

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:  
ENDOCRINOLOGIA  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

IMPORTÂNCIA DOS ENSAIOS PARA MEDIDA  
DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO  
NA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA  
ACROMEGALIA

Alessandra Casagrande

Porto Alegre, 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:  
ENDOCRINOLOGIA  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

IMPORTÂNCIA DOS ENSAIOS PARA MEDIDA  
DO HORMÔNIO DE CRESCIMENTO  
NA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA  
ACROMEGALIA

Alessandra Casagrande

Orientador: Prof. Dr. Mauro Antônio Czepielewski

Porto Alegre, 2005

## SUMÁRIO

Lista de tabelas .....	5
Lista de figuras .....	6
Lista de abreviaturas .....	7
INTRODUÇÃO .....	8
OBJETIVOS .....	11
REFERÊNCIAS.....	12

## ARTIGO DE REVISÃO

ENSAIOS PARA MEDIDA DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO NA ACROMEGALIA: ASPECTOS MOLECULARES, METODOLÓGICOS E SUAS APLICAÇÕES.....	16
---	----

## ARTIGO ORIGINAL

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ACROMEGALIA ATRAVÉS DE ENSAIO QUIMIOLUMINESCENTE 20/22 kDa ESPECÍFICO	
Resumo .....	42
Abstract .....	44
Introdução .....	46
Pacientes e métodos .....	47
Análise estatística .....	50
Resultados .....	51
Discussão .....	54
Referências.....	59
Anexo.....	67

ARTIGO EM INGLÊS:

EVALUATION OF ACROMEGALY STATUS USING A CHEMILUMINESCENCE  
20/22 kDa SPECIFIC ASSAY

Abstract.....	69
Introduction.....	71
Subjects and Methods.....	72
Results.....	75
Discussion.....	79
Anexx.....	86
References.....	87

## Lista de tabelas

## ARTIGO DE REVISÃO

## ENSAIOS PARA MEDIDA DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO NA ACROMEGALIA: ASPECTOS MOLECULARES, METODOLÓGICOS E SUAS APLICAÇÕES

Tabela 1. Formas moleculares de GH encontradas na hipófise.....	37
Tabela 2. Proporções estimadas de formas imunoreativas de GH no plasma após 15 minutos de secretadas pela hipófise.....	38
Tabela 3. Critérios de cura da acromegalia.....	39
Tabela 4. Critérios de cura da acromegalia, segundo Consenso.....	40

## ARTIGO ORIGINAL

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ACROMEGALIA ATRAVÉS DE ENSAIO QUIMIOLUMINESCENTE 20/22 kDa ESPECÍFICO

Tabela 1. Dados clínicos dos pacientes estudados .....	64
Tabela 2. Valores de GH basal e nadir em indivíduos normais e pacientes acromegálicos, classificados de acordo com os níveis de IGF-1.....	65

## Lista de figuras

## ARTIGO ORIGINAL

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DA ACROMEGALIA ATRAVÉS DE ENSAIO  
QUIMIOLUMINESCENTE 20/22 kDa ESPECÍFICO

Figura 1. Valores médios de GH basal e nadir em indivíduos normais e em  
pacientes acromegálicos com IGF-1 normal e  
baixo.....66

## Lista de abreviaturas

AMPc: Adenosina Monofosfato Cíclica

DM2: Diabete Melito tipo 2

GH: Hormônio do Crescimento

GHb: Hormônio do Crescimento basal

GHm: Hormônio do crescimento médio

IMC: Índice de Massa Corporal

IRMA: Imunorradiométrico

IRMAm: Imunorradiométrico monoclonal

IS: International Standard

kDa: Kilodalton

QML: Quimioluminescência

RIE: Radioimunoensaio

ARNm: Ácido Ribonucléico Mensageiro

TTOG: Teste de Tolerância Oral a Glicose

WHO: World Health Organization

## Introdução

Acromegalia é uma doença rara, causada quase que exclusivamente por um tumor hipofisário produtor de hormônio do crescimento (GH). As conseqüências do excesso de GH são algumas vezes incapacitantes e associadas a um aumento na mortalidade, principalmente de origem cardiorrespiratória. Mais de 50% dos pacientes acromegálicos são hipertensos e cerca de 30% apresentam alterações obstrutivas do trato respiratório (1).

O tratamento da acromegalia visa à remoção do tumor, a redução dos níveis de GH para valores normais e a regressão de suas complicações (2, 3).

A mensuração do GH sérico começou a ser possível a partir da introdução do radioimunoensaio (RIE), em 1960, o qual foi utilizado por mais de duas décadas. Por ser uma técnica laboriosa e muito pouco sensível, o que inviabiliza a dosagem do GH em indivíduos normais, o RIE passou a ser substituído por ensaios capazes de mensurar valores de GH anteriormente considerados indetectáveis (4).

O princípio dos imunoenaios é o de comparar uma amostra indeterminada com uma referência de igual substância biológica, de concentração conhecida. Esta substância deve ser estável, de forma que seja possível a reprodução dos resultados com diferentes amostras. A *World Health Organization (WHO)*, através do programa de padronização de ensaios biológicos, foi responsável pela distribuição de substâncias calibradoras (*International Standards*) utilizadas na geração dos resultados. Inicialmente o material empregado era derivado de hipófises humanas, composto por diversos tipos moleculares da substância a ser examinada (5). Os resultados eram

dados em termos de unidades de bioatividade, definida de forma arbitrária para determinar a quantidade de hormônio existente em uma determinada amostra. No entanto, isso simplesmente refletia a incapacidade existente à época em caracterizar quantidades analisadas em valores absolutos de massa. Com o desenvolvimento de ensaios mais sensíveis e específicos não houve, entretanto, uma reorganização metodológica, e as mesmas características adotadas para o RIE foram incorporadas e utilizadas nesses ensaios. Bethlen e col. (6) foram os primeiros a descrever a presença de discrepâncias na determinação do GH em diferentes ensaios comerciais. Celniker e col. (7) comparando resultados produzidos através de diferentes RIEs e ensaios imunoradiométricos, constataram que os valores diferiam em até 3 vezes. No mesmo estudo observou-se que os valores mais elevados de GH correspondiam àqueles dosados com anticorpos policlonais e calibradores derivados de hipófise humana. Já os valores mais baixos foram encontrados em ensaios que utilizavam anticorpos monoclonais específicos e calibradores produzidos através de GH recombinante. A conclusão do estudo foi que o uso de anticorpos diferentes, mono ou policlonais, e o emprego de calibradores derivados de hipófise ou 22 kDa interferem significativamente nos valores de GH.

Em virtude do uso cada vez mais freqüente de GH recombinante como calibrador e deste ter sido o único a ter sua concentração determinada em massa ao invés de unidade, os valores de GH passaram a ser descritos em mg/ml ou µg/l. A partir de então, sugeriu-se o uso de fatores de conversão como um meio de uniformizar os valores de referência entre os diferentes

ensaios e expressá-los em uma mesma unidade. No entanto, isto não foi suficiente para eliminar as diferenças existentes entre os ensaios (8).

As concentrações de GH são as bases para a maioria das decisões terapêuticas. Em 2000 (9), sugeriu-se como critério de cura da acromegalia, níveis séricos de GH nadir após sobrecarga com glicose inferior a 1 µg/l e IGF-1 normal para sexo e idade. Estudos posteriores realizados com ensaios ultrasensíveis questionaram essa orientação, sugerindo valores ainda mais baixos (10-19). Praticamente todos os dados epidemiológicos até o momento relacionam a mortalidade aos níveis séricos de GH, no entanto, com a melhora dos ensaios de IGF-1 (2, 13, 22, 23) já tem sido demonstrado a sua importância na determinação da atividade da acromegalia (3, 10, 14, 16, 20). O desenvolvimento do tratamento que antagoniza o receptor do GH, inibindo a sua ação e normalizando os níveis de IGF-1, requer novos estudos que avaliem a relação GH/IGF-1. Dados que sugerem aumento na mortalidade em pacientes com níveis de IGF-1 elevado; entretanto, pacientes submetidos à cirurgia, com IGF-1 normal, mas nadir de GH elevado após sobrecarga oral com glicose no período pós-operatório, apresentam risco aumentado de recorrência da doença. Em aproximadamente 30% dos pacientes existe uma discordância entre os valores de GH e IGF-1 durante o tratamento; no entanto, não se sabe o seu impacto na mortalidade desses pacientes (2, 10, 14, 21).

Neste estudo apresentamos os dados obtidos a partir dos níveis de GH medidos por quimioluminescência em uma coorte de 55 pacientes acromegálicos, sua correlação com os níveis de IGF-1 e com os valores de GH observados em 15 indivíduos normais.

## **Objetivos**

### **Principais**

- 1) Determinar os níveis de GH basal e após sobrecarga oral de glicose em indivíduos normais e compará-los com os observados em pacientes acromegálicos tratados e não tratados, em diversos estágios de atividade da doença, através do método quimioluminescente (*Immulite 2000*) utilizado rotineiramente no hospital.
- 2) Determinar qual o valor de nadir de GH com Intervalo de Confiança de 95% mais adequado para considerar como valor de referência para cura ou remissão da acromegalia.

### **Secundário**

- 1) Correlacionar os níveis de IGF-1 com GH basal e nadir em pacientes acromegálicos com diversos estágios de atividade da doença.

## Referências bibliográficas

1. Nabarro JD. Acromegaly. **Clin Endocrinol (Oxf)** 1987; 26:481-512.
2. Ayuk J, Clayton RN, Holder G, Sheppard MC, Stewart PM, Bates AS. Growth hormone and pituitary radiotherapy, but not serum insulin-like growth factor-I concentrations, predict excess mortality in patients with acromegaly. **J Clin Endocrinol Metab** 2004; 89:1613-7.
3. Holdaway IM, Rajasoorya CR, Gamble GD, Stewart AW. Long-term treatment outcome in acromegaly. **Growth Horm IGF Res** 2003; 13:185-92.
4. Seth J, Ellis A, Al-Sadie R. Serum growth hormone measurements in clinical practice: An audit of performance from the UK National External Quality Assessment scheme. **Horm Res** 1999; 51 Suppl 1:13-9.
5. Bristow AF. International standards for growth hormone. **Horm Res** 1999; 51 Suppl 1:7-12.
6. Blethen SL, Chasalow FI. Use of a two-site immunoradiometric assay for growth hormone (GH) in identifying children with GH-dependent growth failure. **J Clin Endocrinol Metab** 1983; 57:1031-5.
7. Celniker AC, Chen AB, Wert RM, Jr., Sherman BM. Variability in the quantitation of circulating growth hormone using commercial immunoassays. **J Clin Endocrinol Metab** 1989; 68:469-76.
8. Jansson C, Boguszewski C, Rosberg S, Carlsson L, Albertsson-Wikland K. Growth hormone (GH) assays: influence of standard preparations, GH isoforms, assay characteristics, and GH-binding protein. **Clin Chem** 1997; 43:950-6.

9. Giustina A, Barkan A, Casanueva FF, Cavagnini F, Frohman L, Ho K, et al. Criteria for cure of acromegaly: a consensus statement. **J Clin Endocrinol Metab** 2000; 85:526-9.
10. Barkan AL. Biochemical markers of acromegaly: GH vs. IGF-I. **Growth Horm IGF Res** 2004; 14 Suppl A:S97-100.
11. Chapman IM, Hartman ML, Straume M, Johnson ML, Veldhuis JD, Thorner MO. Enhanced sensitivity growth hormone (GH) chemiluminescence assay reveals lower postglucose nadir GH concentrations in men than women. **J Clin Endocrinol Metab** 1994; 78:1312-9.
12. Costa AC, Rossi A, Martinelli CE, Jr., Machado HR, Moreira AC. Assessment of disease activity in treated acromegalic patients using a sensitive GH assay: should we achieve strict normal GH levels for a biochemical cure? **J Clin Endocrinol Metab** 2002; 87:3142-7.
13. De P, Rees DA, Davies N, John R, Neal J, Mills RG, et al. Transsphenoidal surgery for acromegaly in wales: results based on stringent criteria of remission. **J Clin Endocrinol Metab** 2003; 88:3567-72.
14. Dimaraki EV, Jaffe CA, DeMott-Friberg R, Chandler WF, Barkan AL. Acromegaly with apparently normal GH secretion: implications for diagnosis and follow-up. **J Clin Endocrinol Metab** 2002; 87:3537-42.
15. Feelders RA, Bidlingmaier M, Strasburger CJ, Janssen JA, Uitterlinden P, Hofland LJ, et al. Postoperative evaluation of patients with acromegaly: clinical significance and timing of oral glucose tolerance testing and measurement of (free) insulin-like growth factor I, acid-labile

- subunit and growth hormone binding protein levels. **J Clin Endocrinol Metab 2005**;
16. Freda PU. Current concepts in the biochemical assessment of the patient with acromegaly. **Growth Horm IGF Res 2003**; 13:171-84.
  17. Freda PU, Post KD, Powell JS, Wardlaw SL. Evaluation of disease status with sensitive measures of growth hormone secretion in 60 postoperative patients with acromegaly. **J Clin Endocrinol Metab 1998**; 83:3808-16.
  18. Serri O, Beauregard C, Hardy J. Long-term biochemical status and disease-related morbidity in 53 postoperative patients with acromegaly. **J Clin Endocrinol Metab 2004**; 89:658-61.
  19. Wieringa GE, Barth JH, Trainer PJ. Growth hormone assay standardization: a biased view? **Clin Endocrinol (Oxf) 2004**; 60:538-9.
  20. Biermasz NR, Dekker FW, Pereira AM, van Thiel SW, Schutte PJ, van Dulken H, et al. Determinants of survival in treated acromegaly in a single center: predictive value of serial insulin-like growth factor I measurements. **J Clin Endocrinol Metab 2004**; 89:2789-96.
  21. Holdaway IM, Rajasoorya RC, Gamble GD. Factors influencing mortality in acromegaly. **J Clin Endocrinol Metab 2004**; 89:667-74.
  22. Jenkins D, O'Brien I, Johnson A, Shakespear R, Sheppard MC, Stewart PM. The Birmingham pituitary database: auditing the outcome of the treatment of acromegaly. **Clin Endocrinol (Oxf) 1995**; 43:517-22.
  23. Kaltsas GA, Isidori AM, Florakis D, Trainer PJ, Camacho-Hubner C, Afshar F, et al. Predictors of the outcome of surgical treatment in acromegaly and the value of the mean growth hormone day curve in

assessing postoperative disease activity. **J Clin Endocrinol Metab** **2001**; 86:1645-52.

**Ensaio para medida do hormônio do crescimento (GH) na acromegalia:  
aspectos metodológicos e suas aplicações**

Growth hormone (GH) assays in acromegaly: molecular and methodologic aspects and its applications

Título abreviado: Ensaio para medida do GH na acromegalia

Casagrande A, Czepielewski MA

Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia

Faculdade de Medicina, UFRGS, Porto Alegre, RS.

Endereço para correspondência:

Alessandra Casagrande

Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, Prédio 12, 4º andar

Porto Alegre, RS

CEP 90035003

Telefone: (51)33165600

e-mail: [alessandracasagrande@uol.com.br](mailto:alessandracasagrande@uol.com.br)

## Resumo

A dosagem do GH no soro é essencial para confirmar ou excluir o seu excesso. Na acromegalia, a ausência de critérios clínicos suficientemente sensíveis para monitorizar o sucesso do tratamento faz com que o GH sérico seja o procedimento de escolha e, para isso, é essencial que a sua dosagem seja realizada de forma confiável, capaz de permitir interpretações uniformes.

Vários critérios hormonais têm sido propostos para caracterizar remissão da acromegalia, incluindo níveis séricos de GH randômico inferior a 2,5 µg/l, nadir de GH durante o teste de tolerância oral a glicose inferior a 1,0 µg/l e IGF-I normal para sexo e idade. A importância do tratamento adequado consiste na possibilidade de reverter a mortalidade prematura da acromegalia através da diminuição dos níveis de GH para valores menores que 2,5 µg/l. Com o surgimento de ensaios ultra-sensíveis para medida do GH, tornaram-se necessários critérios mais estritos para determinar cura ou remissão da doença. Nesta revisão, descreveremos aqui as modificações decorrentes da evolução dos ensaios, as conseqüências nos resultados de GH e os pontos de corte propostos na literatura para caracterização da atividade e remissão da acromegalia.

Descritores: hormônio de crescimento, diagnóstico, acromegalia, imunoenaios

## Abstract

Growth hormone quantification in serum is essential for confirming or ruling out its excess. The absence of clinical criteria sufficiently sensitive to evaluate the treatment success enables GH as the key diagnostic procedure and for that, its measurements must be done in a reliable way and must allow uniform interpretation. Several different biochemical criteria for remission have been suggested in the past, including a random GH measurement less than 2,5 µg/l, mean GH value from a day curve less than 2,5 µg/l, nadir GH value after an oral glucose tolerance test (OGGT) less than 1,0 µg/l and a normal age-related IGF-I level. The importance of adequate treatment is highlighted by data indicating that lowering GH levels to less than 2,5 µg/l reverses the premature mortality of acromegaly. With the advances of ultrasensitive assays for GH measurement, stringest remission criteria to determine remission or cure were necessary. In this review, we describe the changes of assay methodology and its consequences in serum GH results and cut off point values to define activity and remission of acromegaly.

Keywords: growth hormone, diagnosis, acromegaly, immunoassays

## **Introdução**

Na acromegalia, a suspeita clínica da doença geralmente é o primeiro passo para se estabelecer o diagnóstico. A evolução dos ensaios hormonais para medida do GH sérico tem permitido detectar a doença mesmo em estados iniciais. Os métodos clássicos têm sido a avaliação do grau de supressão do GH após administração oral de glicose (TTOG) juntamente com os níveis séricos de IGF-I. Entretanto, após mais de 30 anos da introdução dos imunoenaios para GH, as discrepâncias existentes nos resultados, quando a mesma amostra é dosada por ensaios distintos, podem chegar a diferir em até três vezes.

Neste artigo, salientamos as principais modificações nos ensaios e nos critérios para diagnóstico e acompanhamento da acromegalia, aspectos moleculares e fisiológicos que interferem nesses ensaios, atentando para as diferenças relevantes entre eles.

## **Hormônio do crescimento**

O hormônio de crescimento (GH) é um hormônio polipeptídico, codificado por um único gene localizado no braço longo do cromossoma 17, em um cluster de 5 genes, composto por GH-N (*growth hormone-normal gene*), CS-L (*chorionic somatomammotropin-like gene*), CS-A (*chorionic somatomammotropin-A gene*), GH-V (*growth hormone-variant gene*) e CS-B (*chorionic somatomammotropin-B gene*). A produção hipofisária de GH advém da expressão exclusiva do gene hGH-N, o qual origina uma proteína de peso molecular de 22 kDa, constituída por 191 aminoácidos e representa cerca de 90% do GH hipofisário. Aproximadamente 10% do GH presente na hipófise

corresponde à variante molecular de 20 kDa, a qual é resultado da perda de alguns resíduos de aminoácidos (*splicing*) presentes na forma 22 kDa. Outras formas moleculares também são encontradas na hipófise, embora em menor proporção (1-5) (Tabela 1).

Na circulação, a forma mais abundante e ativa é a de peso molecular de 22 kDa. Cerca de 60%, após secretada pela hipófise, liga-se rapidamente a GHBP-1 (*growth hormone binding protein*), proteína de ligação com a qual apresenta alta afinidade (6-8) (Tabela 2).

A segunda mais abundante forma molecular circulante é a 20 kDa. Esta apresenta maior afinidade com a GHBP-2 e, pelo fato de apresentar uma grande capacidade de agregação, formando dímeros ou oligômeros, sua eliminação é mais lenta que a forma 22 kDa, podendo muitas vezes se tornar a principal forma molecular circulante, invertendo a relação 22:20 kDa de 2:1(5).

A GHBP-1 apresenta capacidade limitada de ligar-se ao GH. Cada molécula de GHBP-1 transporta somente uma molécula de GH e, à medida em que fica saturada, a produção de GH diminui. No caso da GHBP-2, sua capacidade de ligação com o GH é ilimitada, não ficando saturada com altas concentrações de GH.

### **Regulação hormonal**

O GH se liga ao seu receptor e induz sinal intracelular através de uma cascata de mecanismos, que envolvem a fosforilação de vários fatores de transcrição. O seu receptor consiste de um domínio extracelular, um transmembrana e outro citoplasmático. O GH liga-se ao componente extracelular através de dois sítios. Primeiramente, há a ligação com o sítio 1,

formando um composto inativo e, posteriormente, ao 2, que é a forma ativa. Somente com a interação nos dois sítios é possível ocorrer a transmissão do sinal. (6)

O fígado apresenta a maior concentração de receptores de GH. O GH, por sua vez, é o maior regulador da expressão do gene do IGF-I (*insulin growth factor I*). Este, juntamente com GHRH (*GH-releasing hormone*), ghrelina, somatostatina, hormônio tireoidiano, glicocorticóide e insulina controlam a síntese e secreção do GH.

Em cultura de células, o IGF-I inibe a expressão do ARNm e, conseqüentemente, a secreção do GH. O GHRH estimula a liberação de GH através do aumento na produção de AMPc. O papel do hormônio tireoidiano na síntese de GH permanece obscuro; no entanto, a secreção de GH sob testes de estímulo é reduzida em pacientes com hipotireoidismo, enquanto que os níveis basais não sofrem alterações.

O glicocorticóide apresenta um sítio de ligação localizado no primeiro íntron do gene do GH. A insulina suprime a secreção do GH e também diminui a expressão do gene, da mesma forma que a somatostatina. Já a ghrelina estimula a secreção do GH por uma via diferente do GHRH.

A leptina, por apresentar receptores hipotalâmicos, pode agir como um hormônio sinalizador metabólico na regulação da secreção do GH.

### **Fatores fisiológicos na secreção do GH**

A secreção de GH é pulsátil, ocorrendo liberação de picos de GH alternados com valores basais considerados previamente como indetectáveis quando medidos por radioimunoensaio (RIE). A maioria dos pulsos de GH

ocorre logo após o início do sono, na fase de ondas lentas cerebrais, o que corresponde a 60-70% de sua secreção diária.

O exercício aumenta a liberação de GH provavelmente através de mecanismos envolvendo estímulos colinérgicos.

Trauma, estresse físico, choque hipovolêmico e sepse estimulam a secreção de GH, embora doenças debilitantes como câncer não estejam associadas a aumento dos níveis de GH. Privação emocional e depressão estão associadas com supressão da secreção do GH e respostas subnormais em testes de estímulo. Acredita-se que um aumento na liberação de GHRH, mediado por fatores adrenérgicos, estaria envolvido nessas situações.

Desnutrição e jejum prolongado estão associados com níveis elevados de GH, enquanto que a obesidade diminui sua secreção basal e pós estímulo.

Hipoglicemia insulínica estimula a liberação de GH cerca de 30 a 45 minutos após a queda da glicemia. Já a hiperglicemia aguda, inibe a secreção do GH. Entretanto, pacientes diabéticos com hiperglicemia crônica não suprimem os níveis de GH.

Dieta rica em proteínas e a administração de aminoácidos por via intravenosa estimulam a liberação de GH através da supressão da somatostatina. A diminuição de ácidos graxos livres séricos causa aumento agudo nos níveis de GH, enquanto que o aumento inibe os efeitos de vários fatores estimulantes do GH (sono, exercício, GHRH).

## **Ensaio**

A dosagem do GH sérico foi possível a partir de 1960, com a introdução do RIE (7, 9, 10), que consiste na adição de uma quantidade constante de

hormônio marcado e uma quantidade também constante de anticorpo anti-hormônio ao soro do paciente. O hormônio presente na amostra de soro do paciente compete com o hormônio marcado por um número limitado de sítios de ligação. Após um período de incubação, o hormônio ligado ao anticorpo é separado do não ligado. A quantidade de hormônio marcado ligado é então determinada.

Mediante a dificuldade de se mensurar níveis de GH em indivíduos normais, buscou-se continuamente o aperfeiçoamento de técnicas diagnósticas que permitissem demonstrar o real valor fisiológico e patológico do GH. Também se tentou chegar a um método rápido, fácil, que apresentasse boa acurácia.

Baseado nos próprios moldes do RIE, desenvolveram-se ensaios chamados não competitivos, como, por exemplo, os ensaios enzimáticos, quimioluminescentes e fluorométricos (11). Estes ensaios utilizam um anticorpo marcado para geração do sinal e um segundo anticorpo para captura. O primeiro anticorpo é ligado a fase sólida e ao soro do paciente. O segundo anticorpo, ao qual é ligada a molécula geradora de sinal, é adicionado em excesso e então se liga rapidamente ao complexo formado pelo primeiro anticorpo com o soro a ser dosado (sanduíche). O resultado desta medida é diretamente proporcional à concentração de hormônio na amostra. Apesar de o princípio ser muito parecido entre os imunoensaios, existem diferenças importantes e extremamente significativas no que diz respeito ao resultado obtido. Essas diferenças recaem principalmente nos tipos de anticorpos e padrões utilizados (12).

## **Anticorpos**

No RIE, praticamente todos os anticorpos empregados para detecção da quantidade de hormônio na amostra são policlonais, ou seja, anticorpos que reconhecem vários epítopos diferentes em uma mesma molécula ou em moléculas distintas. Através deste ensaio, várias formas moleculares de GH poderiam ser reconhecidas e medidas.

Nos ensaios mais recentes, a maioria utiliza anticorpos monoclonais combinados com policlonais ou simplesmente dois anticorpos monoclonais, onde a ligação deste à molécula de GH se dá através do reconhecimento de uma porção muito específica, possibilitando a dosagem de um tipo molecular único, na maioria das vezes restritos às formas 20 e 22 kDa (13).

Nos imunoenaios, são empregados diferentes anticorpos que se ligam a um diferente espectro de isoformas de GH. Como a distribuição dessas isoformas varia entre um indivíduo e outro, os resultados dependerão do anticorpo utilizado no ensaio (5-7, 9, 12, 14-20).

## **Calibradores**

Os calibradores são utilizados para gerar a curva padrão com a qual as amostras são comparadas. Inicialmente eram derivados de extratos de hipófises humanas e atualmente a orientação é de que os ensaios comerciais utilizem padrões advindos de GH recombinante, 22 kDa específico. Entretanto, observa-se na prática, grande variabilidade de padrões, o que invariavelmente compromete o resultado obtido e contribui para as divergências encontradas quando são comparados diferentes ensaios, ainda que o anticorpo tenha a mesma especificidade.

Em 1955, foi estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization-WHO*) o primeiro padrão internacional (*International Standard-IS*) de GH bovino para bioensaio. Através dos anos, várias modificações foram surgindo, de modo que o primeiro padrão estabelecido para ser utilizado em imunoensaios surgiu em 1982, derivado de hipófise (GH IS 66/217). Esse padrão foi substituído em 1990 por um segundo também derivado de hipófise (GH IS 80/505) e, posteriormente, em 1994, surgiu o GH IS derivado de GH recombinante (88/624), com conteúdo e especificidade definidos (1 mg = 3 U), considerado o primeiro IS para somatotropina (10). Numa tentativa de padronizar a utilização de calibradores, sugeriu-se que estes deveriam ser produzidos de acordo com o padrão 88/624, único em que a real quantidade de GH foi determinada; por isso, os resultados obtidos deveriam ser expressos em unidade de massa, ao invés de unidades de bioatividade (10).

O uso de fatores de conversão, de uma preparação de GH para outra, ou de  $\mu\text{g/l}$  para  $\text{mUI/l}$ , é uma potencial fonte de erro. A transição de 66/217 para 80/505 acompanhou-se de um aumento de 15% nos resultados de GH; entretanto, não houve nenhum ajuste nos testes diagnósticos naquela época (6, 10).

A calibração de ensaios ultra-sensíveis, que utilizam anticorpos monoclonais, com calibradores biosintéticos representa outra possibilidade de erro, porque o GH da amostra e o GH do calibrador não reagem identicamente com o anticorpo.

As divergências encontradas nos resultados de diferentes ensaios demonstram que métodos específicos para a forma 22 kDa tendem a fornecer resultados menores do que os ensaios que detectam também a forma 20 kDa,

apesar dessa diferença não representar, necessariamente, apenas a presença de mais uma forma molecular, no caso a 20 kDa. Diferenças na especificidade dos métodos em detectar também as formas monoméricas e diméricas do GH têm sido implicadas como possíveis causas para a desigualdade existente nos resultados dos níveis de GH entre os ensaios (16, 20).

Embora não existam dados na literatura que comprovem a superioridade da medida de uma forma molecular a outra, desde o surgimento do GH recombinante passou-se a adotar com maior frequência ensaios sensíveis e específicos, capazes de identificar níveis de GH anteriormente considerados indetectáveis pelos RIEs convencionais.

### **Crítérios de cura**

As modificações metodológicas dos ensaios obrigaram a reavaliação de critérios diagnósticos e terapêuticos no que se refere aos distúrbios relacionados com a secreção de GH (6, 12, 13, 15, 16, 19-25).

Tradicionalmente, com o uso de RIE policlonal, a acromegalia era considerada improvável quando o GH basal era inferior a 5 µg/l. Com o advento de ensaios mais sensíveis e específicos, valores tão baixos quanto 1 µg/l ou menos podem ser encontrados em pacientes com acromegalia em atividade, sobrepondo-se aos valores encontrados em indivíduos normais. Dessa forma, torna-se impossível adotar o GH basal como critério de cura ou diagnóstico de acromegalia.

O teste de tolerância oral a glicose (TTOG) tem sido considerado como teste clássico para diagnóstico e avaliação da atividade da acromegalia (Tabela 3). A elevação aguda da glicose suprime a secreção hipofisária de GH em

indivíduos normais, mas, em pacientes com acromegalia, os níveis de GH não diminuem e, em algumas situações, de forma paradoxal, até aumentam. Durante o teste, o sangue é coletado nos tempos basal, 30, 60, 90 e 120 minutos após a ingestão de 75 gramas de glicose. O menor valor de GH atingido durante o teste (nadir) é então comparado a um valor específico e, se acima desse, o diagnóstico de acromegalia é confirmado (22).

O valor do ponto de corte utilizado para interpretar os níveis de nadir de GH tem sofrido várias modificações com o aumento da sensibilidade dos ensaios. Empregando RIE policlonal, o valor de nadir de GH inferior a 2,0 µg/l era considerado normal. Com os novos ensaios, a supressão do GH em indivíduos normais demonstrou ser inferior a 1 µg/l. Em 2000, o Consenso sobre diagnóstico e critérios de remissão da acromegalia, orientou que, em ensaios imunorradiométricos, com anticorpos monoclonais, o nadir de GH > 1 µg/l, juntamente com IGF-I elevado ou, a média da medida do GH durante as 24 horas superior a 2,5 µg/l, seria determinante de doença não controlada. Freda e col, (16) utilizando ensaio imunorradiométrico monoclonal 22 kDa específico, encontraram valores tão baixos quanto 0,14 µg/l em indivíduos normais e inferior a 0,33 µg/l em mais de 50% dos pacientes acromegálicos, distinção essa impossível de ser realizada utilizando ensaio RIE policlonal. Dessa forma, a validade dos critérios de diagnóstico e avaliação da acromegalia torna-se incorreta quando se utiliza um ensaio e extrapolam-se resultados para outro.

Dados epidemiológicos derivados basicamente de RIEs policlonais demonstram que a taxa de mortalidade na acromegalia é normalizada quando o valor médio do GH está abaixo de 2,5 µg/l (24, 26). No entanto, utilizar esse

dado epidemiológico como guia para o tratamento atual é problemático porque, para qualquer amostra de GH a ser dosada pelos imunoensaios mais sensíveis, os valores de GH serão significativamente menores aos determinados por RIE policlonal. Embora vários valores tenham sido propostos como mais adequados para cada ensaio, não existem dados epidemiológicos até o momento que corroborem estes valores (Tabela 3).

De acordo com o consenso que definiu os critérios de cura da acromegalia, em 2000 (22), a avaliação pós-operatória dos pacientes deve combinar a medida do GH através de teste com supressão pela glicose, juntamente com a dosagem do nível sérico basal de IGF-I (Tabela 4).

### ***Insulin Growth Factor I (IGF-I)***

Com o advento de ensaios confiáveis de IGF-I, este está fazendo parte da avaliação nos distúrbios relacionados ao GH (15, 21, 22, 24, 27-34), está elevado em pacientes com acromegalia em atividade e normaliza após tratamento adequado. As vantagens da medida do IGF-I, em comparação a medida do GH, consistem na facilidade de dosagem, pois é necessária somente uma coleta e no fato de que, por ter meia vida longa, representa mais adequadamente os níveis de GH do que uma única medida aleatória de GH.

No entanto, em alguns casos, pode existir anormalidade na secreção do GH, apesar de valores normais de IGF-I. Anormalidades no padrão de secreção do GH podem persistir após a cirurgia, sugerindo alteração neuroregulatória do GH. Estudos propõem que GH nadir “anormal” poderia ser um sinal de atividade da doença em alguns pacientes (27, 28, 35, 36).

O padrão oposto de divergência entre GH e IGF-I também tem sido reportado. O IGF-I pode estar elevado com níveis “normais” de GH. Valores altos de GH, de forma não pulsátil, são preditores positivos dos níveis de IGF-I, enquanto níveis de GH durante os picos são preditores negativos. Apesar de valores médios de GH similares, pacientes com acromegalia e concentrações basais durante o dia elevadas, sem pico, produzirão mais GH do que aqueles que têm secreção pulsátil normal, o que explicaria os níveis de IGF-I elevados, apesar de valores médios de GH normais.

Poderíamos inferir que a combinação da medida do GH e do IGF-I basais nos dariam duas informações diferentes. O GH informaria a neuroregulação de sua secreção e o IGF-I, o efeito da interação do GH com seu receptor.

A indicação de tratamento adicional em pacientes acromegálicos (cirurgia, radioterapia, tratamento clínico medicamentoso) recai sobre os níveis de GH e IGF-I após a intervenção primária. O desenvolvimento da terapia que antagoniza o receptor do GH, o qual impede a sua ação e normaliza os níveis séricos de IGF-I, mantendo elevados os níveis de GH, requer a reavaliação da relação GH/IGF-I, pois, nessa situação, os valores de GH não servem para guiar a terapia e, até o momento, não existem dados concretos que determinem quais níveis de IGF-I constituem alvos terapêuticos apropriados.

Estima-se que valores discordantes de GH e IGF-I podem ser vistos em até 30% dos pacientes acromegálicos durante o seu tratamento. No entanto, desconhece-se o impacto dessa discordância na morbidade e mortalidade dos pacientes.

A partir do aumento da sensibilidade dos imunoenaios, a definição de cura da acromegalia correlaciona-se com valores cada vez mais baixos de GH. Paralelamente, existe grande variação nas concentrações de IGF-I para todas as idades. Tem sido demonstrada grande sobreposição entre os níveis de IGF-I entre pacientes com deficiência severa de GH e indivíduos normais (24). Além disso, a relação do GH com o IGF-I, em indivíduos normais, é influenciada pelo sexo, e pode ser explicada em parte pela diferença de secreção do GH. Em mulheres, para se ter valores de IGF-I semelhante ao dos homens, a secreção de GH deve ser pelo menos três vezes maior.

Apesar de o IGF-I ser o hormônio responsável pela maior parte dos efeitos biológicos do GH, poucos estudos relacionavam mortalidade e IGF-I. Com o surgimento de ensaios acurados, já existem estudos demonstrando a normalização da mortalidade com a redução dos níveis de IGF-I (26, 28, 30). Trainer e col. (24), ao estudarem indivíduos adultos com deficiência de GH, tentaram identificar valores de IGF-I que poderiam determinar risco de deficiência funcional de GH durante o tratamento. A conclusão do estudo foi que o objetivo atual no tratamento da acromegalia de reduzir os níveis de IGF-I para valores dentro da faixa normal para sexo e idade pode pôr uma proporção de pacientes em risco para desenvolver deficiência funcional de GH. Essa possibilidade deve ser levada em consideração, já que hipopituitarismo com deficiência de GH também tem suas conseqüências na morbi-mortalidade dos pacientes.

Cabe ainda salientar que, apesar da melhora na precisão dos ensaios utilizados para medida do IGF-I, a falta de valores normativos padronizados para sexo e idade permanece sendo a maior limitação de sua aplicação clínica.

### **Considerações finais**

Os aspectos mais importantes que devem ser considerados na tentativa de padronização dos métodos para dosagem sérica do GH são os calibradores e a especificidade do ensaio. A utilização de um mesmo calibrador em todos os *kits* comerciais deverá reduzir as diferenças encontradas entre os métodos. No entanto, é importante atentar para o fato de que o uso de um único peptídeo, tal como a forma 22 kDa do GH, não reflete a heterogeneidade de formas moleculares existentes no soro. Da mesma forma, dependendo da especificidade do anticorpo empregado no ensaio, esse irá reagir com diferentes formas moleculares de GH. Porém, não há até o momento nenhum dado que comprove a superioridade de ensaios menos ou mais específicos na discriminação da atividade da acromegalia.

A utilização de ensaios diferentes para dosagem do GH constitui um problema comum em estudos que relacionam morbi-mortalidade aos níveis séricos de GH. A análise dos dados inclui valores de GH obtidos durante vários anos, e, por isso, medido por metodologias distintas. Acreditamos que, o primeiro passo para a melhor interpretação dos valores de GH, seria a determinação por cada laboratório de valores de ponto de corte para cada método em particular, o que possibilitaria uma análise retrospectiva mais acurada.

### Referências bibliográficas

1. Baumann G, Winter RJ, Shaw M. Circulating molecular variants of growth hormone in childhood. **Pediatr Res** 1987; 22:21-2.
2. Kopchick JJ, Andry JM. Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. **Mol Genet Metab** 2000; 71:293-314.
3. Baumann G. Growth hormone heterogeneity in human pituitary and plasma. **Horm Res** 1999; 51 Suppl 1:2-6.
4. Baumann G. Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants, and binding proteins. **Endocr Rev** 1991; 12:424-49.
5. Wood P. Growth hormone: its measurement and the need for assay harmonization. **Ann Clin Biochem** 2001; 38:471-82.
6. Seth J, Ellis A, Al-Sadie R. Serum growth hormone measurements in clinical practice: An audit of performance from the UK National External Quality Assessment scheme. **Horm Res** 1999; 51 Suppl 1:13-9.
7. Jansson C, Boguszewski C, Rosberg S, Carlsson L, Albertsson-Wikland K. Growth hormone (GH) assays: influence of standard preparations, GH isoforms, assay characteristics, and GH-binding protein. **Clin Chem** 1997; 43:950-6.
8. Baumann G, Amburn K, Shaw MA. The circulating growth hormone (GH)-binding protein complex: a major constituent of plasma GH in man. **Endocrinology** 1988; 122:976-84.
9. Wieringa GE, Barth JH, Trainer PJ. Growth hormone assay standardization: a biased view? **Clin Endocrinol (Oxf)** 2004; 60:538-9.
10. Bristow AF. International standards for growth hormone. **Horm Res** 1999; 51 Suppl 1:7-12.

11. Boguszewski CL. Molecular heterogeneity of human GH: from basic research to clinical implications. **J Endocrinol Invest** 2003; 26:274-88.
12. Celniker AC, Chen AB, Wert RM, Jr., Sherman BM. Variability in the quantitation of circulating growth hormone using commercial immunoassays. **J Clin Endocrinol Metab** 1989; 68:469-76.
13. Costa AC, Rossi A, Martinelli CE, Jr., Machado HR, Moreira AC. Assessment of disease activity in treated acromegalic patients using a sensitive GH assay: should we achieve strict normal GH levels for a biochemical cure? **J Clin Endocrinol Metab** 2002; 87:3142-7.
14. Stoffel-Wagner B, Springer W, Bidlingmaier F, Klingmuller D. A comparison of different methods for diagnosing acromegaly. **Clin Endocrinol (Oxf)** 1997; 46:531-7.
15. Freda PU. Current concepts in the biochemical assessment of the patient with acromegaly. **Growth Horm IGF Res** 2003; 13:171-84.
16. Freda PU, Post KD, Powell JS, Wardlaw SL. Evaluation of disease status with sensitive measures of growth hormone secretion in 60 postoperative patients with acromegaly. **J Clin Endocrinol Metab** 1998; 83:3808-16.
17. Lindholm J, Giwercman B, Giwercman A, Astrup J, Bjerre P, Skakkebaek NE. Investigation of the criteria for assessing the outcome of treatment in acromegaly. **Clin Endocrinol (Oxf)** 1987; 27:553-62.
18. Freda PU. Pitfalls in the biochemical assessment of acromegaly. **Pituitary** 2003; 6:135-40.
19. Blethen SL, Chasalow FI. Use of a two-site immunoradiometric assay for growth hormone (GH) in identifying children with GH-dependent growth failure. **J Clin Endocrinol Metab** 1983; 57:1031-5.

20. Reiter EO, Morris AH, MacGillivray MH, Weber D. Variable estimates of serum growth hormone concentrations by different radioassay systems. **J Clin Endocrinol Metab** 1988; 66:68-71.
21. Barkan AL. Biochemical markers of acromegaly: GH vs. IGF-I. **Growth Horm IGF Res** 2004; 14 Suppl A:S97-100.
22. Giustina A, Barkan A, Casanueva FF, Cavagnini F, Frohman L, Ho K, et al. Criteria for cure of acromegaly: a consensus statement. **J Clin Endocrinol Metab** 2000; 85:526-9.
23. Chapman IM, Hartman ML, Straume M, Johnson ML, Veldhuis JD, Thorner MO. Enhanced sensitivity growth hormone (GH) chemiluminescence assay reveals lower postglucose nadir GH concentrations in men than women. **J Clin Endocrinol Metab** 1994; 78:1312-9.
24. Mukherjee A, Monson JP, Jonsson PJ, Trainer PJ, Shalet SM. Seeking the optimal target range for insulin-like growth factor I during the treatment of adult growth hormone disorders. **J Clin Endocrinol Metab** 2003; 88:5865-70.
25. De P, Rees DA, Davies N, John R, Neal J, Mills RG, et al. Transsphenoidal surgery for acromegaly in wales: results based on stringent criteria of remission. **J Clin Endocrinol Metab** 2003; 88:3567-72.
26. Serri O, Beauregard C, Hardy J. Long-term biochemical status and disease-related morbidity in 53 postoperative patients with acromegaly. **J Clin Endocrinol Metab** 2004; 89:658-61.

27. Daughaday WH, Starkey RH, Saltman S, Gavin JR, 3rd, Mills-Dunlap B, Heath-Monnig E. Characterization of serum growth hormone (GH) and insulin-like growth factor I in active acromegaly with minimal elevation of serum GH. **J Clin Endocrinol Metab** 1987; 65:617-23.
28. Biermasz NR, Dekker FW, Pereira AM, van Thiel SW, Schutte PJ, van Dulken H, et al. Determinants of survival in treated acromegaly in a single center: predictive value of serial insulin-like growth factor I measurements. **J Clin Endocrinol Metab** 2004; 89:2789-96.
29. Clemmons DR, Van Wyk JJ, Ridgway EC, Kliman B, Kjellberg RN, Underwood LE. Evaluation of acromegaly by radioimmunoassay of somatomedin-C. **N Engl J Med** 1979; 301:1138-42.
30. Holdaway IM, Rajasoorya RC, Gamble GD. Factors influencing mortality in acromegaly. **J Clin Endocrinol Metab** 2004; 89:667-74.
31. Barkan AL, Beitins IZ, Kelch RP. Plasma insulin-like growth factor-I/somatomedin-C in acromegaly: correlation with the degree of growth hormone hypersecretion. **J Clin Endocrinol Metab** 1988; 67:69-73.
32. Feelders RA, Bidlingmaier M, Strasburger CJ, Janssen JA, Uitterlinden P, Hofland LJ, et al. Postoperative evaluation of patients with acromegaly: clinical significance and timing of oral glucose tolerance testing and measurement of (free) insulin-like growth factor I, acid-labile subunit and growth hormone binding protein levels. **J Clin Endocrinol Metab** 2005;
33. Oppizzi G, Petroncini MM, Dallabonzana D, Cozzi R, Verde G, Chiodini PG, et al. Relationship between somatomedin-C and growth hormone

- levels in acromegaly: basal and dynamic evaluation. **J Clin Endocrinol Metab** 1986; 63:1348-53.
34. Dobrashian RD, O'Halloran DJ, Hunt A, Beardwell CG, Shalet SM. Relationships between insulin-like growth factor-1 levels and growth hormone concentrations during diurnal profiles and following oral glucose in acromegaly. **Clin Endocrinol (Oxf)** 1993; 38:589-93.
35. Dimaraki EV, Jaffe CA, DeMott-Friberg R, Chandler WF, Barkan AL. Acromegaly with apparently normal GH secretion: implications for diagnosis and follow-up. **J Clin Endocrinol Metab** 2002; 87:3537-42.
36. Freda PU, Nuruzzaman AT, Reyes CM, Sundeen RE, Post KD. Significance of "abnormal" nadir growth hormone levels after oral glucose in postoperative patients with acromegaly in remission with normal insulin-like growth factor-I levels. **J Clin Endocrinol Metab** 2004; 89:495-500.

Tabela 1. Formas moleculares de GH encontradas na hipófise (adaptado de Baumann,G) (3)

	%
Formas monoméricas	
22 kDa GH	70-75
20 kDa GH	5-10
Desamino-GH (Asp 152 22 kDa)	3
Desamino-GH (Glu 137 22 kDa)	5
22 kDa GH N $\alpha$ acilado	5
GH 1 43	1
GH 44 191	0,2-1
Formas oligoméricas dos monômeros acima	
Oligômeros maiores	5
Oligômeros dissulfídicos	7
Oligômeros com ligação covalente desconhecida	2

Tabela 2. Proporções estimadas de formas imunoreativas de GH no plasma após 15 minutos de secretadas pela hipófise (adaptado de Baumann,G) (3)

	%
<b>GH monomérico</b>	
<b>22 kDa GH</b>	
Livre	21
Ligado (complexo de alta afinidade)	20
Ligado (complexo de baixa afinidade)	2
<b>20 kDa GH</b>	
Livre	5,5
Ligado (complexo de alta afinidade)	0,5
Ligado (complexo de baixa afinidade)	2
GH desamido e acil	5
<b>Dímeros</b>	
22 kDa não covalentes	14
22 kDa dissulfídicos	6
20 kDa não covalentes	5
20 kDa dissulfídicos	0,5
<b>Oligômeros maiores (tri, tetra e pentaméricos)</b>	
22 kDa não covalentes	7
22 kDa dissulfídicos	3
20 kDa não covalentes	1
20 kDa dissulfídicos	0,5
Oligômeros covalentes não dissulfídicos (12 kDa, 16 kDa, 30 kDa)	variável

Tabela 3. Critérios de cura da acromegalia (adaptado de De, P) (25)

Estudo, Ano	Ensaio	Critério de cura (GH µg/l)
Wilson e Dempsen,1978	?	GH < 10,0
Roelfsema,1985	RIE	GH < 2,5; estímulo TRH
Lindholm,1987	RIE	GHb < 5,0; IGF-1; TTOG < 1,0
Loss,1989	?	TTOG < 1,0; IGF-1
Fahlbush,1992	?	TTOG < 2,5
Osman,1994	?	TTOG < 1; GHb < 2,5
Jenkins,1995	RIE	GHb < 2,5
Sheaves,1996	IRMA	GH m < 2,5
Swearingen,1998	?	TTOG < 2,0; IGF-1
Freda,1998	IRMA	TTOG < 2,9; IGF-1
Giustina, 2000	IRMA	TTOG < 1,0; IGF-1
Laws, 2000	?	GH < 2,5; TTOG < 1,0; IGF-1
Kreutzer, 2001	QML	GH < 2,5; TTOG < 1,0; IGF-1
Kaltsas, 2001	?	GH m < 2,5; IGF-1
Costa, 2002	IFMA	TTOG < 0,25; IGF-1
De, 2003	RIE; QML	GH m < 2,5; IGF-1; TTOG < 1,0
Serri, 2004	IRMAm	TTOG < 0,25; IGF-1
Freda, 2004	IRMAm	TTOG < 0,14; IGF-1
Ayuk, 2004	RIE	TTOG < 2,0; IGF-1
Holdaway, 2004	RIE; IRMAm	TTOG < 1,0; IGF-1
Makelin, 2005	RIE;IRMA;ELISA;QML	GHb < 2,5; IGF-1

RIE, radioimunoensaio; IRMA, imunorradiométrico; IRMAm, imunorradiométrico monoclonal; QML, quimioluminescente; IFMA, imunofluorométrico; GHb, GH basal; GH m, GH médio; TTOG, teste de tolerância oral a glicose

Tabela 4. Diagnóstico e avaliação da acromegalia (adaptado de Giustina, A) (22)

AVALIAÇÃO	CRITÉRIO
DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	nadir de GH no TTOG > 1µg/l e IGF-1 elevado*
CONTROLADA	nadir de GH <1µg/l, IGF-1 normal. Ausência de atividade clínica da doença
INADEQUADAMENTE CONTROLADA	nadir de GH nadir >1 µg/l, IGF-1 elevado ausência de atividade clínica da doença
NÃO CONTROLADA	GH nadir >1 µg/l, IGF-1 elevado Presença de atividade clínica da doença

\* elevado para sexo e idade

ARTIGO ORIGINAL

**Avaliação da atividade da acromegalia através de ensaio quimioluminescente 20/22 kDa específico**

Casagrande A, Czepielewski MA

Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia

Faculdade de Medicina, UFRGS.

Endereço para correspondência:

Alessandra Casagrande

Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, Prédio 12, 4º andar

Porto Alegre, RS

CEP 90035003

Telefone: (51)33165600

e-mail: [alessandracasagrande@uol.com.br](mailto:alessandracasagrande@uol.com.br)

## Resumo

**Introdução:** Vários critérios têm sido sugeridos para avaliar a atividade da doença em pacientes acromegálicos. Em 2000, numa tentativa de consenso, foi proposto o ponto de corte de 1 µg/l de nadir de GH durante sobrecarga oral com glicose, abaixo do qual o paciente estaria curado ou em remissão. No entanto, tem-se demonstrado que, em ensaios mais sensíveis, este valor é elevado. O objetivo deste estudo é mensurar os níveis de GH em indivíduos normais e comparar com pacientes acromegálicos divididos de acordo com os níveis de IGF-1.

**Pacientes e métodos:** Estudamos 15 indivíduos normais (10 mulheres e 5 homens, média de idade de  $39,7 \pm 13,19$  anos) e 55 pacientes acromegálicos (32 mulheres e 23 homens, média de idade de  $53,2 \pm 11,73$  anos), divididos, os últimos, de acordo com os níveis de IGF-1 para sexo e idade da seguinte forma: grupo 1; pacientes com IGF-1 normal; grupo 2, pacientes com IGF-1 baixo; grupo 3 pacientes com IGF-1 alto. Para dosagem do GH empregamos ensaio quimioluminescente 20-22 kDa específico (*Immulite, 2000*). Todos os dados foram apresentados através de média e desvio-padrão. Os dados não paramétricos foram analisados através do teste de Kruskal-Wallis e, as correlações, através do coeficiente de Spearman.

**Resultados:** a média dos níveis de GH basal e nadir em indivíduos normais foi de  $0,64 \pm 0,8$  µg/l e  $0,09 \pm 0,13$  µg/l, respectivamente. Nos pacientes acromegálicos, os grupos 1 e 3 apresentaram níveis de GH mais elevados em relação aos indivíduos normais ( $p < 0,0001$ ), porém o grupo 2 apresentou valores de GH basal ( $p = 0,73$ ) e nadir ( $p = 0,14$ ) semelhantes aos normais.

Adotando como referência o limite superior de normalidade do nadir do GH encontrado na população de indivíduos normais, ou seja, 0,35 µg/l (média + 2 desvios-padrão), todos os pacientes acromegálicos com nadir de GH inferior a 0,35 µg/l, apresentaram IGF-1 normal ou baixo. Se considerássemos como critério de cura nadir de GH <1 µg/l, deixaríamos de diagnosticar um paciente com doença em atividade que apresentava nadir de GH de 0,45 µg/l e IGF-1 elevado. Dos pacientes do grupo 1 e 2, quatro apresentaram GH acima de 0,35 µg/l. O GH basal não foi diferente entre os grupos.

**Conclusão:** Utilizando ensaio quimioluminescente ultra-sensível, observamos que, em indivíduos normais, os níveis de nadir de GH não ultrapassam 0,35 µg/l. Todos os pacientes acromegálicos que apresentaram remissão da doença por esse critério também apresentaram IGF-1 normal ou até baixo para os padrões do ensaio. Devido à grande sobreposição de valores, o GH basal não nos forneceu informações adicionais em relação à atividade da acromegalia após tratamento. Se adotássemos, para esta população, o ponto de corte de 1 µg/l ou menos para nadir de GH, como sugerido pelo consenso, estaríamos sub-diagnosticando um paciente com a doença em atividade, o que evidencia a necessidade de padrões locais para a determinação dos critérios hormonais de cura ou remissão da acromegalia.

Descritores: acromegalia, ensaios, critérios de remissão

## Abstract

**Introduction:** Biochemical assessment of acromegaly activity is controversial. In 2000, an international consensus proposed a nadir growth hormone (GH) cut off value during an oral glucose tolerance test of less than 1  $\mu\text{g/l}$  to consider remission or cure of acromegaly. The present study was designed to measure serum GH levels in healthy subjects and to compare these values with those of acromegalic patients divided according to their IGF-1 serum levels.

**Subjects and methods:** Fifteen healthy subjects (10 women and 5 men, mean age  $39.7 \pm 13.19$  years old) and 55 acromegalic patients (32 women and 23 men, mean age  $53.2 \pm 11.73$  years old) were divided according to age and sex related IGF-1 levels as follow: Group 1, normal insulin-like growth factor (IGF)-1 levels; Group 2, low IGF-1 levels; Group 3, high IGF-1 levels. A chemiluminescent 20/22 kDa specific assay (*Immulite, 2000*) was used to measure serum GH concentrations. All results are expressed as mean  $\pm$  SD. Otherwise, non parametric data was analysed through Kruskal-Wallis test and Spearman coefficient correlation.

**Results:** The average basal and nadir GH levels in normal subjects were respectively  $0.64 \pm 0.8$   $\mu\text{g/l}$  and  $0.09 \pm 0.13$   $\mu\text{g/l}$ . Acromegalic subjects from Groups 1 and 3 had higher GH levels than normal subjects ( $p < 0.0001$ ). However, subjects from Group 2 had similar basal ( $p = 0.73$ ) and nadir ( $p = 0.14$ ) GH levels than healthy subjects. If one considers as reference the higher limit of normality of GH nadir found in the population of normal subjects, i.e.,  $0.35$   $\mu\text{g/l}$  (average plus 2 standard deviations), all acromegalic subjects with GH nadir lower than  $0.35$   $\mu\text{g/l}$  had IGF-1 normal or low. If one considers as a

criterion for cure a GH nadir  $<1 \mu\text{g/l}$ , a subject with active disease and with a GH nadir of  $0.45 \mu\text{g/l}$  and higher IGF-1 levels would go undiagnosed. Four subjects from Group 1 and 2 had a GH higher than  $0.35 \mu\text{g/l}$ . The basal GH did not differ among groups.

**Conclusion:** Using a high sensitive assay we found that in normal subjects the nadir GH levels were not higher than  $0.35 \mu\text{g/l}$ . All acromegalic subjects that presented remission of clinical disease by this criterion also presented normal or even lower IGF-1 levels, considering the standards of the assay. Due to great overlapping of values, the basal GH did not provide additional information regarding acromegalic activity after treatment. If, for this population, the nadir cut off value of  $1 \mu\text{g/l}$  or less was adopted, as is suggested by the consensus, a patient with the disease in activity would go undiagnosed. This indicates the need for local standards to determine the proper hormonal criteria to confirm cure or remission of acromegaly.

Keywords: acromegaly, assays, remission criteria

## Introdução

Os critérios diagnósticos para avaliação da atividade da doença em pacientes acromegálicos têm motivado diversos estudos (1-19). Há muitos anos tenta-se definir o melhor critério a ser utilizado no acompanhamento dos pacientes com acromegalia. Baseados em dados epidemiológicos, foram propostos diversos valores de GH (*growth hormone*) como alvo terapêutico, na tentativa de igualar os índices de mortalidade da doença aos da população em geral. Laws, em 1979 (20), sugeriu como “seguro” o valor de GH médio durante as 24 horas inferior a 5 µg/l, medido por RIE; Nabarro, em 1987 (21) utilizou o critério de GH basal <5 µg/l e nadir de GH após teste de tolerância oral a glicose (TTOG) <2 µg/l; Bates, em 1993 (22), sugeriu GH médio de 4 coletas durante o dia inferior a 2,5 µg/l, juntamente com IGF-1 basal adequado para sexo e idade. Essas diferenças deixam claro que não existia consenso de como e em que momento o GH deveria ser dosado e qual valor de GH estaria mais adequadamente relacionado com diminuição da mortalidade. Em 2000, Giustina e col. (23) definiram os critérios hormonais para o diagnóstico e tratamento de pacientes acromegálicos. Segundo esse consenso, valores de IGF-1 elevados para sexo e idade e GH maior que 1 µg/l após supressão com glicose confirmam o diagnóstico de acromegalia. Em contrapartida, a evidência de IGF-1 normal, quando ajustado para sexo e idade e nadir de GH após sobrecarga com glicose inferior a 1 µg/l, define cura ou remissão da doença. No entanto, o próprio consenso ressalva que, com a introdução de novos ensaios para a medida do GH mais sensíveis e específicos, esses critérios deveriam ser revistos. Freda e col., em 2004 (6), utilizando ensaio imunorradiométrico específico para a forma 22 kDa, empregando o calibrador

WHO 88/624, primeiro calibrador a utilizar GH recombinante, demonstrou que, em indivíduos saudáveis, os níveis de nadir de GH não ultrapassaram 0,14 µg/l. No mesmo estudo, ao considerar pacientes acromegálicos com IGF-1 normal, mais de 50% apresentou nadir de GH inferior a 1,0 µg/l. Durante o acompanhamento, esses pacientes apresentaram recorrência da doença com posterior elevação do IGF-1. Em nosso estudo, objetivamos caracterizar os valores de GH basal e nadir em indivíduos saudáveis, utilizando ensaio quimioluminescente, empregado de rotina em nosso hospital, comparar os valores encontrados com os observados em 55 pacientes acromegálicos em acompanhamento em nosso serviço e, definir níveis de GH que melhor conceituem cura ou remissão da acromegalia. Finalmente, correlacionar os níveis de GH e IGF-1 em pacientes acromegálicos nos diferentes grupos.

### **Pacientes e métodos**

Indivíduos normais:

O estudo incluiu 15 adultos normais voluntários (5 homens e 10 mulheres); idade média de  $39,7 \pm 13,19$  anos [mulheres 44,4 anos (22-62 anos); homens 30,4 anos (19-52 anos)] com Índice de Massa Corporal (IMC) médio de  $27,43 \pm 4,3$  kg/m<sup>2</sup>. Estes indivíduos não apresentaram nenhuma evidência clínica de doenças agudas ou crônicas ou uso de medicação no momento do estudo. O período de coleta de exames, nas mulheres, não foi padronizado conforme a fase do ciclo menstrual. Seis das 10 mulheres participantes estavam no climatério, e nenhuma fazia uso de estrógeno.

Pacientes acromegálicos:

Foram estudados 55 pacientes acromegálicos, 23 homens (41,8%) e 32 mulheres (58,2%), com média de idade de  $53,2 \pm 11,73$  anos [mulheres 50,2 anos (30-82 anos) e homens 44,6 anos (34-74 anos)]; IMC  $28,59 \pm 4,31$  kg/m<sup>2</sup>. O diagnóstico de acromegalia foi realizado através de características clínicas, GH não supressivo ( $>1,0$  µg/l) após TTOG e presença de tumor em exame de imagem (Tomografia Computadorizada ou Ressonância Nuclear Magnética). Dez pacientes apresentavam microadenoma e 42, macroadenoma (diâmetro tumoral em seu maior eixo superior a 1,0 cm). Dois pacientes apresentaram sela vazia, e 1 foi diagnosticado com tumor ectópico. No início do estudo, 8 (14,5%) pacientes não haviam sido submetidos a nenhum tipo de tratamento, 30 (54,5%) realizaram somente cirurgia, 2 (3,6%) foram tratados somente com medicação, 7 (14,5%) com medicação e cirurgia, 3 (5,5%) com cirurgia e radioterapia e 4 (7,3%) com medicação, cirurgia e radioterapia. Um paciente apresentou apoplexia hipofisária, com resolução do quadro. Daqueles que utilizaram medicação, 6 (10,9%) estavam em uso de octreotide, 2 (3,6%) usavam cabergolina, 1 (1,8%) bromocriptina, 1 (1,8%) bromocriptina e octreotide e 4 (7,3%) octreotide mais cabergolina. A via cirúrgica transesfenoidal foi utilizada em todos os pacientes operados. Daqueles que participaram do estudo, todos tinham no mínimo 3 meses de pós-operatório. Todos os pacientes com diagnóstico de hipopituitarismo (21 pacientes; 38,2%) estavam em reposição hormonal adequada. Com relação a doenças crônicas, 33 (60%) pacientes continuaram hipertensos após a cirurgia (14 considerados curados e 19 não curados); 10 (18,2%) diabéticos, 2 deles considerados curados e 5 (9,1%) intolerantes à glicose (1 destes curado).(Tabela 1) Foram classificados hipertensos os pacientes com a média da pressão arterial maior

que 140/90 mmHg, medida duas vezes, com o paciente em repouso por 15 minutos. Intolerante e diabético foi considerado como glicemia sérica maior que 140 mg/dl e 200 mg/dl duas horas após ingestão de 75 gramas de glicose, respectivamente. Nenhum paciente apresentava doenças hepáticas ou renais.

Com o objetivo de analisar os critérios de cura, os pacientes acromegálicos foram divididos de acordo com seus níveis basais de IGF-1 normal (grupo 1), baixo (grupo 2) e elevado (grupo 3). Foram também comparados os níveis de IGF-1 de acordo com os níveis observados de GH basal e nadir após glicose.

#### Métodos:

Solicitou-se que os pacientes comparecessem ao ambulatório de neuroendocrinologia, com 8 horas de jejum, para avaliação clínica e realização de exames laboratoriais. Foram coletadas amostras -15, basal e a cada 30 minutos, durante 2 horas, após a ingestão de 75 gramas de glicose para dosagem de glicemia e GH. Os valores basais foram considerados como a média do GH nos tempos -15 e basal. O IGF-1 (*Insulin Like Growth Factor*) foi coletado apenas no tempo basal. No caso de pacientes diabéticos, foram coletadas amostras basal e a cada hora por 4 horas e a média dessas 5 amostras foi considerada como valor basal. O sangue foi retirado de veia antecubital, por meio de cateter heparinizado, e, após formação de coágulo de fibrina, centrifugado e processado em duplicata. Todos os pacientes concordaram em participar do estudo, assinando o Termo de Consentimento Livre Esclarecido. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

#### Ensaio:

GH: foi medido pelo método de quimioluminescência (*Immulite 2000-Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA*), que utiliza anticorpos mono-policlonais 20-22 kDa específicos e calibrador *World Health Organization (WHO) First International Standard 80/505*. A sensibilidade do ensaio é de 0,01 µg/l. O valor de referência para indivíduos saudáveis é de 0,06 a 5,0 µg/l. O coeficiente de variação intra e interensaio é de 6,0% e 5,7%, respectivamente.

IGF-1: medido através de método imunoradiométrico (IRMA), com extração de imunoglobulinas, *DSL-5600 Active (Diagnostic Systems Laboratories, Inc. , Webster, Texas)*. O coeficiente de variação intra e interensaio é de 3,9% e 4,2%, respectivamente. Os valores de referência de acordo com sexo e idade foram estabelecidos pelo fabricante do ensaio (anexo).

Glicose: medida através do método da hexoquinase, pelo aparelho Mega/Bayer.

#### **Análise estatística:**

Os valores foram expressos através de média e desvio-padrão e mediana e percentis (5-95%). Apesar dos valores de GH basal e nadir, no grupo dos acromegálicos considerados não curados (grupo 3), não apresentar uma distribuição normal, existe uma tendência para tanto, por isso os dados também foram apresentados através de média e desvio-padrão. Porém, para a análise estatística, utilizou-se testes não paramétricos quando foi incluído este grupo de pacientes.

O nadir de GH foi considerado como o menor valor de GH durante o TTOG. Quatro pacientes não realizaram TTOG e, portanto, foram excluídos dessa análise. Para comparação das variáveis não-paramétricas, utilizaram-se os

testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. O coeficiente de Spearman foi empregado para avaliar a correlação do GH e IGF-1. O nível de significância admitido foi  $p < 0,05$ . Utilizou-se o programa *SPSS 13.0 for Windows* (SPSS, Inc., Chicago, IL) para armazenamento e análise dos dados.

### **Resultados:**

Indivíduos normais:

GH: nos indivíduos normais, observamos média de GH basal e nadir durante o TTOG de  $0,64 \pm 0,8 \mu\text{g/l}$  (0,05-2,78  $\mu\text{g/l}$ ) e  $0,09 \pm 0,13 \mu\text{g/l}$  (0,01-0,54  $\mu\text{g/l}$ ), respectivamente (Tabela 2). No basal, a média do GH foi maior no sexo feminino do que no masculino ( $0,91 \pm 0,27 \mu\text{g/l}$  vs.  $0,08 \pm 0,02 \mu\text{g/l}$ ,  $p = 0,014$ ). Considerando como limite superior da normalidade o valor médio de GH  $\pm$  dois desvios-padrão obtido na população de indivíduos normais, teremos GH basal inferior a 2,24  $\mu\text{g/l}$  e nadir de GH inferior a 0,35  $\mu\text{g/l}$ . Os níveis séricos de IGF-1 não foram determinados neste grupo.

Pacientes acromegálicos:

GH: os valores médios do GH basal e nadir, incluindo todos os pacientes acromegálicos estudados, foram de  $8,04 \pm 2,81 \mu\text{g/l}$  e  $5,63 \pm 1,89 \mu\text{g/l}$ , respectivamente. Ao dividirmos os pacientes por sexo, as mulheres apresentaram GH basal médio maior que os homens ( $11,2 \pm 4,64 \mu\text{g/l}$  vs.  $3,42 \pm 0,96 \mu\text{g/l}$ ;  $p = 0,042$ ). A média do nadir de GH não apresentou diferença significativa quando comparado por sexo. Não houve diferença entre idade, IMC e incidência de hipopituitarismo entre os sexos. Pacientes com hipopituitarismo, DM2, intolerantes à glicose e aqueles submetidos a radioterapia não apresentaram diferença nos valores de GH basal e nadir.

IGF-1: O valor médio de IGF-1 foi de  $462,30 \pm 383,54$  ng/ml. Ao dividirmos os pacientes em níveis de IGF-1 normais ( $n = 18$ ;  $185,35 \pm 79,17$  ng/ml; grupo 1), baixos ( $n = 6$ ;  $52,27 \pm 16,86$  ng/ml; grupo 2) ou elevados ( $n = 30$ ;  $710,48 \pm 344,9$  ng/ml; grupo 3) para sexo e idade, encontramos os seguintes valores de GH: grupo 1: GH basal  $0,85 \pm 1,06$  µg/l; nadir de GH  $0,24 \pm 0,22$  µg/l; grupo 2: GH basal  $0,29 \pm 0,21$  µg/l; nadir de GH  $0,11 \pm 0,07$  µg/l; grupo 3: GH basal  $14,08 \pm 22,39$  µg/l; nadir de GH  $10,57 \pm 15,93$  µg/l (Tabela 2 e Figura 1). Comparando os níveis de GH basal e nadir entre os grupos 1 e 3, obtivemos diferença significativa ( $p < 0,0001$ ). Comparando os níveis de GH basal ( $p = 0,19$ ) e de nadir ( $p = 0,18$ ) entre os grupos 1 e 2, não encontramos diferença. No entanto, ao compararmos o grupo 1 com os indivíduos saudáveis, os valores do nadir de GH foram maiores no grupo 1 ( $p = 0,002$ ). Pacientes do grupo 2 apresentaram níveis de GH basal ( $p = 0,72$ ) e nadir ( $p = 0,14$ ) semelhantes em relação aos indivíduos normais.

Correlação GH/IGF-1: encontramos uma correlação positiva entre nadir de GH ( $r = 0,82$ ;  $p < 0,0001$ ) e basal ( $r = 0,79$ ;  $p < 0,0001$ ) e IGF-1 nos pacientes acromegálicos como um todo, porém não obtivemos correlação significativa ( $p = 0,21$ ), quando estes foram divididos por nível de IGF-1.

Critérios de cura:

GH Basal: comparamos os valores de GH basal nos 3 grupos de pacientes acromegálicos, divididos de acordo com os níveis de IGF-1. Obtivemos diferença significativa ao compararmos os grupos 2 e 3 ( $0,29 \pm 0,21$  µg/l vs.  $14,08 \pm 22,39$  µg/l;  $p < 0,0001$ ), e 1 e 3 ( $0,85 \pm 1,06$  µg/l vs.  $14,08 \pm 22,39$  µg/l;  $p < 0,0001$ ). Os grupos 1 e 2 não foram diferentes entre si ( $0,85 \pm 1,06$  µg/l vs.  $0,29 \pm 0,21$  µg/l;  $p = 0,19$ ). Quando comparamos os mesmos 3 grupos com o

grupo dos indivíduos normais, verificamos que os grupos 1 e 2 não apresentam diferença significativa nos valores do GH em relação aos controles ( $0,85 \pm 1,06 \mu\text{g/l}$ ;  $0,29 \pm 0,21 \mu\text{g/l}$  vs.  $0,64 \pm 0,8 \mu\text{g/l}$ ,  $p = 0,32$  e  $0,73$ ); porém, ao compararmos com o grupo 3, a diferença é significativa ( $p < 0,0001$ ) (Figura 1). Os valores mínimos e máximos de GH basal encontrados nos grupos 1, 2 e 3, respectivamente, foram  $0,08$ - $4,38 \mu\text{g/l}$ ;  $0,05$ - $0,61 \mu\text{g/l}$  e  $0,47$ -  $102,00 \mu\text{g/l}$ .

Nadir de GH  $< 1 \mu\text{g/l}$ : 25 (41,8%) pacientes acromegálicos apresentaram nadir de GH inferior a  $1 \mu\text{g/l}$ , destes, 18 (69,5%) pacientes tinham IGF-1 normal para sexo e idade, 6 (26%) IGF-1 baixo e 1 (4,3%) IGF-1 alto.

Nadir de GH de acordo com IGF-1: dos pacientes com IGF-1 normal e baixo, nenhum paciente apresentou nadir de GH maior que  $1 \mu\text{g/l}$ . Dos pacientes com IGF-1 elevado, 1 paciente apresentou nadir de GH inferior a  $1 \mu\text{g/l}$ .

Nadir de GH  $< 0,35 \mu\text{g/l}$ : dos 18 pacientes acromegálicos com nadir de GH inferior ao nadir de GH médio  $\pm$  dois desvios-padrão do encontrado em indivíduos normais, 6 apresentaram IGF-1 baixo e 12 IGF-1 normal para mesmo sexo e idade. Nenhum apresentou IGF-1 elevado. Quatro pacientes com IGF-1 normal apresentaram nadir de GH maior que  $0,35 \mu\text{g/l}$ .

GH basal  $< 2,24 \mu\text{g/l}$ : dos 27 pacientes acromegálicos com GH basal inferior ao GH basal médio  $\pm$  dois desvios-padrão do encontrado em indivíduos normais, 17 apresentaram IGF-1 normal, 6 IGF-1 baixo e 4 IGF-1 elevado para mesmo sexo e idade.

GH basal  $< 2,24 \mu\text{g/l}$  e nadir de GH  $< 0,35 \mu\text{g/l}$ : 18 pacientes, todos com IGF-1 normal, apresentam os dois critérios simultaneamente. Nove pacientes apresentaram apenas um dos dois critérios; 3 são diabéticos e não possuem nadir de GH, no entanto, um deles apresenta IGF-1 elevado, e os outros 2

apresentam IGF-1 normal. Os seis pacientes não diabéticos apresentam nadir de GH superior a 0,35 µg/l e destes, três têm IGF-1 elevado e três têm IGF-1 normal.

Correlação GH basal/ nadir de GH dos pacientes dentro do critério de normalidade: existe forte correlação entre os níveis de GH basal e nadir nos pacientes que apresentam nadir de GH <0,35 µg/l e GH basal <2,24 µg/l ( $r = 0,8$ ;  $p < 0,0001$ ). Não encontramos correlação entre GH basal e IGF-1 ( $p = 0,2$ ) nestes mesmos pacientes.

### **Discussão:**

Os critérios para definir cura ou remissão da doença e para estabelecer metas terapêuticas em pacientes acromegálicos passaram por várias modificações com o surgimento de ensaios mais confiáveis de IGF-1 e mais sensíveis e específicos de GH (5, 6, 9, 10, 24-31). A recomendação de que o diagnóstico de acromegalia deva ser realizado a partir de dosagens séricas de GH e IGF-1 e que para o acompanhamento da doença deva-se objetivar níveis de IGF-1 normal para sexo e idade e nadir de GH inferior a 1 µg/l tem gerado uma série de controvérsias. Vários estudos questionam a validade desse ponto de corte. Freda e col. (3) estudaram uma coorte de pacientes acromegálicos que haviam sido submetidos à cirurgia do tumor hipofisário, desses pacientes, mais de 50% dos considerados não curados a partir dos valores de IGF-1, apresentaram níveis séricos de nadir de GH menor que 1 µg/l durante o TTOG. Costa e col., em 2002 (2), demonstraram que, utilizando ensaio imunofluorométrico, o maior valor de nadir de GH encontrado em indivíduos normais era de 0,25 µg/l e,

quando utilizado como ponto de corte em pacientes acromegálicos tratados, somente 15% preenchia este critério.

No presente estudo, nós primeiramente confirmamos que os valores de nadir de GH em indivíduos saudáveis são menores que 1 µg/l, não ultrapassando 0,35 µg/l em ensaio quimioluminescente 20/22kDa específico. Aplicando esses dois valores como ponto de corte nos pacientes acromegálicos estudados, encontramos um paciente, considerado com doença ativa pelo valor do IGF-1, com níveis de nadir de GH abaixo de 1 µg/l. No entanto, dos pacientes com nadir de GH inferior a 0,35 µg/l, nenhum apresentou IGF-1 elevado.

Embasados em estudos que demonstraram forte correlação do GH basal e nadir com a média do GH durante as 24 horas em indivíduos saudáveis, alguns autores recomendam o uso da medida do GH basal em jejum ou ainda a verificação do GH através de várias coletas ao longo do dia para acompanhamento da atividade da doença (28-30). No entanto, outros autores não obtiveram os mesmos resultados (10, 17). Verificamos que existe uma sobreposição de valores tanto em acromegálicos com doença ativa e não ativa quanto destes com os indivíduos normais, invalidando o uso de GH basal como critério para discernir entre cura ou não cura.

É bem descrito na literatura o achado de GH basal e nadir mais elevado em mulheres jovens do que em homens (8). Sugere-se, que no sexo feminino exista uma resistência hepática imposta pelo estrógeno e que, com isso, os níveis de GH sejam mais elevados. Nossos dados demonstram valores de GH basal maior em mulheres normais e naquelas com acromegalia. No entanto, ao contrário do encontrado em um estudo desenvolvido por Thorner e col.(32), os

valores de nadir de GH, em nosso estudo, não diferiram entre homens e mulheres.

O papel do IGF-1 no acompanhamento da evolução da doença e na mortalidade de pacientes acromegálicos ainda é controverso. Clemmons e col. (25) foram os primeiros a publicar um estudo com pacientes acromegálicos antes e após tratamento e concluíram que os níveis de IGF-1 refletiam adequadamente a secreção de GH. Um estudo recente desenvolvido por Holdaway e col. (9) demonstraram que valores elevados de IGF-1 pós tratamento apresentam impacto significativo na mortalidade de pacientes acromegálicos, apesar dos valores normais de GH. Entretanto, nenhuma associação foi encontrada no estudo realizado por Ayuk e col. (10). Com relação a sintomatologia, Dimaraki e col. (4) ao estudarem um grupo de pacientes acromegálicos antes e após tratamento, observaram melhora dos sintomas com a normalização do IGF-1 e recomendam que pacientes com IGF-1 elevado, mesmo na presença de níveis normais de GH, devam ser tratados. Tem sido demonstrado que a secreção de IGF-1 é proporcional à hipersecreção de GH até um valor de 20 µg/l, a partir do qual os níveis de IGF-1 apresentam um platô, não se modificando na mesma proporção do GH (12). Em nosso estudo, houve correlação entre os níveis de IGF-1 e GH analisando o grupo de pacientes acromegálicos como um todo. No entanto, ao dividirmos os pacientes em grupos, utilizando o IGF-1, naqueles em que o GH era normal ou elevado, não houve correlação. Acreditamos que, nestes grupos, os valores muito próximos de GH, no caso dos pacientes curados, e, ao contrário, valores muito elevados nos pacientes não curados explicariam a ausência de correlação.

Verificamos também que, em pacientes com IGF-1 normal ou baixo, os valores de GH foram semelhantes entre eles; porém, ao compararmos estes grupos com indivíduos normais, o GH foi mais alto em pacientes com IGF-1 normal e semelhante nos pacientes com IGF-1 baixo e indivíduos normais. Este dado, ou seja, a presença de IGF-1 baixo em pacientes acromegálicos com nível de supressão de GH correspondente ao encontrado em indivíduos normais, não pode ser explicado pela distribuição maior de mulheres no grupo com IGF-1 baixo, pois todas encontravam-se no climatério, sem uso de estrógeno. Também não havia nenhum paciente com hipopituitarismo severo (disfunção de mais que dois eixos), e nenhum deles havia realizado radioterapia. A diferença de idade entre esses grupos também não contribuiria como um viés, pois não encontramos diferença nos valores de nadir de GH em diferentes idades. Entretanto, devido à grande variação dos valores normativos de IGF-1, não podemos excluir a possibilidade de que os valores de referência estipulados pelo ensaio não estejam adequados e de que os níveis encontrados poderiam ser normais para esses pacientes.

Concluimos que a medida do GH sérico através de ensaio quimioluminescente 20/22 kDa específico em uma população de 55 pacientes acromegálicos, atendidos num mesmo centro, somente se iguala àquela obtida em indivíduos normais quando o IGF-1 encontra-se inferior ao limite da normalidade, para o ensaio empregado. Utilizando como critério de normalidade o valor de nadir de GH de 0,35 µg/l ou menos, alguns pacientes considerados curados pelo critério sugerido no consenso seriam diagnosticados com doença em atividade, demonstrando a importância de padronização local para o ensaio utilizado. A

medida do GH basal não apresentou especificidade suficiente para nos fornecer informações adicionais em relação à atividade da doença.

O acompanhamento desses pacientes no sentido de, prospectivamente, correlacionar estes achados hormonais com a morbi-mortalidade poderá contribuir para validar definitivamente estes critérios. Além disso, em decorrência dos níveis reduzidos de GH julgados normais, devemos considerar que se por um lado podemos controlar a acromegalia, por outro, podemos provocar um estado de deficiência de GH em um número significativo de pacientes. Esta situação poderá também acrescentar significativa morbi-mortalidade, necessitando de critérios diagnósticos específicos e de tratamento adequado.

Finalmente, cabe ressaltar que diante das perspectivas atuais de tratamento da acromegalia, que inclui drogas que atuam em nível hipofisário reduzindo o GH (análogos da somatostatina e agonistas dopaminérgicos), ou periférico, bloqueando o receptor do GH e reduzindo o IGF-1 (pegvisomanto) e, das alternativas clássicas de cirurgia e radioterapia/radiocirurgia, a definição apurada da atividade da moléstia tem importantes repercussões principalmente em decorrência dos altos custos e da morbi-mortalidade envolvidos. Nessa situação, torna-se imprescindível que cada centro normatize com detalhe suas metodologias e que se estabeleçam padrões de referência a serem recomendados nacional e internacionalmente.

## Referências bibliográficas

1. Celniker AC, Chen AB, Wert RM, Jr., Sherman BM. Variability in the quantitation of circulating growth hormone using commercial immunoassays. **J Clin Endocrinol Metab** 1989; 68:469-76.
2. Costa AC, Rossi A, Martinelli CE, Jr., Machado HR, Moreira AC. Assessment of disease activity in treated acromegalic patients using a sensitive GH assay: should we achieve strict normal GH levels for a biochemical cure? **J Clin Endocrinol Metab** 2002; 87:3142-7.
3. Freda PU, Post KD, Powell JS, Wardlaw SL. Evaluation of disease status with sensitive measures of growth hormone secretion in 60 postoperative patients with acromegaly. **J Clin Endocrinol Metab** 1998; 83:3808-16.
4. Dimaraki EV, Jaffe CA, DeMott-Friberg R, Chandler WF, Barkan AL. Acromegaly with apparently normal GH secretion: implications for diagnosis and follow-up. **J Clin Endocrinol Metab** 2002; 87:3537-42.
5. Barkan AL. Biochemical markers of acromegaly: GH vs. IGF-I. **Growth Horm IGF Res** 2004; 14 Suppl A:S97-100.
6. Freda PU. Current concepts in the biochemical assessment of the patient with acromegaly. **Growth Horm IGF Res** 2003; 13:171-84.
7. Biermasz NR, Dekker FW, Pereira AM, van Thiel SW, Schutte PJ, van Dulken H, et al. Determinants of survival in treated acromegaly in a single center: predictive value of serial insulin-like growth factor I measurements. **J Clin Endocrinol Metab** 2004; 89:2789-96.
8. Chapman IM, Hartman ML, Straume M, Johnson ML, Veldhuis JD, Thorner MO. Enhanced sensitivity growth hormone (GH)

- chemiluminescence assay reveals lower postglucose nadir GH concentrations in men than women. **J Clin Endocrinol Metab** 1994; 78:1312-9.
9. Holdaway IM, Rajasoorya RC, Gamble GD. Factors influencing mortality in acromegaly. **J Clin Endocrinol Metab** 2004; 89:667-74.
  10. Ayuk J, Clayton RN, Holder G, Sheppard MC, Stewart PM, Bates AS. Growth hormone and pituitary radiotherapy, but not serum insulin-like growth factor-I concentrations, predict excess mortality in patients with acromegaly. **J Clin Endocrinol Metab** 2004; 89:1613-7.
  11. Wieringa GE, Barth JH, Trainer PJ. Growth hormone assay standardization: a biased view? **Clin Endocrinol (Oxf)** 2004; 60:538-9.
  12. Serri O, Beauregard C, Hardy J. Long-term biochemical status and disease-related morbidity in 53 postoperative patients with acromegaly. **J Clin Endocrinol Metab** 2004; 89:658-61.
  13. Ronchi CL, Varca V, Giavoli C, Epaminonda P, Beck-Peccoz P, Spada A, et al. Long-term evaluation of postoperative acromegalic patients in remission with previous and newly proposed criteria. **J Clin Endocrinol Metab** 2005; 90:1377-82.
  14. Feelders RA, Bidlingmaier M, Strasburger CJ, Janssen JA, Uitterlinden P, Hofland LJ, et al. Postoperative evaluation of patients with acromegaly: clinical significance and timing of oral glucose tolerance testing and measurement of (free) insulin-like growth factor I, acid-labile subunit and growth hormone binding protein levels. **J Clin Endocrinol Metab** 2005;

15. Kaltsas GA, Isidori AM, Florakis D, Trainer PJ, Camacho-Hubner C, Afshar F, et al. Predictors of the outcome of surgical treatment in acromegaly and the value of the mean growth hormone day curve in assessing postoperative disease activity. **J Clin Endocrinol Metab** 2001; 86:1645-52.
16. Seth J, Ellis A, Al-Sadie R. Serum growth hormone measurements in clinical practice: An audit of performance from the UK National External Quality Assessment scheme. **Horm Res** 1999; 51 Suppl 1:13-9.
17. Freda PU, Nuruzzaman AT, Reyes CM, Sundeen RE, Post KD. Significance of "abnormal" nadir growth hormone levels after oral glucose in postoperative patients with acromegaly in remission with normal insulin-like growth factor-I levels. **J Clin Endocrinol Metab** 2004; 89:495-500.
18. De P, Rees DA, Davies N, John R, Neal J, Mills RG, et al. Transsphenoidal surgery for acromegaly in wales: results based on stringent criteria of remission. **J Clin Endocrinol Metab** 2003; 88:3567-72.
19. Reiter EO, Morris AH, MacGillivray MH, Weber D. Variable estimates of serum growth hormone concentrations by different radioassay systems. **J Clin Endocrinol Metab** 1988; 66:68-71.
20. Laws ER, Jr., Piepgras DG, Randall RV, Abboud CF. Neurosurgical management of acromegaly. Results in 82 patients treated between 1972 and 1977. **J Neurosurg** 1979; 50:454-61.
21. Nabarro JD. Acromegaly. **Clin Endocrinol (Oxf)** 1987; 26:481-512.

22. Bates AS, Van't Hoff W, Jones JM, Clayton RN. An audit of outcome of treatment in acromegaly. **Q J Med** **1993**; 86:293-9.
23. Giustina A, Barkan A, Casanueva FF, Cavagnini F, Frohman L, Ho K, et al. Criteria for cure of acromegaly: a consensus statement. **J Clin Endocrinol Metab** **2000**; 85:526-9.
24. Daughaday WH, Starkey RH, Saltman S, Gavin JR, 3rd, Mills-Dunlap B, Heath-Monnig E. Characterization of serum growth hormone (GH) and insulin-like growth factor I in active acromegaly with minimal elevation of serum GH. **J Clin Endocrinol Metab** **1987**; 65:617-23.
25. Veldhuis JD, Liem AY, South S, Weltman A, Weltman J, Clemmons DA, et al. Differential impact of age, sex steroid hormones, and obesity on basal versus pulsatile growth hormone secretion in men as assessed in an ultrasensitive chemiluminescence assay. **J Clin Endocrinol Metab** **1995**; 80:3209-22.
26. Clemmons DR, Van Wyk JJ, Ridgway EC, Kliman B, Kjellberg RN, Underwood LE. Evaluation of acromegaly by radioimmunoassay of somatomedin-C. **N Engl J Med** **1979**; 301:1138-42.
27. Holdaway IM, Rajasoorya CR, Gamble GD, Stewart AW. Long-term treatment outcome in acromegaly. **Growth Horm IGF Res** **2003**; 13:185-92.
28. Barkan AL, Beitins IZ, Kelch RP. Plasma insulin-like growth factor-I/somatomedin-C in acromegaly: correlation with the degree of growth hormone hypersecretion. **J Clin Endocrinol Metab** **1988**; 67:69-73.
29. Oppizzi G, Petroncini MM, Dallabonzana D, Cozzi R, Verde G, Chiodini PG, et al. Relationship between somatomedin-C and growth hormone

- levels in acromegaly: basal and dynamic evaluation. **J Clin Endocrinol Metab** 1986; 63:1348-53.
30. Dobrashian RD, O'Halloran DJ, Hunt A, Beardwell CG, Shalet SM. Relationships between insulin-like growth factor-1 levels and growth hormone concentrations during diurnal profiles and following oral glucose in acromegaly. **Clin Endocrinol (Oxf)** 1993; 38:589-93.
31. Mukherjee A, Monson JP, Jonsson PJ, Trainer PJ, Shalet SM. Seeking the optimal target range for insulin-like growth factor I during the treatment of adult growth hormone disorders. **J Clin Endocrinol Metab** 2003; 88:5865-70.
32. Friend KE, Hartman ML, Pezzoli SS, Clasey JL, Thorner MO. Both oral and transdermal estrogen increase growth hormone release in postmenopausal women--a clinical research center study. **J Clin Endocrinol Metab** 1996; 81:2250-6.

Tabela 1. Características clínicas dos pacientes estudados

	GRUPO 1 n = 19	GRUPO 2 n = 6	GRUPO 3 n =30
IDADE (anos)	57,3 ± 11,6	57,3 ± 7,8	49,73 ± 11,5
SEXO (M/F)	10/9	1/5	12/18
TUMOR			
Micro/macro	3/16	4/2	3/24
CRX (%)	94,0	100	70,0
RTX (%)	10,5	0	16,6
MED (%)	11,1	0	6,6
HIPOP.(%)	57,8	16,6	30,0
DM2 (%)	10,5	16,6	40,0
HAS (%)	52,6	50,0	66,6

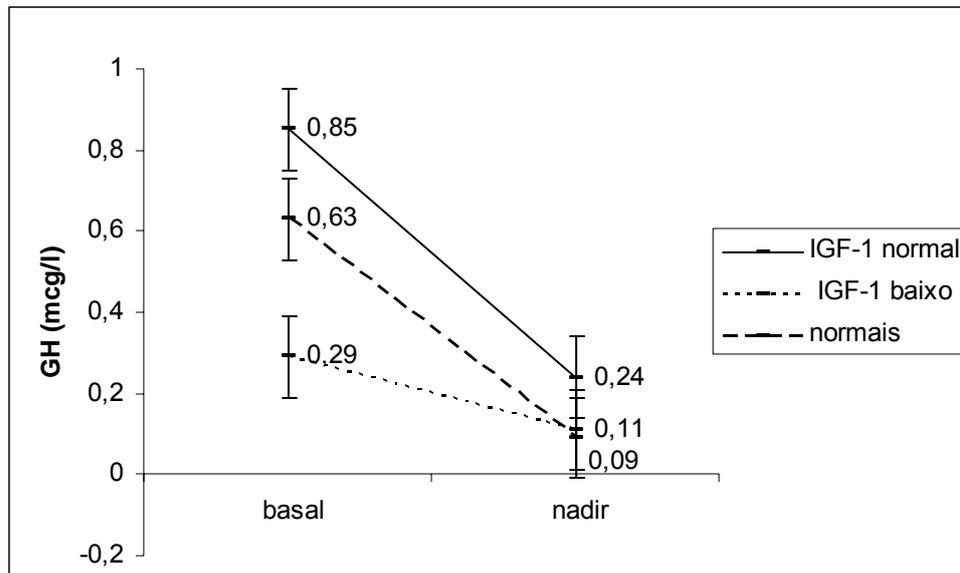
M/F masculino e feminino; micro e macro adenomas; RTX radioterapia; HIPOP. Hipopituitarismo; DM2 diabetes tipo 2; HAS hipertensão arterial sistêmica; CRX cirurgia; MED medicação

Tabela 2. Valores de GH basal e nadir em indivíduos normais e pacientes acromegálicos, classificados de acordo com os níveis de IGF-1

	GH basal ( $\mu\text{g/l}$ )	Nadir do GH ( $\mu\text{g/l}$ )
Indivíduos normais (n = 15)	0,64 $\pm$ 0,8 0,18 (0,05-2,78)	0,09 $\pm$ 0,13 0,05 (0,01-0,54)
IGF-1 normal (grupo 1, n= 18)	0,85 $\pm$ 1,06 0,50 (0,08-2,30)	0,24 $\pm$ 0,22* 0,13 (0,05-0,76)
IGF-1 baixo (grupo 2, n = 6)	0,29 $\pm$ 0,21 0,29 (0,05-0,61)	0,11 $\pm$ 0,07 0,09 (0,05-0,23)
IGF-1 elevado (grupo 3, n= 30)	14,08 $\pm$ 22,39** 5,07 (0,47-102,0)	10,57 $\pm$ 15,93** 3,78 (0,45-65,7)

Os valores são demonstrados como média  $\pm$  desvio padrão e mediana (mínimo-máximo). \* p = 0,002 em relação aos normais; \*\*p <0,0001 em relação aos normais

Figura 1. Valores médios de GH basal e nadir em indivíduos normais e em pacientes acromegálicos com IGF-1 normal e baixo.



**Anexo**

Valores normativos de IGF-1 (ng/ml), IRMA, DSL

Idade Anos	Homens adultos				
	N	média	DP	mediana	mínimo-máximo
18-20	23	489,0	206,7	475,0	197,0-956,0
20-23	29	420,1	114,7	413,0	215,0-426,0
23-25	23	320,7	106,3	304,0	169,0-591,0
25-30	47	236,7	81,2	241,0	119,0-476,0
30-40	41	211,9	102,5	186,0	100,0-494,0

Idade em anos	Mulheres adultas				
	N	média	DP	mediana	mínimo-máximo
18-20	15	367,9	106,1	341,0	193,0-575,0
20-23	25	288,9	109,8	279,0	110,0-521,0
23-25	19	274,9	93,1	273,0	129,0-450,0
25-30	45	253,5	106,6	236,0	96,0-502,0
30-40	24	217,7	76,2	209,0	130,0-354,0

Idade em anos	Homens e mulheres adultas				
	N	média	DP	mediana	mínimo-máximo
30-40	80	214,0	66,3	193,5	100,0-494,0
40-50	43	180,4	46,3	175,0	101,0-303,0
50-70	41	153,7	49,5	145,0	78,0-258,0

**Assessment of acromegalic disease status using a chemiluminescent  
20/22 kDa specific growth hormone assay**

*Running title:* Evaluation of disease status in patients with acromegaly

Casagrande A, Czepielewski MA

Division of Endocrinology, Department of Internal Medicine, Hospital de Clínicas  
de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

*Word count: 5281, number of references: 32, number of figures:2, number of  
tables: 2*

*Address of correspondence and reprint requests:*

Alessandra Casagrande

Serviço de Endocrinologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350, Prédio 12, 4º andar

Porto Alegre, RS, Brazil

CEP 90035003

Telephone: (51)33165600

e-mail: [alessandracasagrande@uol.com.br](mailto:alessandracasagrande@uol.com.br)

*Key words:* acromegaly, remission criteria, immunoassays, growth hormone

## **Abstract**

**Introduction:** Biochemical assessment of acromegaly disease activity is controversial. In 2000, an international consensus proposed a nadir growth hormone (GH) cut off value during an oral glucose tolerance test (OGTT) of less than 1 µg/l to consider remission or cure of acromegaly. The present study was designed to measure serum GH levels in healthy subjects and to compare these values with those of acromegalic patients divided according to their IGF-1 serum levels.

**Subjects and methods:** Fifteen healthy subjects (10 women and 5 men, mean age  $39.7 \pm 13.19$  years old) and 55 acromegalic patients (32 women and 23 men, mean age  $53.2 \pm 11.73$  years old) were studied and the former was divided according to age and sex related IGF-1 levels as follow: Group 1, normal insulin-like growth factor (IGF)-1 levels; Group 2, low IGF-1 levels; Group 3, high IGF-1 levels. A chemiluminescent 20/22 kDa specific assay (*Immulite, 2000*) was used to measure serum GH concentrations. All results are expressed as mean  $\pm$  SD. Otherwise, non-parametric data was analysed through Kruskal-Wallis test and Spearman coefficient correlation.

**Results:** The mean basal and nadir GH levels in normal subjects were respectively  $0.64 \pm 0.8$  µg/l and  $0.09 \pm 0.13$  µg/l. Acromegalic patients from Groups 1 and 3 had higher GH levels than normal subjects ( $p < 0.0001$ ). However, subjects from Group 2 had similar basal ( $p = 0.73$ ) and nadir ( $p = 0.14$ ) GH levels. If one considers as reference the higher limit of normality of GH nadir found in the population of normal subjects, i.e., 0.35 µg/l (mean plus 2 standard deviations), all acromegalic patients with GH nadir lower than 0.35 µg/l

had IGF-1 normal or low. If one considers as a criterion for cure a GH nadir  $<1$   $\mu\text{g/l}$ , a subject with active disease and with a GH nadir of  $0.45$   $\mu\text{g/l}$  and higher IGF-1 levels would go undiagnosed. Four subjects from Group 1 had a GH higher than  $0.35$   $\mu\text{g/l}$ . The basal GH did not differ among groups.

**Conclusion:** Using a high sensitive assay we found that in normal subjects the nadir GH levels were not higher than  $0.35$   $\mu\text{g/l}$ . All acromegalic subjects that presented remission of clinical disease by this criterion also presented normal or even low IGF-1 levels, considering the standards of the assay. Due to great overlapping of values, the basal GH did not provide additional information regarding acromegalic activity after treatment. If, for this population, the nadir cut off value of  $1$   $\mu\text{g/l}$  or less was adopted, as is suggested by the consensus, a patient with the disease in activity would go undiagnosed. This indicates the need for local standards to determine the proper hormonal criteria to confirm cure or remission of acromegaly.

Keywords: acromegaly, assays, remission criteria

## Introduction

The diagnostic criteria to evaluate the disease activity in acromegalic patients has been the subject of some studies (1-19). For several years attempts in defining the best criterion for acromegaly clinical follow up have been made. Based upon epidemiological data many different values for GH (*growth hormone*) have been proposed as therapeutic goals, in an attempt to bring the mortality rates related to acromegaly to the level of those found in the general population. In 1979, Laws (20) suggested as "safe" a mean GH level lower than 5 µg/l as determined by RIE in a 24-hour-period. In 1987, Nabarro (21) used a criterion consisting of basal GH <5 µg/l and GH nadir after a oral glucose tolerance test (OGTT) <2 µg/l; In 1993, Bates (22) suggested GH level resulting from 4 daily samples lower than 2.5 µg/l in association with an IGF (*insulin-like growth factor*)- 1 adequate for the sex and age of the patient. These differences in approach indicate that there was no consensus on how and when GH levels should be measured and on which GH value would be more adequately related to a decrease in mortality. In 2000, Giustina and col. (4) proposed the criteria for the diagnosis and treatment of the patient with acromegaly. According to this consensus, a high IGF-1 for the sex and age groups and a GH higher than 1 µg/l after suppression with glucose would confirm a diagnosis of acromegaly. In the other hand, evidence of a normal IGF-1 associated to a nadir GH after overload with glucose lower than 1 µg/l would indicate cure or remission of acromegaly. However, the consensus itself foresees that as new more sensitive and specific assays for determining GH are introduced, these criteria should be

reviewed. In 2004, Freda and col., (6), used an immunoradiometric 22 kDa specific assay using WHO 88/624 calibrator, the first to use a recombinant GH, demonstrated that in healthy individuals, levels of nadir GH are not higher than 0.14  $\mu\text{g/l}$ . In the same study, when considering acromegalic patients with normal IGF-1, an excess of 50% had nadir GH higher than 0.14  $\mu\text{g/l}$ . During clinical follow up of these patients, recurrence of the disease with later elevation in the IGF-1 was observed. In this study we aimed to characterize the basal and nadir GH values in healthy subjects utilizing a chemiluminescent assay which is used as routine at our clinical endocrinology department and to compare the values found with those observed in 55 acromegalic patients which were followed up clinically at our service.

### **Patients and Methods**

Control group:

The study included 15 normal volunteer adults (5 men and 10 women); mean ages of  $39.7 \pm 13.19$  years-old [women 44.4 years-old (22-62 years-old); men 30.4 years-old (19-52 years-old)] with Body Mass Index (BMI) of  $27.43 \pm 4.3$   $\text{kg/m}^2$ . These subjects did not present any clinical evidence of neither acute nor chronic diseases or the use of any drugs at the time of the study. In the women, the period of sample collection were not standardized according to the menstrual cycle. Six out of the 10 participant women were in the menopause, and none used estrogens.

Patients:

Fifty five acromegalic patients were studied; 23 men (41.8%) and 32 women (58.2%), with ages averaging  $53.2 \pm 11.73$  years-old [women 50.2 years-old

(30-82 years-old) and men 44.6 years-old (34-74 years-old)]; BMI  $28.59 \pm 4.31$  kg/m<sup>2</sup>. At the time of diagnosis, 10 patients presented with a pituitary microadenoma and 42 had a pituitary macroadenoma (tumoral diameter over 1 cm in the largest axis). Two patients presented empty sella and one was diagnosed as having an ectopic tumor. In the beginning of the study, 8 (14.5%) patients were not submitted to any kind of treatment; 30 (54.5%) had only surgery; 2 (3.6%) were treated with drug therapy alone; 7 (14.5%) with drug therapy and surgery; and 3 (5.5%) with surgery and radiation therapy. Out of those on drug therapy, 6 (10.9%) were using octreotide; 2 (3.6%) cabergoline; 1 (1.8%) bromocriptine; 1 (1.8%) bromocriptine plus octreotide; and 4 (7.3%) octreotide plus cabergoline. The transsphenoidal surgical approach was applied in each of the operated patients and all the subjects of the study had at least 3 months of post-surgical period. All subjects with the diagnosis of hypopituitarism (21 patients; 38.2%) were in hormone replacement. Regarding chronic diseases 33 (60%) patients remained hypertensive after surgery (14 considered cured and 19 non-cured); 10 (18.2%) were patients with diabetes two of which were considered cure and 5 (9.1%) and 5 of which were intolerant to glucose (one of which cured). Patients classified as hypertensive were those with a mean arterial blood pressure higher than 140/90 mmHg as measured twice with the patient rested for 15 minutes. Were considered intolerant and diabetic those patients respectively with a blood sugar higher than 140 mg/dl and 200 mg/dl two hours after ingesting 75 g of glucose.

No patient had liver or kidney diseases. The diagnosis of acromegaly was done based up on the clinical characteristics, non-suppressive GH ( $>1.0$   $\mu\text{g/l}$ ) after OGTT and presence of neoplasm detected by image tests (Computed

Tomography or Magnetic Resonance Imaging). Aiming in evaluating the criteria for cure, the acromegalic patients were divided according to their basal levels of IGF-1 as follows: normal (Group 1), low (Group 2) and high (Group 3). Additionally, the levels of IGF-1 were also compared with the basal and nadir GH after glucose ingestion.

#### Study procedures

The patients were asked to present themselves to the walking-in clinics of neuroendocrinology observing 8 hours of fasting for clinical evaluation and laboratory testing. For determinations of glucose and GH serum levels blood samples were taken -15, basal and every each 30 minutes during 2 hours, after the ingestion of 75 g of glucose. The basal levels were considered as the mean of GH in the -15 and basal times. The IGF-1 was measured only in the basal time. In the case of diabetic patients basal samples were taken every each 4 hours and the average of these 5 samples was considered as the basal value. The blood was drawn from antecubital vein through and heparinized catheter. After fibrin colt was formed the blood was centrifuged and processed in duplicate. All patients agreed in participating in the study signing the Term of Free Aware Consent. The study was approved by the Committee on Ethics in Research of the Hospital de Clínicas, Porto Alegre, Brazil.

#### Methods:

GH: measured by the chemiluminescent immunometric assay (*Immulite 2000-Diagnostic Products Corp., Los Angeles, CA*) based on monoclonal and polyclonal antibodies 20-22 kDa specific and a calibrated against *World Health Organization (WHO) First International Standard 80/505*. The assay sensitivity

is of 0.01 µg/l. The reference values for healthy individuals are 0.06-5.0 µg/l. The intra and interassay coefficient of variation are respectively 6.0% e 5.7%.

IGF-1: measured by the immunoradiometric assay (IRMA), with immunoglobulin extraction, *DSL-5600 Active (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, Texas)*. The intra and interassay coefficient of variation are respectively 3.9% e 4.2%. The reference values according to sex and age were established by the manufacturer (Annex)

Glucose: measured by the hexokinase method, using the Mega/Bayer apparatus.

### **Statistical Analysis**

The values were expressed through the mean and standard deviation, median and percentage (5-95%). Although the values of basal and nadir GH in the group of acromegalic considered non-cured (Group 3) do not present a normal distribution, there is a tendency to that and thus the data were also presented as the mean and standard deviation. However, for the statistical analysis, when this group of patients was included, non-parametric tests were considered.

The nadir GH nadir was considered as the lowest value of GH during the OGTT. For comparison between non-parametric variables, the tests of Kruskal-Wallis and Mann-Whitney were used. Spearman coefficient correlation was utilized to evaluate the correlation between GH and IGF-1. The level of significance admitted was  $p < 0.05$ . The program *SPSS 13.0 for Windows* (SPSS, Inc., Chicago, IL) was used for storage and analysis of data.

## Results

### Normal Subjects:

GH: in the normal subjects, mean basal and nadir GH levels during OGTT were, respectively,  $0.64 \pm 0.8 \mu\text{g/l}$  (0.05-2.78  $\mu\text{g/l}$ ) and  $0.09 \pm 0.13 \mu\text{g/l}$  (0.01-0.54  $\mu\text{g/l}$ ) (Table1). In basal GH, the GH mean was greater in females than in males ( $0.91 \pm 0.27 \mu\text{g/l}$  vs.  $0.08 \pm 0.02 \mu\text{g/l}$ ,  $p = 0.014$ ). Considering as the higher limit of normality the mean GH value found in the population of normal subjects plus two standard deviations, will have a basal GH lower than 2.24  $\mu\text{g/l}$  and a nadir GH lower than 0.35  $\mu\text{g/l}$ . The IGF-1 serum levels were not determined in this group.

### Acromegalic patients:

GH: the mean values of basal and nadir GH, including all acromegalic patients studied, were respectively  $8.04 \pm 2.81 \mu\text{g/l}$  e  $5.63 \pm 1.89 \mu\text{g/l}$ . When the patients were split by sex, women present a mean basal GH higher than that found in men ( $11.2 \pm 4.64 \mu\text{g/l}$  vs.  $3.42 \pm 0.96 \mu\text{g/l}$ ;  $p = 0,042$ ). The mean nadir GH did not presented a significant difference when compared by sex. There were no difference regarding age, BMI, and incidence of hypopituitarism between sexes. Patients with hypopituitarism, diabetes mellitus type 2 (DM2), intolerant to glucose and those submitted to radiation therapy did not present differences in the basal and nadir GH values.

IGF-1: the mean value of IGF-1 was  $462.30 \pm 383.54 \text{ ng/ml}$ . Splitting the patients according to IGF-1 levels as normal levels ( $n = 18$ ;  $185.35 \pm 79.17 \text{ ng/ml}$ ; Group 1), low ( $n = 6$ ;  $52.27 \pm 16.86 \text{ ng/ml}$ ; Group 2) or high ( $n = 30$ ;  $710.48 \pm 344.9 \text{ ng/ml}$ ; Group 3) for their sex and age, we found the following GH values: Group 1: basal GH of  $0.85 \pm 1.06 \mu\text{g/l}$ ; nadir GH of  $0.24 \pm 0.22 \mu\text{g/l}$ ;

Group 2: basal GH of  $0.29 \pm 0.21 \mu\text{g/l}$ ; nadir GH of  $0.11 \pm 0.07 \mu\text{g/l}$ ; Group 3: basal GH of  $14.08 \pm 22.39 \mu\text{g/l}$ ; nadir GH of  $10.57 \pm 15.93 \mu\text{g/l}$  (Table 1 and Figure 1). Comparing the basal and nadir GH levels between Groups 1 and 3 we found a significant ( $p < 0.0001$ ) difference. No significant differences were found when basal and nadir GH levels between Groups 1 and 2 were compared. However when comparing Group 1 subjects with healthy individuals, one finds that nadir GH levels were higher in the Group 1 subjects ( $p = 0.002$ ). Patients from Group 2 had basal and nadir GH levels similar to those found in healthy individuals. Group 1 consisted of 10 men and 9 women; the latter had mean age of 61.8 years-old. Group 1 had more females ( $n=5$ ) than males ( $n=1$ ); mean age of 56.4 years-old. The group of healthy subjects consisted of 10 women, with mean age of 44.4 years-old, and 5 men.

GH/IGF-1 ratio: In acromegalic patients in general there was a positive correlation between nadir ( $r = 0.82$ ;  $p < 0.0001$ ) and basal ( $r = 0.79$ ;  $p < 0.0001$ ) GH and IGF-1 but we failed to obtain a significant correlation ( $p = 0.21$ ), when acromegalic patients were split according to the IGF-1 level.

Criteria for cure:

Basal GH: The values of basal GH were compared among the patients of the three acromegalic groups divided according to IGF-1 levels. A significant difference was obtained when we compared Groups 2 and 3: ( $0.29 \pm 0.21 \mu\text{g/l}$  vs.  $14.08 \pm 22.39 \mu\text{g/l}$ ;  $p < 0.0001$ ); and Groups 1 and 3: ( $0.85 \pm 1.06 \mu\text{g/l}$  vs.  $14.08 \pm 22.39 \mu\text{g/l}$ ;  $p < 0.0001$ ). There were no difference between Groups 1 and 2 ( $0.85 \pm 1.06 \mu\text{g/l}$  vs.  $0.29 \pm 0.21 \mu\text{g/l}$ ;  $p = 0.19$ ). When the same 3 groups are compared with normal subjects, no significant difference it is observed between the GH values of Groups 1 and 2 in relation to controls ( $0.85 \pm 1.06$

$\mu\text{g/l}$ ;  $0.29 \pm 0.21 \mu\text{g/l}$  vs.  $0.64 \pm 0.8 \mu\text{g/l}$ ,  $p = 0.32$  and  $0.73$ ); however the maximum and minimum values for basal GH found in Groups, 1-3 were respectively  $0.08$ - $4.38 \mu\text{g/l}$ ;  $0.05$ - $0.61 \mu\text{g/l}$  e  $0.47$ - $102.00 \mu\text{g/l}$ .

GH nadir  $<1 \mu\text{g/l}$ : 23 (41.8%) acromegalic patients presented a nadir GH lower than  $1 \mu\text{g/l}$ ; of those, considering their the sex and age, 18 (69.5%) patients had normal IGF-1, 6 (26%) had low IGF-1 and 1 (4.3%) had high IGF-1.

Nadir GH in relation with IGF-1: none of the patients presenting normal and low levels of IGF-1 had nadir GH levels higher than  $1 \mu\text{g/l}$ . Out of the patients with high IGF-1, one had nadir GH levels lower than  $1 \mu\text{g/l}$ .

Nadir GH  $<0.35 \mu\text{g/l}$ : Out of 18 acromegalic patients with nadir GH lower than mean GH  $\pm$  two standard deviations of the GH found in normal individuals, 6 presented low IGF-1 and 12 had a normal IGF-1 for the same sex and age group; four patients with normal IGF-1 presented a nadir GH higher than  $0.35 \mu\text{g/l}$ . Two of these patients are women with 48 and 62 years-old and another one had radiation therapy 7 years ago).

Basal GH  $<2.24 \mu\text{g/l}$ : Out of the 27 acromegalic patients with basal GH lower than the mean basal GH found in the normal population  $\pm$  two standard deviations, 17 presented normal IGF-1, 6 had low IGF-1 and 4 had high IFG-1, considering the same sex and age groups.

Basal GH  $<2.24 \mu\text{g/l}$  and nadir GH  $<0.35 \mu\text{g/l}$ : 18 patients, all of them with normal IGF-1 presented the two criteria simultaneously. Nine patients presented only one of the two criteria. Three of those had diabetes and did not have a nadir GH; however, one of the three had a high IGF-1 and the other two had normal IGF-1.

GH basal/ GH nadir ration in patients within the criteria of normality: there is a strong correlation between the levels of basal and nadir GH in patients that present nadir GH  $<0.35 \mu\text{g/l}$  and basal GH  $<2.24 \mu\text{g/l}$  ( $r = 0.8$ ;  $p <0.0001$ ). A correlation between basal GH and IFG-1 ( $p = 0.2$ ) was not found in the same patients.

## **Discussion**

The criteria to define cure or remission of acromegaly and to establish therapeutic goals went through several changes after the availability of more reliable assays to measure IGF-1 and more sensitive and specific ones to measure GH (5, 6, 9, 10, 23-30). The recommendation that the diagnosis of acromegaly should be performed from serum determinations of GH and IGF-1 and that the clinical follow up of the disease should aim a normal IGF-1 for the sex and age group and a nadir GH lower than  $1 \mu\text{g/l}$ , has generate several controversies. Several studies question the validity of this cut off point. Freda and col. (6) studied a cut off point in acromegalic patients submitted to surgical removal of a pituitary tumor. More than More than 50% of these patients, considered non-cured by IGF-1 values, had a nadir GH lower than  $1 \mu\text{g/l}$  during OGTT. Costa and col., in 2002 (6), demonstrated that, using an immunofluorometric assay, the highest value of nadir GH found in normal individuals was  $0.25 \mu\text{g/l}$  and when this value was used as a cut off point in treated acromegalic patients, only 15% fulfilled this criterion .

In the present study, we confirmed that the nadir GH in healthy individuals is lower than  $1 \mu\text{g/l}$ , not surpassing  $0.35 \mu\text{g/l}$  in a chemiluminescent 20/22 kDa specific assay. Using these values as cut off point in the acromegalic patients

studied, we found a patient, considered as having active disease by the IGF-1, with a nadir GH lower than 1  $\mu\text{g/l}$ . However, no patient with nadir GH lower than 0.35  $\mu\text{g/l}$  had a high IGF-1.

Based up on studies that demonstrated a strong correlation between basal and nadir GH and the mean GH level during 24 hours in healthy individuals, some authors recommend measuring the basal GH during fast or else the determination of GH through several samples taken during the day in order to follow the activity of the disease (27-29). However, other authors failed to obtain similar results (10, 17). We verified that there is an overlapping of values in acromegalic patients with active, in acromegalic patients with non-active disease and in normal individuals; these findings do not validate the use of basal GH as a criterion to differ between cure and non-cure.

The finding of basal and nadir GH higher in young women than in men is well described in the literature (8). It is suggested that there is an estrogenic imposed hepatic resistance in females which would be the cause o higher GH levels. Our data demonstrate values of basal GH higher in normal women and in women with acromegaly. However, contrary to what was found in a study by Thorner and col.(31), the values of nadir GH in our study did not differ between men and women.

The role of IGF-1 in the acromegaly clinical follow up and in the mortality of acromegalic patients is still a matter of controversy. Clemmons and col, (25) were the first to publish a study with acromegalic patients before and after treatment and concluded that the levels of IGF-1 properly reflected the GH secretion. Holdaway and col. (9) demonstrated that high post-therapy values for IGF-1 indicate a significant impact in the mortality rates of acromegalic patients,

despite normal GH values. However no correlation was found in a study done by Ayuk and col. (10). Regarding the symptoms Dimaraki and col. (4) studying a group of acromegalic patients before and after treatment observed an improvement in the symptoms when the IGF reached the normal values and recommended that patients with high IGF-1, even in the presence of normal GH levels, should be treated. It has been demonstrated that the secretion of IGF-1 is proportional to hypersecretion of GH up to a value of 20 µg/l, after which the levels of IGF-1 reach a plateau and do not change in the same proportion as GH (12). In our study there was a correlation between the IGF-1 and GH levels when the group of acromegalic patients is analysed as a whole. However if one splits the acromegalic patients in groups utilizing the IGF-1 levels, there were no correlation in those with normal or high GH levels. We believe that in these groups the lack of correlation could be explained by the fact that the GH values are too close in cured patients and too high in non-cured patients.

We also verified that acromegalic patients with normal or low IGF-1 values had similar GH values; however if one compares these groups with normal individuals, the GH proved to be higher in patients with normal IGF-1 and similar in patients with low IGF-1 and in normal individuals. The occurrence of low IGF-1 in acromegalic patients with GH suppression level corresponding to that found in normal individuals could not be explained by the greater distribution of women in the group with low IGF-1 since all of them were in menopause and were not using estrogens. Also, there were no patient with severe hypopituitarism (dysfunction larger than 2 axes) and none of them was submitted to radiation therapy. The age difference between these groups would also not contribute since no difference in the nadir GH in different ages was

found. However due to the great variation in normal values IGF-1 values we could not exclude the possibility that the assay-stipulated reference values be inadequate and that the levels found could be normal for these patients. We concluded that the measurement of the serum GH using a chemiluminescent assay 20/22 kDa specific in a population of 55 acromegalic patients treated in the same center only equal that obtained in normal individuals when the IGF-1 is below the low limit of normalcy for the assay adopted. Using the nadir GH value of 0.35 µg/l or less as a criterion of normalcy, some patients considered cured by the criterion suggested in the consensus would be diagnosed as having acromegaly in activity, revealing the importance of a local standardization for the adopted assay. The measurement of the basal GH did not present enough specificity as to provide additional information regarding the activity of the disease.

The clinical follow up of these patients in order to prospectively correlate these hormonal findings with morbidity and mortality rates might contribute to definitively validate these criteria. Furthermore, due to the reduced GH levels regarded as normal. We should consider that if, by one hand, one could control acromegaly, by the other hand, one could cause a GH deficient state in a significant number of patients. This situation could also add significantly to the morbidity and mortality rates, needing specific diagnostic criteria and proper treatment. Finally it is worth mentioning that facing current treatment perspectives for acromegaly – which include drugs acting at pituitary level reducing GH secretion (somatostatin analogs and dopaminergic agonists) or at peripheral level blocking the receptor for GH and reducing the IGF-1 (pegvisomant) – and facing the classic alternatives of surgery and radiation therapy/radiosurgery, the

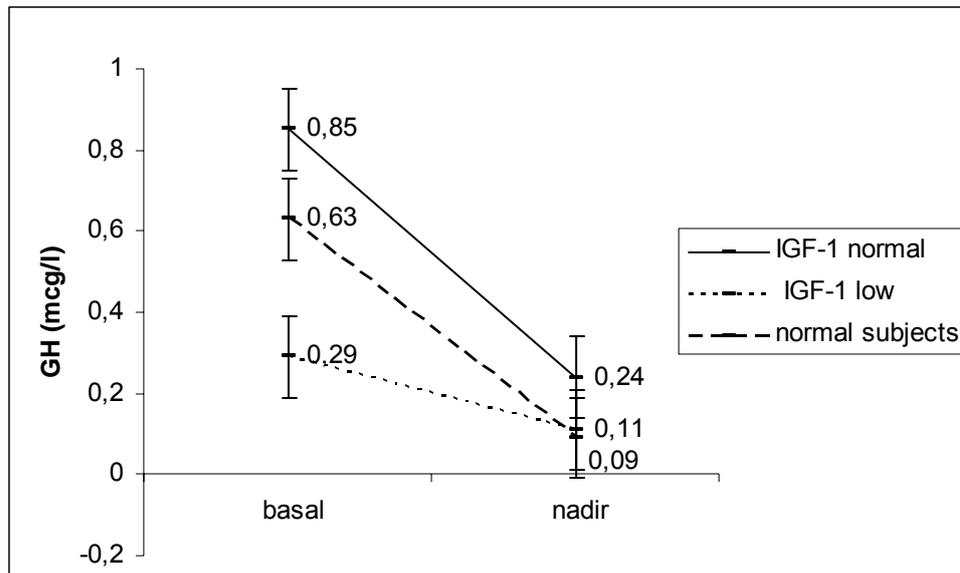
accurate definition of disease activity has important repercussions, mainly due to high costs and to morbidity and mortality involved. In this situation it is necessary that each treatment center detail their norms and methodology and that reference standards to be recommended nationally and internationally be established.

Table 1. Values of basal and nadir GH in normal individuals and acromegalic patients classified according to IGF-1 levels

	Basal GH ( $\mu\text{g/l}$ )	Nadir GH ( $\mu\text{g/l}$ )
Normal individuals (n = 15)	0.64 $\pm$ 0,8 0.18 (0.05-2.78)	0.09 $\pm$ 0,13 0.05 (0.01-0.54)
Normal IGF-1 (Group 1, n= 18)	0.85 $\pm$ 1.06 0.50 (0.08-2.30)	0.24 $\pm$ 0.22* 0.13 (0.05-0.76)
Low IGF-1 (Group 2, n = 6)	0.29 $\pm$ 0.22 0.29 (0.05-0.61)	0.11 $\pm$ 0.07 0.09 (0.05-0.23)
High IGF-1 (Group 3, n= 30)	14.08 $\pm$ 22.39** 5.07 (0.47-102.0)	10.57 $\pm$ 15.93** 3.78 (0.45-65.7)

The values are demonstrated as mean  $\pm$  standard deviation and as median (minimum-maximum). \* p = 0.001 in relation to normal; \*\*p <0.0001 in relation to normal

Figure 1. Basal and nadir GH mean values in normal and acromegalic patients with normal and low IGF-1 levels.



## Annex

IGF-1 reference range (ng/ml).

Age in years	Adult men				
	N	mean	SD	median	minimum-maximum
18-20	23	489.0	206.7	475.0	197.0-956.0
20-23	29	420.1	114.7	413.0	215.0-426.0
23-25	23	320.7	106.3	304.0	169.0-591.0
25-30	47	236.7	81.2	241.0	119.0-476.0
30-40	41	211.9	102.5	186.0	100.0-494.0

Age in years	Adult women				
	N	mean	DP	median	minimum-maximum
18-20	15	367.9	106.1	341.0	193.0-575.0
20-23	25	288.9	109.8	279.0	110.0-521.0
23-25	19	274.9	93.1	273.0	129.0-450.0
25-30	45	253.5	106.6	236.0	96.0-502.0
30-40	24	217.7	76.2	209.0	130.0-354.0

Age in years	Adult men and women				
	N	mean	DP	median	minimum-maximum
30-40	80	214.0	66.3	193.5	100.0-494.0
40-50	43	180.4	46.3	175.0	101.0-303.0
50-70	41	153.7	49.5	145.0	78.0-258.0

## References

1. Celniker AC, Chen AB, Wert RM, Jr., Sherman BM. Variability in the quantitation of circulating growth hormone using commercial immunoassays. **J Clin Endocrinol Metab** 1989; 68:469-76.
2. Costa AC, Rossi A, Martinelli CE, Jr., Machado HR, Moreira AC. Assessment of disease activity in treated acromegalic patients using a sensitive GH assay: should we achieve strict normal GH levels for a biochemical cure? **J Clin Endocrinol Metab** 2002; 87:3142-7.
3. Freda PU, Post KD, Powell JS, Wardlaw SL. Evaluation of disease status with sensitive measures of growth hormone secretion in 60 postoperative patients with acromegaly. **J Clin Endocrinol Metab** 1998; 83:3808-16.
4. Dimaraki EV, Jaffe CA, DeMott-Friberg R, Chandler WF, Barkan AL. Acromegaly with apparently normal GH secretion: implications for diagnosis and follow-up. **J Clin Endocrinol Metab** 2002; 87:3537-42.
5. Barkan AL. Biochemical markers of acromegaly: GH vs. IGF-I. **Growth Horm IGF Res** 2004; 14 Suppl A:S97-100.
6. Freda PU. Current concepts in the biochemical assessment of the patient with acromegaly. **Growth Horm IGF Res** 2003; 13:171-84.
7. Biermasz NR, Dekker FW, Pereira AM, van Thiel SW, Schutte PJ, van Dulken H, et al. Determinants of survival in treated acromegaly in a single center: predictive value of serial insulin-like growth factor I measurements. **J Clin Endocrinol Metab** 2004; 89:2789-96.
8. Chapman IM, Hartman ML, Straume M, Johnson ML, Veldhuis JD, Thorner MO. Enhanced sensitivity growth hormone (GH)

- chemiluminescence assay reveals lower postglucose nadir GH concentrations in men than women.**J Clin Endocrinol Metab 1994;** 78:1312-9.
9. Holdaway IM, Rajasoorya RC, Gamble GD. Factors influencing mortality in acromegaly.**J Clin Endocrinol Metab 2004;** 89:667-74.
  10. Ayuk J, Clayton RN, Holder G, Sheppard MC, Stewart PM, Bates AS. Growth hormone and pituitary radiotherapy, but not serum insulin-like growth factor-I concentrations, predict excess mortality in patients with acromegaly.**J Clin Endocrinol Metab 2004;** 89:1613-7.
  11. Wieringa GE, Barth JH, Trainer PJ. Growth hormone assay standardization: a biased view?**Clin Endocrinol (Oxf) 2004;** 60:538-9.
  12. Serri O, Beauregard C, Hardy J. Long-term biochemical status and disease-related morbidity in 53 postoperative patients with acromegaly.**J Clin Endocrinol Metab 2004;** 89:658-61.
  13. Ronchi CL, Varca V, Giavoli C, Epaminonda P, Beck-Peccoz P, Spada A, et al. Long-term evaluation of postoperative acromegalic patients in remission with previous and newly proposed criteria.**J Clin Endocrinol Metab 2005;** 90:1377-82.
  14. Feelders RA, Bidlingmaier M, Strasburger CJ, Janssen JA, Uitterlinden P, Hofland LJ, et al. Postoperative evaluation of patients with acromegaly: clinical significance and timing of oral glucose tolerance testing and measurement of (free) insulin-like growth factor I, acid-labile subunit and growth hormone binding protein levels.**J Clin Endocrinol Metab 2005;**

15. Kaltsas GA, Isidori AM, Florakis D, Trainer PJ, Camacho-Hubner C, Afshar F, et al. Predictors of the outcome of surgical treatment in acromegaly and the value of the mean growth hormone day curve in assessing postoperative disease activity.**J Clin Endocrinol Metab** 2001; 86:1645-52.
16. Seth J, Ellis A, Al-Sadie R. Serum growth hormone measurements in clinical practice: An audit of performance from the UK National External Quality Assessment scheme.**Horm Res** 1999; 51 Suppl 1:13-9.
17. Freda PU, Nuruzzaman AT, Reyes CM, Sundeen RE, Post KD. Significance of "abnormal" nadir growth hormone levels after oral glucose in postoperative patients with acromegaly in remission with normal insulin-like growth factor-I levels.**J Clin Endocrinol Metab** 2004; 89:495-500.
18. De P, Rees DA, Davies N, John R, Neal J, Mills RG, et al. Transsphenoidal surgery for acromegaly in wales: results based on stringent criteria of remission.**J Clin Endocrinol Metab** 2003; 88:3567-72.
19. Reiter EO, Morris AH, MacGillivray MH, Weber D. Variable estimates of serum growth hormone concentrations by different radioassay systems.**J Clin Endocrinol Metab** 1988; 66:68-71.
20. Laws ER, Jr., Piepgras DG, Randall RV, Abboud CF. Neurosurgical management of acromegaly. Results in 82 patients treated between 1972 and 1977.**J Neurosurg** 1979; 50:454-61.
21. Nabarro JD. Acromegaly.**Clin Endocrinol (Oxf)** 1987; 26:481-512.

22. Bates AS, Van't Hoff W, Jones JM, Clayton RN. An audit of outcome of treatment in acromegaly. **Q J Med** **1993**; 86:293-9.
23. Daughaday WH, Starkey RH, Saltman S, Gavin JR, 3rd, Mills-Dunlap B, Heath-Monnig E. Characterization of serum growth hormone (GH) and insulin-like growth factor I in active acromegaly with minimal elevation of serum GH. **J Clin Endocrinol Metab** **1987**; 65:617-23.
24. Veldhuis JD, Liem AY, South S, Weltman A, Weltman J, Clemmons DA, et al. Differential impact of age, sex steroid hormones, and obesity on basal versus pulsatile growth hormone secretion in men as assessed in an ultrasensitive chemiluminescence assay. **J Clin Endocrinol Metab** **1995**; 80:3209-22.
25. Clemmons DR, Van Wyk JJ, Ridgway EC, Kliman B, Kjellberg RN, Underwood LE. Evaluation of acromegaly by radioimmunoassay of somatomedin-C. **N Engl J Med** **1979**; 301:1138-42.
26. Holdaway IM, Rajasoorya CR, Gamble GD, Stewart AW. Long-term treatment outcome in acromegaly. **Growth Horm IGF Res** **2003**; 13:185-92.
27. Barkan AL, Beitins IZ, Kelch RP. Plasma insulin-like growth factor-I/somatomedin-C in acromegaly: correlation with the degree of growth hormone hypersecretion. **J Clin Endocrinol Metab** **1988**; 67:69-73.
28. Oppizzi G, Petroncini MM, Dallabonzana D, Cozzi R, Verde G, Chiodini PG, et al. Relationship between somatomedin-C and growth hormone levels in acromegaly: basal and dynamic evaluation. **J Clin Endocrinol Metab** **1986**; 63:1348-53.

29. Dobrashian RD, O'Halloran DJ, Hunt A, Beardwell CG, Shalet SM. Relationships between insulin-like growth factor-1 levels and growth hormone concentrations during diurnal profiles and following oral glucose in acromegaly. **Clin Endocrinol (Oxf)** 1993; 38:589-93.
30. Mukherjee A, Monson JP, Jonsson PJ, Trainer PJ, Shalet SM. Seeking the optimal target range for insulin-like growth factor I during the treatment of adult growth hormone disorders. **J Clin Endocrinol Metab** 2003; 88:5865-70.
31. Friend KE, Hartman ML, Pezzoli SS, Clasey JL, Thorner MO. Both oral and transdermal estrogen increase growth hormone release in postmenopausal women--a clinical research center study. **J Clin Endocrinol Metab** 1996; 81:2250-6.