820	5.809	5.347	< 0.005	< 0.005	1161.8*	1069.4*
168	0.083	0.172	0.035	< 0.005	< 0.005	34.4*	7.0*
176	0.266	0.154	< 0.010	0.007	< 0.005	22.0	2.0*
192	< 0.050	0.098	0.013	0.007	< 0.005	14.0	2.6*
312	< 0.050	0.058	0.208	0.009	0.007	6.4	29.7
480	< 0.050	< 0.050	0.190	0.005	< 0.005	10.0*	38.0*

ANEXOS: ANEXO A, RESULTADOS

Voluntario 01						
Horas	hGH kit1 Rec µg/L	hGH kit1 Pit µg/L	kit1 ratio Rec/Pit	hGH kit2 Rec µg/L	hGH kit2 Pit µg/L	kit2 ratio Rec/Pit
-72	-----	-----	-----	-----	-----	-----
-24	0.049	0.056	0.88	0.057	0.023	2.48
0	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
8	-----	-----	-----	-----	-----	-----
24	0.050	0.032	1.56	0.051	0.030	1.70
28	19.174	3.900	4.92	23.778	7.420	3.20
32	-----	-----	-----	-----	-----	-----
48	0.048	0.038	1.26	0.048	0.033	1.45
52	-----	-----	-----	-----	-----	-----
56	-----	-----	-----	-----	-----	-----
72	0.056	0.037	1.51	0.057	0.031	1.84
80	-----	-----	-----	-----	-----	-----
96	0.039	0.030	1.30	0.038	0.025	1.52
104	-----	-----	-----	-----	-----	-----
120	0.068	0.067	1.01	0.070	0.065	1.08
128	-----	-----	-----	-----	-----	-----
144	0.041	0.029	1.41	0.042	0.029	1.45
146	-----	-----	-----	-----	-----	-----
148	-----	-----	-----	-----	-----	-----
150	12.821	2.213	5.79	14.756	4.376	3.37
152	-----	-----	-----	-----	-----	-----
154	-----	-----	-----	-----	-----	-----
156	5.202	1.034	5.03	6.554	1.894	3.46
168	0.098	0.038	2.58	0.112	0.028	4.00
176	-----	-----	-----	-----	-----	-----
192	0.052	0.043	1.21	0.056	0.044	1.27
312	-----	-----	-----	-----	-----	-----
480	0.038	0.029	1.31	0.039	0.036	1.08

ANEXOS: ANEXO A, RESULTADOS

Voluntario 02							
	22 kDa hGH			20 kDa hGH		ratio 22/20 kDa hGH	
	Immulite	ELISA	Luminex®	ELISA	Luminex®	ELISA	Luminex®
Horas	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	ratio	ratio
-72	0.051	< 0.050	0.218	< 0.005	0.011	10.0*	19.8
-24	0.091	0.071	0.240	0.012	0.021	5.9	11.4
0	0.066	0.057	0.208	0.006	0.019	9.5	10.9
4	20.900	10.414	17.955	< 0.005	0.018	2082.8*	997.5
8	13.900	8.671	12.387	< 0.005	0.016	1734.2*	774.2
24	0.566	0.607	0.638	0.060	0.072	10.1	8.9
28	12.800	9.788	11.140	4.002	3.623	2.4	3.1
32	10.200	7.167	9.832	< 0.005	0.015	1433.4*	655.5
48	0.310	0.253	0.331	< 0.005	0.008	50.6*	41.4
52	21.100	12.256	18.683	0.093	0.107	131.8	174.6
56	11.700	7.258	9.375	< 0.005	0.012	1451.6*	781.3
72	0.168	0.060	0.215	< 0.005	0.009	12.0*	23.9
80	10.300	6.672	8.835	< 0.005	0.012	1334.4*	736.3
96	0.350	0.567	0.363	0.006	< 0.005	94.5	72.6*
104	16.400	8.948	11.196	< 0.005	< 0.005	1789.6*	2239.2*
120	0.189	0.253	0.222	< 0.005	< 0.005	50.6*	44.4*
128	12.800	8.203	11.632	< 0.005	< 0.005	1640.6*	2326.4*
144	0.073	0.102	0.801	< 0.005	< 0.005	20.4*	160.2*
146	8.350	5.025	6.750	< 0.005	< 0.005	1005.0*	1350.0*
148	15.500	9.844	15.461	< 0.005	< 0.005	1968.8*	3092.2*
150	17.100	9.810	15.563	< 0.005	< 0.005	1962.0*	3112.6*
152	11.800	7.123	10.760	< 0.005	< 0.005	1424.6*	2152.0*
154	9.020	5.652	9.986	< 0.005	< 0.005	1130.4*	1997.2*
156	5.070	3.162	4.839	< 0.005	< 0.005	632.4*	967.8*
168	0.131	0.181	0.217	< 0.005	< 0.005	36.2*	43.4*
176	0.205	< 0.050	0.159	< 0.005	< 0.005	10.0*	31.8*
192	< 0.050	< 0.050	0.152	< 0.005	< 0.005	10.0*	30.4*
312	0.167	0.078	0.125	0.009	< 0.005	8.7	25.0*
480	0.643	0.597	0.374	0.042	< 0.005	14.2	74.8*

ANEXOS: ANEXO A, RESULTADOS

Voluntario 02						
Horas	hGH kit1 Rec µg/L	hGH kit1 Pit µg/L	kit1 ratio Rec/Pit	hGH kit2 Rec µg/L	hGH kit2 Pit µg/L	kit2 ratio Rec/Pit
-72	-----	-----	-----	-----	-----	-----
-24	0.077	0.234	0.33	0.091	0.134	0.68
0	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
8	-----	-----	-----	-----	-----	-----
24	0.398	0.748	0.53	0.380	0.556	0.68
28	8.878	2.182	4.07	11.342	3.651	3.11
32	-----	-----	-----	-----	-----	-----
48	0.242	0.118	2.05	0.215	0.108	1.99
52	-----	-----	-----	-----	-----	-----
56	-----	-----	-----	-----	-----	-----
72	0.134	0.094	1.43	0.136	0.092	1.48
80	-----	-----	-----	-----	-----	-----
96	0.281	0.149	1.89	0.251	0.168	1.49
104	-----	-----	-----	-----	-----	-----
120	0.157	0.100	1.57	0.157	0.104	1.51
128	-----	-----	-----	-----	-----	-----
144	0.089	0.045	1.98	0.029	0.057	0.51
146	-----	-----	-----	-----	-----	-----
148	-----	-----	-----	-----	-----	-----
150	11.559	2.563	4.51	14.942	4.758	3.14
152	-----	-----	-----	-----	-----	-----
154	-----	-----	-----	-----	-----	-----
156	3.636	0.971	3.74	4.434	1.275	3.48
168	0.127	0.061	2.08	0.173	0.069	2.51
176	-----	-----	-----	-----	-----	-----
192	0.051	0.034	1.50	0.054	0.040	1.35
312	-----	-----	-----	-----	-----	-----
480	0.453	0.398	1.14	0.390	0.420	0.93

ANEXOS: ANEXO A, RESULTADOS

Voluntario 03							
Horas	22 kDa hGH			20 kDa hGH		ratio 22/20 kDa hGH	
	Immulite	ELISA	Luminex®	ELISA	Luminex®	ELISA	Luminex®
	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	ratio	ratio
-72	< 0.050	< 0.050	< 0.010	0.006	0.024	8.3*	0.4*
-24	< 0.050	< 0.050	< 0.010	0.005	0.016	10.0*	0.6*
0	< 0.050	0.059	< 0.010	0.007	0.021	8.4	0.5*
4	16.200	15.391	14.458	0.006	0.030	2565.2	481.9
8	9.770	6.572	9.960	0.006	0.021	1095.3	474.3
24	0.078	0.133	0.027	0.009	0.014	14.8	1.9
28	7.130	7.230	7.538	6.836	7.855	1.1	1.0
32	1.630	1.835	1.455	< 0.005	0.019	367.0*	76.6
48	< 0.050	0.063	< 0.010	0.007	0.019	9.0	0.5*
52	13.200	14.634	8.510	< 0.005	0.023	2926.8*	370.0
56	11.200	7.480	8.332	0.005	0.025	1496.0	333.3
72	0.055	0.066	0.013	0.006	0.014	11.0	0.9
80	7.350	5.182	7.068	< 0.005	0.016	1036.4*	441.8
96	0.067	0.119	0.017	0.006	0.018	19.8	0.9
104	12.900	9.317	11.198	< 0.005	0.011	1863.4*	1018.0
120	0.071	0.118	0.022	< 0.005	0.007	23.6*	3.1
128	10.400	12.249	8.546	< 0.005	0.014	2449.8*	610.4
144	< 0.050	< 0.050	< 0.010	< 0.005	< 0.005	10.0*	2.0*
146	11.300	7.887	9.687	< 0.005	0.018	1577.4*	538.2
148	12.200	7.787	10.125	< 0.005	0.013	1557.4*	778.8
150	11.500	7.186	9.982	0.006	0.012	1197.7	831.8
152	5.800	3.771	6.824	< 0.005	< 0.005	754.2*	1 364.8*
154	3.620	4.188	3.867	< 0.005	0.013	837.6*	297.5
156	1.830	2.287	2.043	< 0.005	0.011	457.4*	185.7
168	0.086	0.159	0.032	< 0.005	< 0.005	31.8*	6.4*
176	< 0.050	0.053	< 0.010	< 0.005	0.007	10.6*	1.4*
192	< 0.050	0.058	< 0.010	0.005	0.009	11.6	1.1*
312	< 0.050	0.062	< 0.010	0.006	0.009	10.3	1.1*
480	< 0.050	0.131	< 0.010	0.009	0.018	14.6	0.6*

ANEXOS: ANEXO A, RESULTADOS

Voluntario 03						
Horas	hGH kit1 Rec µg/L	hGH kit1 Pit µg/L	kit1 ratio Rec/Pit	hGH kit2 Rec µg/L	hGH kit2 Pit µg/L	kit2 ratio Rec/Pit
-72	-----	-----	-----	-----	-----	-----
-24	0.038	0.022	1.73	0.040	0.032	1.25
0	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
8	-----	-----	-----	-----	-----	-----
24	0.080	0.193	0.41	0.081	0.044	1.84
28	5.961	1.133	5.26	7.687	1.693	4.54
32	-----	-----	-----	-----	-----	-----
48	0.048	0.177	0.27	0.048	0.034	1.41
52	-----	-----	-----	-----	-----	-----
56	-----	-----	-----	-----	-----	-----
72	0.060	0.125	0.48	0.060	0.033	1.82
80	-----	-----	-----	-----	-----	-----
96	0.067	0.107	0.63	0.073	0.040	1.83
104	-----	-----	-----	-----	-----	-----
120	0.071	0.087	0.82	0.077	0.038	2.03
128	-----	-----	-----	-----	-----	-----
144	0.042	0.021	2.00	0.047	0.031	1.52
146	-----	-----	-----	-----	-----	-----
148	-----	-----	-----	-----	-----	-----
150	8.108	1.606	5.05	8.386	3.165	2.65
152	-----	-----	-----	-----	-----	-----
154	-----	-----	-----	-----	-----	-----
156	1.545	0.295	5.24	1.423	0.556	2.56
168	0.103	0.045	2.29	0.103	0.057	1.81
176	-----	-----	-----	-----	-----	-----
192	0.046	0.045	1.02	0.046	0.037	1.24
312	-----	-----	-----	-----	-----	-----
480	0.047	0.052	0.90	0.048	0.050	0.96

ANEXOS: ANEXO A, RESULTADOS

Voluntario 04							
Horas	22 kDa hGH			20 kDa hGH		ratio 22/20 kDa hGH	
	Immulite	ELISA	Luminex®	ELISA	Luminex®	ELISA	Luminex®
	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	ratio	ratio
-72	< 0.050	0.142	0.211	0.011	< 0.005	12.9	42.2*
-24	< 0.050	0.144	0.211	< 0.005	< 0.005	28.8*	42.2*
0	< 0.050	0.132	0.220	< 0.005	< 0.005	26.4*	44.0*
4	< 0.050	0.123	0.203	< 0.005	< 0.005	24.6*	40.6*
8	< 0.050	0.130	0.196	0.011	< 0.005	11.8	39.2*
24	< 0.050	0.152	0.198	0.014	< 0.005	10.9	39.6*
28	< 0.050	0.249	0.248	1.214	1.583	0.2	0.2
32	< 0.050	0.120	0.203	0.017	< 0.005	7.1	40.6*
48	< 0.050	0.149	0.212	0.012	< 0.005	12.4	42.4*
52	< 0.050	0.119	0.190	< 0.005	< 0.005	23.8*	38.0*
56	< 0.050	0.104	0.186	< 0.005	< 0.005	20.8*	37.2*
72	< 0.050	0.123	0.190	0.011	< 0.005	11.2	38.0*
80	0.051	0.160	0.204	0.012	< 0.005	13.3	40.8*
96	< 0.050	0.133	0.197	0.041	< 0.005	3.2	39.4*
104	< 0.050	0.167	0.215	0.011	< 0.005	15.2	43.0*
120	< 0.050	0.130	0.213	0.011	< 0.005	11.8	42.6*
128	< 0.050	0.100	0.191	< 0.005	< 0.005	20.0*	38.2*
144	< 0.050	0.135	0.208	< 0.005	< 0.005	27.0*	41.6*
146	< 0.050	0.123	0.199	< 0.005	< 0.005	24.6*	39.8*
148	< 0.050	0.106	0.173	< 0.005	< 0.005	21.2*	34.6*
150	< 0.050	0.120	0.211	0.010	< 0.005	12.0	42.2*
152	< 0.050	0.167	0.198	0.011	< 0.005	15.2	39.6*
154	< 0.050	0.153	0.200	0.011	< 0.005	13.9	40.0*
156	< 0.050	0.109	0.200	< 0.005	< 0.005	21.8*	40.0*
168	< 0.050	0.130	0.198	< 0.005	< 0.005	26.0*	39.6*
176	< 0.050	0.125	0.188	< 0.005	< 0.005	25.0*	37.6*
192	< 0.050	0.122	0.197	0.012	< 0.005	10.2	39.4*
312	< 0.050	0.148	0.202	0.016	< 0.005	9.3	40.4*
480	< 0.050	0.160	0.191	0.013	< 0.005	12.3	38.2*

ANEXOS: ANEXO A, RESULTADOS

Voluntario 04						
Horas	hGH kit1 Rec µg/L	hGH kit1 Pit µg/L	kit1 ratio Rec/Pit	hGH kit2 Rec µg/L	hGH kit2 Pit µg/L	kit2 ratio Rec/Pit
-72	-----	-----	-----	-----	-----	-----
-24	0.060	0.068	0.88	0.061	0.064	0.95
0	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
8	-----	-----	-----	-----	-----	-----
24	-----	-----	-----	-----	-----	-----
28	0.057	0.059	0.97	0.064	0.046	1.39
32	-----	-----	-----	-----	-----	-----
48	-----	-----	-----	-----	-----	-----
52	-----	-----	-----	-----	-----	-----
56	-----	-----	-----	-----	-----	-----
72	0.048	0.055	0.87	0.045	0.042	1.07
80	-----	-----	-----	-----	-----	-----
96	0.043	0.046	0.93	0.040	0.035	1.14
104	-----	-----	-----	-----	-----	-----
120	0.048	0.116	0.41	0.044	0.069	0.64
128	-----	-----	-----	-----	-----	-----
144	0.051	0.060	0.85	0.053	0.056	0.95
146	-----	-----	-----	-----	-----	-----
148	-----	-----	-----	-----	-----	-----
150	0.049	0.047	1.04	0.049	0.036	1.36
152	-----	-----	-----	-----	-----	-----
154	-----	-----	-----	-----	-----	-----
156	0.041	0.032	1.28	0.044	0.026	1.69
168	0.045	0.053	0.85	0.052	0.035	1.49
176	-----	-----	-----	-----	-----	-----
192	0.042	0.046	0.91	0.045	0.035	1.29
312	-----	-----	-----	-----	-----	-----
480	0.049	0.068	0.72	0.054	0.053	1.02

ANEXOS: ANEXO A, RESULTADOS

Voluntario 05								
Horas	22 kDa hGH			20 kDa hGH			ratio 22/20 kDa hGH	
	Immulite	ELISA	Luminex®	ELISA	Luminex®	ELISA	Luminex®	
	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	ratio	ratio	
-72	0.065	0.260	0.192	0.025	0.031	10.4	6.2	
-24	0.341	0.500	0.330	0.045	0.046	11.1	7.2	
0	0.086	0.295	0.229	0.033	0.036	8.9	6.4	
4	16.600	14.524	14.374	0.026	0.031	558.6	463.7	
8	6.090	6.860	6.072	0.024	0.026	285.8	233.5	
24	0.119	0.347	0.254	0.032	0.023	10.8	11.0	
28	16.700	15.253	15.720	0.860	1.071	17.7	14.7	
32	3.890	4.993	3.547	0.029	0.031	172.2	114.4	
48	0.101	0.293	0.217	0.031	0.038	9.5	5.7	
52	21.700	23.267	19.860	0.453	0.584	51.4	34.0	
56	5.270	6.540	4.984	0.026	0.031	251.5	160.8	
72	0.429	0.540	0.417	0.051	0.054	10.6	7.7	
80	4.850	4.868	4.834	0.023	0.018	211.7	268.6	
96	1.140	1.366	1.142	0.092	0.088	14.8	13.0	
104	5.420	8.597	4.938	0.026	0.023	330.7	214.7	
120	0.170	0.401	0.280	0.031	0.034	12.9	8.2	
128	4.900	7.341	4.894	0.020	0.023	367.1	212.8	
144	0.098	0.278	0.221	0.026	0.027	10.7	8.2	
146	20.400	11.870	20.068	0.991	0.988	12.0	20.3	
148	15.400	8.896	14.890	0.077	0.084	115.5	177.3	
150	13.200	8.547	12.942	0.046	0.041	185.8	315.7	
152	6.580	5.704	7.533	0.023	0.017	248.0	443.1	
154	3.880	3.684	3.897	0.022	0.019	167.5	205.1	
156	2.210	2.245	2.096	0.019	0.017	118.2	123.3	
168	1.080	1.263	1.022	0.075	0.077	16.8	13.3	
176	0.734	0.796	0.838	0.237	0.132	3.4	6.3	
192	1.980	1.623	1.806	0.341	0.250	4.8	7.2	
312	0.191	0.368	0.352	0.043	0.018	8.6	19.6	
480	0.092	0.286	0.195	0.028	0.045	10.2	4.3	

ANEXOS: ANEXO A, RESULTADOS

Voluntario 05						
Horas	hGH kit1 Rec µg/L	hGH kit1 Pit µg/L	kit1 ratio Rec/Pit	hGH kit2 Rec µg/L	hGH kit2 Pit µg/L	kit2 ratio Rec/Pit
-72	-----	-----	-----	-----	-----	-----
-24	0.308	0.306	1.01	0.386	0.200	1.93
0	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
8	-----	-----	-----	-----	-----	-----
24	0.097	0.223	0.43	0.089	0.161	0.55
28	15.210	3.648	4.17	17.204	4.507	3.82
32	-----	-----	-----	-----	-----	-----
48	0.082	0.215	0.38	0.078	0.146	0.53
52	-----	-----	-----	-----	-----	-----
56	-----	-----	-----	-----	-----	-----
72	0.368	0.348	1.06	0.329	0.291	1.13
80	-----	-----	-----	-----	-----	-----
96	1.067	0.883	1.21	0.881	0.605	1.46
104	-----	-----	-----	-----	-----	-----
120	0.156	0.219	0.71	0.163	0.157	1.04
128	-----	-----	-----	-----	-----	-----
144	0.088	0.173	0.51	0.081	0.113	0.72
146	-----	-----	-----	-----	-----	-----
148	-----	-----	-----	-----	-----	-----
150	12.574	3.010	4.18	14.933	4.064	3.67
152	-----	-----	-----	-----	-----	-----
154	-----	-----	-----	-----	-----	-----
156	2.133	0.413	5.16	2.516	0.637	3.95
168	0.953	0.777	1.23	1.077	0.556	1.94
176	-----	-----	-----	-----	-----	-----
192	1.437	3.717	0.39	1.669	1.857	0.90
312	-----	-----	-----	-----	-----	-----
480	0.088	0.102	0.86	0.086	0.070	1.23

ANEXOS: ANEXO A, RESULTADOS

Voluntario 06							
Horas	22 kDa hGH			20 kDa hGH		ratio 22/20 kDa hGH	
	Immulite	ELISA	Luminex®	ELISA	Luminex®	ELISA	Luminex®
	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	ratio	ratio
-72	1.490	1.180	1.158	0.102	0.156	11.6	7.4
-24	0.285	0.230	0.287	0.036	0.038	6.4	7.6
0	0.104	0.069	0.181	0.018	0.015	3.8	12.1
4	19.600	17.055	14.888	0.014	0.009	1218.2	1654.2
8	8.850	7.464	7.021	0.014	0.006	533.1	1170.2
24	2.280	2.238	1.687	0.245	0.239	9.1	7.1
28	25.200	17.577	21.723	1.718	2.877	10.2	7.6
32	7.680	6.985	6.283	0.017	0.012	410.9	523.6
48	6.790	5.812	7.234	0.958	0.795	6.1	9.1
52	24.500	20.488	18.374	0.015	0.011	1365.9	1670.4
56	6.070	5.634	5.140	0.011	0.007	512.2	734.3
72	1.330	1.060	0.933	0.085	0.121	12.5	7.7
80	7.000	5.662	6.205	0.016	0.007	353.9	886.4
96	0.606	0.450	0.438	0.056	0.036	8.0	12.2
104	10.800	7.964	8.899	< 0.005	< 0.005	1592.8*	1779.8*
120	1.480	1.108	1.230	0.103	0.156	10.8	7.9
128	8.250	6.156	6.922	< 0.005	0.006	1231.2*	1153.7
144	1.330	0.851	1.003	0.090	0.121	9.5	8.3
146	11.700	6.312	9.878	0.065	0.086	97.1	114.9
148	17.200	13.708	14.217	0.013	0.011	1054.5	1292.5
150	14.000	8.965	11.506	0.010	0.007	896.5	1643.7
152	10.300	8.878	8.349	0.018	< 0.005	493.2	1669.8*
154	4.830	4.258	3.847	0.012	< 0.005	354.8	769.4*
156	2.170	1.444	1.616	0.012	< 0.005	120.3	323.2*
168	1.660	0.967	1.123	0.142	0.132	6.8	8.5
176	1.250	0.921	0.864	0.112	0.097	8.2	8.9
192	0.300	0.245	0.278	0.036	0.020	6.8	13.9
312	0.056	0.052	0.147	0.018	< 0.005	2.9	29.4*
480	0.530	0.391	0.378	0.060	0.041	6.5	9.2

ANEXOS: ANEXO A, RESULTADOS

Voluntario 06						
Horas	hGH kit1 Rec µg/L	hGH kit1 Pit µg/L	kit1 ratio Rec/Pit	hGH kit2 Rec µg/L	hGH kit2 Pit µg/L	kit2 ratio Rec/Pit
-72	-----	-----	-----	-----	-----	-----
-24	0.328	0.271	1.21	0.389	0.162	2.40
0	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
8	-----	-----	-----	-----	-----	-----
24	2.341	2.229	1.05	1.910	1.464	1.30
28	23.169	4.084	5.67	26.684	5.297	5.04
32	-----	-----	-----	-----	-----	-----
48	5.983	6.254	0.96	5.742	4.513	1.27
52	-----	-----	-----	-----	-----	-----
56	-----	-----	-----	-----	-----	-----
72	1.247	1.151	1.08	1.093	0.708	1.54
80	-----	-----	-----	-----	-----	-----
96	0.522	0.382	1.37	0.561	0.272	2.06
104	-----	-----	-----	-----	-----	-----
120	1.348	1.456	0.93	1.215	1.000	1.22
128	-----	-----	-----	-----	-----	-----
144	1.053	1.048	1.00	1.196	0.736	1.63
146	-----	-----	-----	-----	-----	-----
148	-----	-----	-----	-----	-----	-----
150	13.711	2.080	6.59	16.236	3.120	5.20
152	-----	-----	-----	-----	-----	-----
154	-----	-----	-----	-----	-----	-----
156	2.204	0.359	6.14	2.451	0.489	5.01
168	1.388	1.259	1.10	1.655	0.811	2.04
176	-----	-----	-----	-----	-----	-----
192	0.331	0.314	1.05	0.394	0.168	2.35
312	-----	-----	-----	-----	-----	-----
480	0.508	0.454	1.12	0.528	0.313	1.69

ANEXOS: ANEXO A, RESULTADOS

Voluntario 07							
	22 kDa hGH			20 kDa hGH		ratio 22/20 kDa hGH	
	Immulite	ELISA	Luminex®	ELISA	Luminex®	ELISA	Luminex®
Horas	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	ratio	ratio
-72	< 0.050	0.071	0.045	0.010	0.033	7.1	1.4
-24	< 0.050	0.060	0.041	< 0.005	0.030	12.0*	1.4
0	< 0.050	0.071	0.041	< 0.005	0.040	14.2*	1.0
4	< 0.050	< 0.050	0.035	0.014	0.040	3.6*	0.9
8	0.133	0.103	0.104	0.016	0.050	6.4	2.1
24	< 0.050	0.267	0.043	0.026	0.032	10.3	1.3
28	0.093	0.107	0.140	0.167	0.175	0.6	0.8
32	< 0.050	0.082	0.055	0.015	0.031	5.5	1.8
48	< 0.050	0.072	0.045	0.010	0.032	7.2	1.4
52	< 0.050	0.067	0.044	0.012	0.030	5.6	1.5
56	< 0.050	< 0.050	0.035	< 0.005	0.031	10.0*	1.1
72	< 0.050	0.094	0.047	0.012	0.035	7.8	1.3
80	< 0.050	0.079	0.036	0.015	0.028	5.3	1.3
96	< 0.050	0.085	0.045	0.016	0.035	5.3	1.3
104	< 0.050	0.060	0.038	0.011	0.028	5.5	1.4
120	0.055	0.063	0.042	0.010	0.035	6.3	1.2
128	0.140	0.260	0.107	0.025	0.035	10.4	3.1
144	< 0.050	0.057	0.043	< 0.005	0.026	11.4*	1.7
146	< 0.050	< 0.050	0.038	< 0.005	0.032	10.0*	1.2
148	< 0.050	< 0.050	0.034	< 0.005	0.024	10.0*	1.4
150	< 0.050	0.096	0.042	0.015	0.030	6.4	1.4
152	< 0.050	0.073	0.042	0.017	0.030	4.3	1.4
154	0.924	0.982	0.942	0.119	0.117	8.3	8.1
156	< 0.050	0.111	0.057	0.015	0.026	7.4	2.2
168	< 0.050	0.076	0.044	0.014	0.026	5.4	1.7
176	< 0.050	0.080	0.055	0.015	0.023	5.3	2.4
192	< 0.050	0.099	0.051	0.014	0.025	7.1	2.0
312	< 0.050	0.071	0.039	0.012	0.019	5.9	2.1
480	< 0.050	0.114	0.044	0.016	0.032	7.1	1.4

ANEXOS: ANEXO A, RESULTADOS

Voluntario 07						
Horas	hGH kit1 Rec µg/L	hGH kit1 Pit µg/L	kit1 ratio Rec/Pit	hGH kit2 Rec µg/L	hGH kit2 Pit µg/L	kit2 ratio Rec/Pit
-72	-----	-----	-----	-----	-----	-----
-24	0.037	0.048	0.77	0.043	0.034	1.26
0	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
8	-----	-----	-----	-----	-----	-----
24	-----	-----	-----	-----	-----	-----
28	0.058	0.074	0.78	0.065	0.056	1.16
32	-----	-----	-----	-----	-----	-----
48	-----	-----	-----	-----	-----	-----
52	-----	-----	-----	-----	-----	-----
56	-----	-----	-----	-----	-----	-----
72	-----	-----	-----	-----	-----	-----
80	-----	-----	-----	-----	-----	-----
96	-----	-----	-----	-----	-----	-----
104	-----	-----	-----	-----	-----	-----
120	0.043	0.062	0.69	0.040	0.037	1.08
128	-----	-----	-----	-----	-----	-----
144	0.045	0.051	0.88	0.047	0.040	1.18
146	-----	-----	-----	-----	-----	-----
148	-----	-----	-----	-----	-----	-----
150	0.050	0.049	1.02	0.050	0.038	1.32
152	-----	-----	-----	-----	-----	-----
154	-----	-----	-----	-----	-----	-----
156	0.051	0.074	0.69	0.050	0.053	0.94
168	0.052	0.059	0.88	0.053	0.037	1.43
176	-----	-----	-----	-----	-----	-----
192	0.064	0.061	1.05	0.070	0.047	1.49
312	-----	-----	-----	-----	-----	-----
480	0.051	0.058	0.88	0.052	0.029	1.79

ANEXOS: ANEXO A, RESULTADOS

Voluntario 08							
Horas	22 kDa hGH			20 kDa hGH		ratio 22/20 kDa hGH	
	Immulite	ELISA	Luminex®	ELISA	Luminex®	ELISA	Luminex®
Horas	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	ratio	ratio
-72	0.176	0.205	0.123	0.017	0.013	12.1	9.5
-24	0.092	0.134	0.067	0.009	< 0.005	14.9	13.4*
0	0.190	0.215	0.131	0.017	0.019	12.6	6.9
4	24.900	21.876	12.351	0.009	< 0.005	2430.7	2470.2*
8	12.500	10.898	6.716	0.008	< 0.005	1362.3	1343.2*
24	0.170	0.208	0.095	0.009	< 0.005	23.1	19.0*
28	16.200	11.430	8.865	0.045	0.054	254.0	164.2
32	10.200	9.073	5.938	< 0.005	< 0.005	1814.6*	1187.6*
48	0.180	0.139	0.093	< 0.005	< 0.005	27.8*	18.6*
52	13.900	10.251	7.739	0.012	< 0.005	854.3	1547.8*
56	11.100	8.542	6.153	< 0.005	< 0.005	1708.4*	1230.6*
72	0.158	0.158	0.078	0.005	< 0.005	31.6	15.6*
80	9.530	6.634	5.242	0.005	< 0.005	1326.8	1048.4*
96	0.088	0.147	0.038	< 0.005	< 0.005	29.4*	7.6*
104	9.330	7.519	5.407	< 0.005	< 0.005	1503.8*	1081.4*
120	0.091	0.076	0.035	< 0.005	< 0.005	15.2*	7.0*
128	9.620	5.773	5.377	< 0.005	< 0.005	1154.6*	1075.4*
144	0.098	0.098	0.044	< 0.005	< 0.005	19.6*	8.8
146	9.810	7.481	6.372	0.029	0.033	258.0	193.1
148	12.000	7.874	6.736	< 0.005	< 0.005	1574.8*	1347.2*
150	12.400	8.319	7.313	0.006	< 0.005	1386.5	1462.6*
152	7.190	5.385	4.392	< 0.005	< 0.005	1077.0*	878.4*
154	6.750	5.015	3.531	< 0.005	< 0.005	1003.0*	706.2*
156	4.650	3.565	2.692	< 0.005	< 0.005	713.0*	538.4*
168	0.323	0.221	0.140	< 0.005	< 0.005	44.2*	28*
176	0.077	0.112	0.038	< 0.005	< 0.005	22.4*	7.6*
192	< 0.050	0.065	0.017	< 0.005	< 0.005	13.0*	3.4*
312	0.067	0.170	0.049	0.011	< 0.005	15.5	9.8*
480	0.050	0.097	0.028	0.010	< 0.005	9.7	5.6*

ANEXOS: ANEXO A, RESULTADOS

Voluntario 08						
Horas	hGH kit1 Rec µg/L	hGH kit1 Pit µg/L	kit1 ratio Rec/Pit	hGH kit2 Rec µg/L	hGH kit2 Pit µg/L	kit2 ratio Rec/Pit
-72	-----	-----	-----	-----	-----	-----
-24	0.088	0.161	0.55	0.102	0.093	1.10
0	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
8	-----	-----	-----	-----	-----	-----
24	0.144	0.111	1.30	0.136	0.104	1.31
28	11.783	2.212	5.33	14.776	3.648	4.05
32	-----	-----	-----	-----	-----	-----
48	0.141	0.084	1.68	0.143	0.083	1.72
52	-----	-----	-----	-----	-----	-----
56	-----	-----	-----	-----	-----	-----
72	0.135	0.095	1.42	0.141	0.082	1.72
80	-----	-----	-----	-----	-----	-----
96	0.084	0.064	1.31	0.085	0.065	1.31
104	-----	-----	-----	-----	-----	-----
120	0.082	0.069	1.19	0.081	0.053	1.53
128	-----	-----	-----	-----	-----	-----
144	0.100	0.073	1.37	0.121	0.070	1.73
146	-----	-----	-----	-----	-----	-----
148	-----	-----	-----	-----	-----	-----
150	9.024	1.550	5.82	11.878	3.125	3.80
152	-----	-----	-----	-----	-----	-----
154	-----	-----	-----	-----	-----	-----
156	3.441	0.583	5.90	4.628	1.242	3.73
168	0.295	0.076	3.88	0.344	0.098	3.51
176	-----	-----	-----	-----	-----	-----
192	0.046	0.045	1.02	0.040	0.020	2.00
312	-----	-----	-----	-----	-----	-----
480	0.061	0.074	0.82	0.057	0.031	1.84

ANEXOS: ANEXO A, RESULTADOS

Voluntario 09							
Horas	22 kDa hGH			20 kDa hGH		ratio 22/20 kDa hGH	
	Immulite	ELISA	Luminex®	ELISA	Luminex®	ELISA	Luminex®
µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	µg/L	ratio	ratio
-72	< 0.050	0.208	0.138	0.024	< 0.005	8.7	27.6*
-24	< 0.050	0.223	0.138	0.024	0.013	9.3	10.6
0	0.051	0.236	0.150	0.028	0.015	8.4	10.0
4	24.700	18.282	17.691	0.022	< 0.005	831.0	3538.2*
8	13.300	6.950	10.275	0.025	< 0.005	278.0	2055.0*
24	0.315	0.504	0.247	0.020	< 0.005	25.2	49.4*
28	> 72.300	> 77.000	> 80.000	0.749	0.868	-----	-----
32	10.700	7.742	9.625	0.016	< 0.005	483.9	1925.0*
48	0.096	0.227	0.131	0.018	< 0.005	12.6	26.2*
52	26.200	23.811	19.794	0.020	< 0.005	1190.6	3958.8*
56	8.630	6.805	7.438	0.016	< 0.005	425.3	1487.6*
72	0.070	0.211	0.097	0.018	< 0.005	11.7	19.4*
80	10.600	6.893	8.125	0.019	< 0.005	362.8	1625.0*
96	0.088	0.325	0.135	0.019	< 0.005	17.1	27.0*
104	10.500	7.842	8.359	0.017	< 0.005	461.3	1671.8*
120	0.084	0.252	0.132	0.015	< 0.005	16.8	26.4*
128	7.820	5.921	7.290	0.020	< 0.005	296.1	1458.0*
144	< 0.050	0.185	0.082	0.017	< 0.005	10.9	16.4*
146	12.400	8.734	10.733	0.018	< 0.005	485.2	2146.6*
148	20.600	14.697	18.969	0.018	< 0.005	816.5	3793.8*
150	15.300	8.473	10.740	0.021	< 0.005	403.5	2148.0*
152	9.270	7.416	6.691	0.020	< 0.005	370.8	1338.2*
154	4.790	4.174	4.249	0.018	< 0.005	231.9	849.8*
156	2.460	1.997	1.800	0.016	< 0.005	124.8	360.0*
168	< 0.050	0.221	0.099	0.016	< 0.005	13.8	19.8*
176	< 0.050	0.208	0.082	0.017	< 0.005	12.2	16.4*
192	< 0.050	0.218	0.085	0.019	< 0.005	11.5	17.0*
312	0.263	0.454	0.364	0.062	0.058	7.3	6.3
480	0.052	0.340	0.171	0.032	0.017	10.6	10.1

ANEXOS: ANEXO A, RESULTADOS

Voluntario 09						
Horas	hGH kit1 Rec µg/L	hGH kit1 Pit µg/L	kit1 ratio Rec/Pit	hGH kit2 Rec µg/L	hGH kit2 Pit µg/L	kit2 ratio Rec/Pit
-72	-----	-----	-----	-----	-----	-----
-24	0.053	0.085	0.62	0.050	0.056	0.89
0	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4	-----	-----	-----	-----	-----	-----
8	-----	-----	-----	-----	-----	-----
24	0.274	0.106	2.58	0.268	0.145	1.85
28	> 45.550	> 45.550	-----	> 45.550	> 45.550	-----
32	-----	-----	-----	-----	-----	-----
48	0.094	0.064	1.47	0.100	0.066	1.52
52	-----	-----	-----	-----	-----	-----
56	-----	-----	-----	-----	-----	-----
72	0.078	0.048	1.63	0.081	0.053	1.53
80	-----	-----	-----	-----	-----	-----
96	0.092	0.062	1.48	0.090	0.059	1.53
104	-----	-----	-----	-----	-----	-----
120	0.092	0.064	1.44	0.091	0.056	1.63
128	-----	-----	-----	-----	-----	-----
144	0.043	0.040	1.08	0.042	0.020	2.10
146	-----	-----	-----	-----	-----	-----
148	-----	-----	-----	-----	-----	-----
150	12.859	3.166	4.06	14.073	5.634	2.50
152	-----	-----	-----	-----	-----	-----
154	-----	-----	-----	-----	-----	-----
156	1.895	0.421	4.50	2.037	0.777	2.62
168	0.056	0.040	1.40	0.056	0.020	2.80
176	-----	-----	-----	-----	-----	-----
192	0.048	0.044	1.09	0.051	0.021	2.43
312	-----	-----	-----	-----	-----	-----
480	0.060	0.149	0.40	0.057	0.116	0.49

ANEXOS: ANEXO A, RESULTADOS

Valores de IGF-I para los voluntarios del primer ensayo clínico (voluntarios 12, 13 y 14) en función del tiempo en horas, analizados mediante quimioluminiscencia por el instrumento Immulite-1000. La rhGH se administró en los tiempos 0, 24 y 48 h. En estos puntos la recogida de sangre se realizó antes de inyectar la dosis diaria de rhGH.

Sujeto	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	24 h	28 h
12	194	191	164	228	253	268	355	375
13	183	160	133	171	168	238	303	322
14	178	189	210	223	249	282	330	325

Sujeto	48 h	50 h	52 h	54 h	56 h	58 h	72 h
12	459	441	604	474	489	567	541
13	394	367	391	386	399	423	450
14	449	417	371	417	431	484	489

Valores de P-III-NP e IGF BP-3 para los voluntarios del primer ensayo clínico (voluntarios 12, 13 y 14) en función del tiempo en horas. Los puntos analizados fueron seleccionados. La IGF BP-3 se analizó por quimioluminiscencia por el instrumento Immulite-1000 y el P-III-NP por radioinmunoensayo (RIA). La rhGH se administró en los puntos 0, 24 y 48 h. En estos puntos la recogida de sangre se realizó antes de inyectar la dosis diaria de rhGH.

P-III-NP µg/L							
Sujeto	0 h	4 h	48 h	52 h	56 h	72 h	
12	4.29	3.75	5.92	4.31	6.52	6.53	
13	3.73	2.33	4.52	3.96	3.99	5.52	
14	3.64	3.96	5.02	4.23	4.51	5.94	

IGFBP-3 mg/L							
Sujeto	0 h	4 h	48 h	52 h	56 h	72 h	
12	3.49	3.32	4.36	4.58	4.49	4.53	
13	3.91	3.93	4.50	4.98	4.99	4.59	
14	3.45	3.42	3.90	4.68	4.31	4.53	

ANEXOS: ANEXO A, RESULTADOS

Valores de los marcadores IGF-I, P-III-NP e IGF BP-3 para los voluntarios del segundo ensayo clínico (voluntarios 01, 02, 03 y 04) en función del tiempo en horas. La IGF-I e IGF BP-3 se analizaron por quimioluminiscencia por el instrumento Immulite-1000 y el P-III-NP por radioinmunoensayo (RIA). La rhGH se administró en los puntos 0, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h. En estos puntos la recogida de sangre se realizó antes de inyectar la dosis diaria de rhGH.

Horas	Voluntario 01			Voluntario 02		
	IGF-I	P-III-NP	IGFBP-3	IGF-I	P-III-NP	IGFBP-3
	µg/L	µg/L	mg/L	µg/L	µg/L	mg/L
0	194	3.18	3.80	247	3.27	3.10
72	535	4.75	3.95	538	3.38	4.60
148	422	3.27	4.24	492	3.23	4.14
168	410	4.06	5.17	671	3.75	4.99
192	400	3.40	4.85	411	3.55	4.68
312	235	3.62	4.11	245	2.98	3.20
480	200	3.31	3.85	185	2.78	3.26

Horas	Voluntario 03			Voluntario 04		
	IGF-I	P-III-NP	IGFBP-3	IGF-I	P-III-NP	IGFBP-3
	µg/L	µg/L	mg/L	µg/L	µg/L	mg/L
0	262	10.86	5.34	134	4.19	3.49
72	519	10.70	5.96	122	5.01	3.37
148	552	12.46	6.33	116	3.98	3.38
168	670	15.25	6.43	128	4.38	3.62
192	512	14.95	6.44	128	4.00	3.39
312	323	14.17	5.72	108	4.34	3.53
480	332	14.87	5.43	118	3.76	3.38

ANEXOS: ANEXO A, RESULTADOS

Valores de los marcadores IGF-I, P-III-NP e IGF BP-3 para los voluntarios del segundo ensayo clínico (voluntarios 05, 06, 07, 08 y 09) en función del tiempo en horas.

Voluntario 05				Voluntario 06		
	IGF-I	P-III-NP	IGFBP-3	IGF-I	P-III-NP	IGFBP-3
Horas	µg/L	µg/L	mg/L	µg/L	µg/L	mg/L
0	463	4.25	4.79	259	4.31	4.06
72	598	5.35	4.87	505	5.46	4.19
148	478	5.31	5.11	446	6.10	3.13
168	660	5.50	7.32	597	6.96	4.47
192	504	5.04	5.53	313	7.89	4.93
312	451	4.59	5.49	330	5.31	5.42
480	355	4.73	4.52	292	4.70	3.91

Voluntario 07				Voluntario 08		
	IGF-I	P-III-NP	IGFBP-3	IGF-I	P-III-NP	IGFBP-3
Horas	µg/L	µg/L	mg/L	µg/L	µg/L	mg/L
0	233	3.47	3.41	352	3.36	4.10
72	230	3.92	3.58	578	3.82	4.26
148	89	2.91	3.02	613	3.45	5.10
168	161	3.59	3.45	574	5.07	5.86
192	225	3.64	3.24	632	4.68	4.57
312	206	3.54	3.33	346	4.83	4.83
480	205	3.64	3.33	406	4.80	4.67

Voluntario 09			
	IGF-I	P-III-NP	IGFBP-3
Horas	µg/L	µg/L	mg/L
0	143	3.05	3.40
72	515	5.27	4.75
148	420	5.63	3.59
168	529	8.37	4.75
192	213	9.20	4.65
312	156	5.90	3.12
480	189	4.75	3.04

ANEXOS: ANEXO B, ARTÍCULOS

Bosch J, Ueki M, Such-Sanmartín G, Segura J, Gutiérrez-Gallego R. [Tracking growth hormone abuse in sport: a comparison of distinct isoform-based assays](#). Anal Chim Acta. 2012; 733:56-63.

Bosch J, Such-Sanmartín G, Segura J, Gutiérrez- Gallego R. [Tracking growth hormone abuse in sport: Performance of marker proteins in a controlled setting](#). Anal Chim Acta. 2012; 745:118-23.